HAL open science

Hydrogels macro et supramoléculaires photo-stimulables dans le visible

Camille Courtine

To cite this version:

Camille Courtine. Hydrogels macro et supramoléculaires photo-stimulables dans le visible. Génie chimique. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2022. Français. NNT : 2022TOU30046 . tel-03729216

HAL Id: tel-03729216

https://theses.hal.science/tel-03729216v1

Submitted on 20 Jul 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.

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par

Camille COURTINE

Le 10 février 2022

Hydrogels macro et supramoléculaires photo-stimulables dans le visible

---

Ecole doctorale : **SDM - SCIENCES DE LA MATIERE - Toulouse**

Spécialité : **Chimie Macromoléculaire et Supramoléculaire**

Unité de recherche :
IMRCP - Laboratoire des Interactions Moléculaires et Réactivité Chimique et Photochimique

Thèse dirigée par
Anne-Françoise MINGOTAUD et Nancy LAUTH DE VIGUERIE

Jury

Mme Catherine AMIEL, Rapporteure
Mme Yvette TRAN, Rapporteure
M. Jean-Serge REMY, Examinateur
M. Morgan DELARUE, Examinateur
Mme Anne-Françoise MINGOTAUD, Directrice de thèse
Mme Nancy LAUTH DE VIGUERIE, Directrice de thèse

« Je suis de ceux qui pensent que la science est d'une grande beauté.
Un scientifique dans son laboratoire […] est un enfant placé devant des phénomènes naturels qui l'impressionnent comme des contes de fées »

Marie Curie

Résumé :

Les cellules dans l'organisme subissent des forces mécaniques, exercées par leur environnement, qui sont à l'origine de certains processus cellulaires. Ainsi, l'étude des relations étroites qui lient comportements cellulaires et contraintes mécaniques est aujourd'hui au cœur de la compréhension de nombreux phénomènes biologiques.

Les travaux présentés dans ce manuscrit portent sur la conception et l'étude d'hydrogels photo-stimulables pouvant appliquer des contraintes sur des échantillons de tissus biologiques. Ces gels sont formés à partir de trois briques de construction, un polymère porteur d'un azobenzène tétrafluoré sensible à la lumière visible, un dérivé de β-cyclodextrine et un polymère portant plusieurs fonctions mercapto. Ces briques sont liées par deux types de réseaux, un chimique et un physique. Le réseau chimique est formé par addition de Michael entre les thiols et les maléimides, portés par le polymère et le dérivé de cyclodextrine. Il permet au gel de posséder des propriétés mécaniques similaires à celles de l'environnement des cellules. Le réseau physique a pour rôle d'assurer le caractère photo-stimulable du matériau final par l'intermédiaire d'un complexe photo-sensible engageant l'azobenzène tétrafluoré et la β-cyclodextrine.

Le travail s'articule en trois parties. La première concerne le choix de l'azobenzène stimulable dans le visible et la caractérisation de ses propriétés et de sa complexation avec la β-cyclodextrine, en fonction de son état d'isomérisation. La deuxième partie expose la synthèse des gels à partir des briques de construction et son optimisation, en faisant appel aux plans d'expériences. Les propriétés mécaniques de ces hydrogels et leur réponse à la lumière sont mesurées par microscopie à force atomique et par des essais de compression. La troisième partie décrit l'utilisation de ces gels en présence d'échantillons biologiques, mettant ainsi en lumière ses applications possibles en tant que support de culture cellulaire ou tissulaire.

Ces travaux ont été réalisés dans le cadre du projet Gellight financé par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR).

Mots clés : hydrogel – photo-stimulable – azobenzène – β-cyclodextrine – complexe hôte/invité – contrainte mécanique

Abstract:

In biological environment, cells are interacting with their surroundings, the properties of which strongly influence cells behaviour. Nowadays, studying the relationship between mechanical stress and cell fate is the key to understand many biological phenomena.

The objective of the presented work is the design of a photosensitive hydrogel which could be used as a display to study biological samples upon mechanical constraints. The hydrogels are made of three building blocks, a tetrafluoro-azobenzene-bearing polymer, sensitive to visible light, a β-cyclodextrin derivative and a thiol-bearing polymer. They are composed of one chemical network and one physical network. The chemical network is yielded by thiol-maleimide Michael addition using maleimide groups grafted on the polymer and on the β-cyclodextrin derivative. It gives the gel mechanical properties closed to the ones of cell environment. The physical network gives photo-responsive properties to the hydrogel, using the photoswitchable tetrafluoro-azobenzene/ β-cyclodextrin complex.

This work is structured in three main parts. First part focuses on the characterization of two visible-responsive azobenzenes and their inclusion complexes with β-cyclodextrin. The second part deals with the synthesis of the hydrogels from building blocks and the optimization of the formulation using design of experiment. Mechanical and photochemical properties of the hydrogels are assessed by atomic force microscopy and compression testing. The last part describes the use of the hydrogels with biological samples, shading light on their applications as supports for cellular or tissular culture.

This work has been executed in the framework of the Gellight project financed by the national Agency of Research (ANR).

Keywords: hydrogel – photoresponsive – azobenzene – β-cyclodextrin – host/guest complex – mechanical stress

Remerciements :

Ce travail de thèse est le résultat de trois années passées au laboratoire des IMRCP dans le cadre du projet ANR Gellight. Il n'aurait pas été possible sans les rencontres que j'ai eu la chance de faire et que je souhaite remercier de tout coeur.

Tout d'abord je voudrais remercier mes directrices de thèse, Anne-Françoise Mingotaud et Nancy Lauth de Viguerie, pour m'avoir fait confiance et pour m'avoir épaulée pendant ces trois années. Merci Anne-Françoise pour ta rigueur et tes réflexions toujours justes. Merci Nancy d'avoir toujours été présente pour tester avec moi de nouvelles idées afin de forcer ces complexes capricieux. Vous m'avez beaucoup appris, et permis de m'épanouir avec une grande autonomie dans mon sujet de recherche.

Je voudrais également remercier Christophe Mingotaud, directeur des IMRCP, pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire et pour sa grande écoute des besoins des doctorants, particulièrement au cours des conseils de laboratoires auxquels j'ai participé.

Je voudrais ensuite adresser mes sincères remerciements à l'ensemble du jury qui m'a fait l'honneur d'évaluer mon travail. A travers vos spécialités respectives, vous avez analysé et interrogé mes recherches pour mener une discussion riche et captivante. Merci à mes rapporteures Yvette Tran et Catherine Amiel d'avoir fait ressortir les points clés de ce travail grâce à leurs expertises respectives en science de la matière molle et sur les complexes d'inclusion à base de cyclodextrine. Merci également aux deux examinateurs complétant ce jury : Jean-Serge Remy et Morgan Delarue pour leurs remarques pertinentes nous permettant de pousser plus loin la réflexion sur mon sujet de recherche.

Je tiens ensuite à exprimer ma reconnaissance à mes collègues des IMRCP et en particulier de l'équipe IDeAS : Jean-Daniel, Diana, Barbara, Jean-Claude, Laure, Charles-Louis, Fanny, Stéphane… Vous avez chacun contribué à la bonne humeur qui règne dans l'équipe et au plaisir que j'ai eu de venir travailler au laboratoire. Je voudrais en particulier remercier les collègues qui m'ont accompagnée dans le cadre de l'ANR Gellight. Merci Véronique pour les modélisations que nous avons faites ensemble, pour tes explications patientes qui m'ont sensibilisée à la pertinence des modèles « sur mesure » en photochimie et ailleurs. Merci également à Florence, tu m'as montré que les plans d'expériences pouvaient être de puissants

outils et j'espère les utiliser à nouveau dans le futur. Merci à Juliette pour tes conseils sur la mécanique des hydrogels et merci à Christophe Coudret pour tes « silly questions » lors de mes présentations en réunion d'équipe, de pertinentes remarques en particulier sur les photochromes. Enfin, merci à Clément pour nos discussion scientifiques et philosophiques toujours enrichissantes quand tu étais de passage au bureau ou bien lors des TPL3. Rappelle-moi quand même de ne plus me laisser embarquer dans un autre des tes teambuildings façon « Run&Bike », je n'ai jamais vu le bike.

Je tenais à remercier vivement les personnes sans qui, à mon avis, le laboratoire ne pourrait pas fonctionner à savoir nos gestionnaires Céline et Sandrine mais aussi Alexandre pour la patience dont tu as sûrement fait preuve lors des synthèses de β-CD fonctionnalisée que tu as réalisées sur mon projet et enfin Lucie pour ta disponibilité et ta joie de vivre communicative que ce soit lorsque j'ai eu besoin de réaliser des commandes ou d'utiliser le lyoph.

Je voudrais également remercier les différentes plateformes techniques de Toulouse qui m'ont permis de rassembler tant de résultats :

-La plateforme de microscopie électronique du CMEAB, en particulier Bruno Payré pour avoir analysé avec moi des hydrogels, *a priori* peu adaptés à la microscopie électronique.

-Le service de spectroscopie de masse, en particulier Valérie Bourdon pour son accompagnement dans la lecture de spectres de masses non triviaux.

-Le service de RMN composé de Marc Vedrenne, Claude Andreu, Caroline Toppan et Pierre Lavedan. Je souhaite remercier tout particulièrement Pierre pour son dévouement et sa patience lors de mes demandes d'analyses souvent improbables. Tu as toujours pris le temps de m'expliquer le fonctionnement de la RMN et ce qu'il était possible de faire et de voir… ou non, avec bienveillance et gentillesse.

Je voudrais aussi exprimer le plaisir que j'ai eu de collaborer avec les différents acteurs du projet Gellight :

-Les membres de l'ex-ITAV devenu RESTORE : Corinne Lorenzo et Divyendu Valappil, merci de m'avoir fait découvrir la microscopie à feuille de lumière. Merci également à Childérick Séverac pour m'avoir formée à la microscopie AFM, à ses qualités comme à ses limites. Merci d'avoir eu la patience d'attendre avec moi de voir l'influence de la lumière sur mes hydrogels et pour les conversations motivantes que nous eues.

-Les membres de l'I2MC : Céline Galès et Nicolas Pataluch, grâce à qui je comprends

maintenant les rudiments de la biologie cardiaque qui m'étaient totalement étrangers à mon arrivée. Merci à toi Nicolas pour ton travail, ta disponibilité et ta patience lorsque je venais faire des hydrogels à l'I2MC pour les exposer aux cellules ou encapsuler des tissus.
-Les membres de l'IMMM : Erwan Nicol et Inès Hamouda, merci pour vos conseils et pour m'avoir accueillie pendant 2 semaines au Mans. Un grand merci à toi Inès pour tout le travail accompli sur le projet et pour m'avoir prise sous ton aile afin de partager ton savoir, de la diffusion de la lumière à la rédaction d'article en passant par la rhéologie. Cela a été très enrichissant pour moi.
-Les membres de Specific Polymers : Cédric Loubat, Camille Chatard et Pierre-Louis Brient pour avoir rendu ce projet possible en réalisant différentes synthèses des molécules briques de mes hydrogels. Merci à vous Camille et Pierre-Louis pour les solutions et le travail de synthèse accompli de même que pour votre disponibilité pour répondre à mes interrogations.

Je souhaite remercier de tout cœur mes collègues non permanents des IMRCP sans qui ces trois ans de thèse n'auraient vraiment pas été les mêmes : Maxime, Vivien, Baptiste, Anaïs qui m'ont accueillie au laboratoire avant de finir leur thèse ; Sara, Nadiia, Aline, Clémence, Fang, Quilin qui sont arrivées en même temps que moi et ont brillamment soutenu leur thèse peu avant moi ; Mathieu, Hélène, Judith qui, de passage, se sont envolés vers l'industrie ; Marjorie, Orélia, Maxime, Emmanuelle, Alexis, Sasha, Solène, Vincent, Faniry, Liming à qui il reste encore des recherches à accomplir aux IMRCP. Merci à tous pour nos rires, nos repas et apéros partagés, pour tout ! Je vous souhaite le meilleur.

Enfin, je voudrais remercier mes amis de tous horizons qui sont venus me rendre visite à Toulouse et chez qui j'ai pu m'évader également le temps d'un week-end ou de vacances ou avec qui j'ai eu de longues discussions sur la vie : mes amis de qualités de l'ECPM ; les copines de Janson de Sailly Pauline, Blanche^2 et Delphine retrouvée à Toulouse ; mes amis, que dis-je ma famille, à mes côtés depuis le lycée, Charlotte, Juliette, Vincent, Adrien et Fabien ; les copains rencontrés pendant cette thèse : Valentin, Pauline, Léonie, Vianney, Claire ; et Pierre enfin qui malgré la distance réussi toujours à me faire autant rire.

Un grand merci également à ma famille pour m'avoir toujours soutenue et supportée même quand ça n'allait pas fort.

Pour finir merci à toi Julien, qui a su m'encourager et me pousser à me dépasser durant les

moments difficiles comment pendant les meilleurs.

Merci à vous tous pour vos conseils, votre bienveillance, vos relectures de mon manuscrit, votre écoute pendant ces trois années jusqu'au jour de ma soutenance. Je vous en serai toujours reconnaissante.

Table des Matières

Résumé :……..….i

Remerciements :…… iii

Table des Matières :……...……... vii

Table des Abréviations :……...……..xi

Table des Molécules :……...xiii

INTRODUCTION GENERALE……1

CHAPITRE 1 : Introduction bibliographique……..5

I. L'environnement cellulaire 8

I.1. La matrice extra-cellulaire (MEC) 8

I.2. Cellules et rigidité de la MEC 8

I.3. Anomalies et développement de pathologies 10

II. Généralités sur les hydrogels 11

II.1. Définitions 11

II.2. Les hydrogels naturels 12

II.3. Les hydrogels de synthèse 16

III. Molécules photo-sensibles et photo-commutables 31

III.1. Définition et intérêt 31

III.2. L'azobenzène 32

III.3. Azobenzènes stimulables directement et de façon réversible dans le visible 34

III.4. Activation via transfert d'énergie dans le visible 37

IV. Complexes d'inclusion avec les cyclodextrines 41

IV.1. Les cyclodextrines 42

IV.2. Modélisation de l'interaction hôte/invité avec l'AZO 43

IV.3. Paramètres influençant la formation du complexe AZO/CD 45

IV.4. Complexes supramoléculaires entre dérivés d'azobenzène et cyclodextrine 48

V. Hydrogels sensibles à la lumière au service de la biologie 49

V.1. Hydrogels à rigidité contrôlable par la lumière 50

V.2. Systèmes réversibles à base d'azobenzène 58

VI. Conclusion et objectifs de la thèse 69

CHAPITRE 2 : Propriétés physico-chimiques de dérivés d'azobenzène solubles dans l'eau et de leurs complexes avec les cyclodextrines……71

I. Etude préliminaire d'un azobenzène soluble dans l'eau 73
I.1. Méthodologie globale de l'étude 74
I.2. L'azobenzène-POE (AZO-POE) 75
I.3. Formation et caractérisation de complexes supramoléculaires avec les cyclodextrines... 87
II. Caractérisation physico-chimique des azobenzènes tétra-fluoré et dichloro-difluoré.... 108
II.1. Synthèses 109
II.2. Thermosensibilité du POE et mise en évidence de LCST 111
II.3. Isomérisation photochimique des 4F-AZO et 2Cl2F-AZO 115
II.4. Isomérisation thermique des 4F-AZO-POE et 2Cl2F-AZO-POE 117
II.5. Complexation des 4F-AZO-POE et 2Cl2F-AZO-POE avec la β-CD. 125
III. Conclusion 132

CHAPITRE 3 : Synthèse et caractérisation d'hydrogels photo-stimulables…….135

I. Synthèse d'hydrogels photo-stimulables 137
I.1. Choix des briques utilisées pour la synthèse de gels 137
I.2. Synthèse, préparation et caractérisation des briques utilisées dans la synthèse d'hydrogels photo-sensibles 139
I.3. Choix des formulations, plans d'expériences 160
I.4. Premières synthèses d'hydrogels et optimisation du protocole de synthèse..... 170
I.5. Synthèse de gels optimisés à base de β-CD-m-POE selon le deuxième plan d'expériences.... 178
I.6. Autres synthèses d'hydrogels 179
II. Caractérisation des hydrogels photo-stimulables..... 180
II.1. Taux de gonflement des hydrogels macromoléculaires 181
II.2. Caractérisation de la microstructure des hydrogels pas microscopie électronique à balayage (MEB) 185
II.3. Photo-stimulation d'un hydrogel 187
II.4. Détermination de la rigidité par test de compression 188
II.5. Caractérisation des propriétés mécaniques des hydrogels par microscopie à force

atomique (AFM) 192
III. Etude des propriétés du terpolymère et de son interaction avec la β-CD 205
III.1. Complexation de 4F-AZO-terpolymère avec la β-CD ? 206
III.2. Auto-organisation du terpolymère dans l'eau 208
III.3. Alternatives envisagées pour forcer la complexation 212
IV. Conclusion 215

CHAPITRE 4 : Propriétés et biocompatibilité d'hydrogels photo-stimulables……219

I. Etude de gels modèles d'agarose 221
I.1. Sensibilité des cellules à la rigidité de la matrice extra-cellulaire 222
I.2. Caractérisation mécanique de gels d'agarose de différentes rigidités 223
I.3. Agarose au contact de HEK 293T 230
I.4. Conclusion 230
II. Biocompatibilité des gels macromoléculaires 231
II.1. Incubation avec le milieu de lavage conditionné 232
II.2. Incubation directe au contact de l'hydrogel après lavage 233
II.3. Conclusion 236
III. Imagerie de tissus cardiaques de souris encapsulés dans un hydrogel macromoléculaire ……..... 236
III.1. Organisation du tissu cardiaque 237
III.2. Imagerie en microscopie confocale 237
III.3. Imagerie en microscopie à feuille de lumière (SPIM) 242
IV. Conclusion 246

CONCLUSION GENERALE……247

MATERIEL ET METHODES……253

Références……...305

Annexes……...325

Table des abréviations :

α-CD : α-cyclodextrine

AA : acide acrylique

ADN : acide désoxyribonucléique

AFM : microscopie à force atomique

AH : acide hyaluronique

AZO : azobenzène

β-CD : β-cyclodextrine

DAE : diaryléthènes

DFT : théorie fonctionnelle de la densité

DM : dynamique moléculaire

DMA : diméthyl acrylate

DMF : dimethylformamide

DMFu : diméthylfurane

DMNBAT : 4,5-dimethoxy 2-nitrobenzyl-aminothiol

DMSO : diméthylsulfoxyde

γ-CD : γ-cyclodextrine

GAG : glycosaminoglycanes

HEK293 : cellules rénales embryonnaires humaines 293

hMSC : cellules souches mésenchymateuses humaines

H9C2 : myoblastes cardiaques de rat

ISC : conversion intersystème

Ka : constante d'association d'un complexe hôte/invité

LAP : phényl-2,4,6-triméthylbenzoyl-phosphinate de lithium

LCST : température basse critique en solution

MEC : matrice extra-cellulaire

MMP : métalloprotéases matricielles

NFAT : facteur nucléaire des lymphocytes T activés

NIPAM : N-isopropylacrylamide

NIR : proche infrarouge

OE : oxyde d'éthylène

PAA : poly(acide acrylique)

PEI : poly(imine d'éthylène)

PG : protéoglycanes

PLA : poly(acide lactique)

PLGA : poly(acide lactique-co-glycolique)

PMMA : poly(méthacrylate de méthyle)

PNIPAM : poly(N-isopropylacrylamide)

POE : poly(oxyde d'éthylène)

POEnb : poly(oxyde d'éthylène) terminé norborène

POESH : poly(oxyde d'éthylène) terminé thiol

POP : poly(oxyde de propylène)

PSS : état photostationnaire

PVA : alcool polyvinylique

SPIM : microscopie à feuille de lumière

TA : température ambiante

UCNP : nanoparticules « up-converting »

UV : ultra-violet

VIC : cellules interstitielles de valve

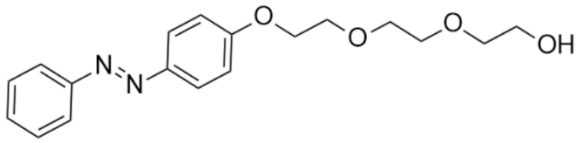
YAP : « Yes-Associated-Protein »

%m : pourcentage massique

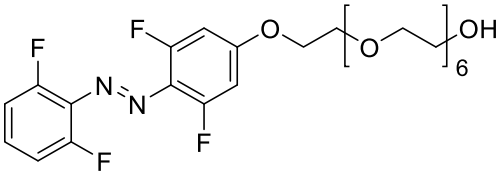
2Cl2F-AZO : azobenzène dichloré-difluoré

4F-AZO : azobenzène tétrafluoré

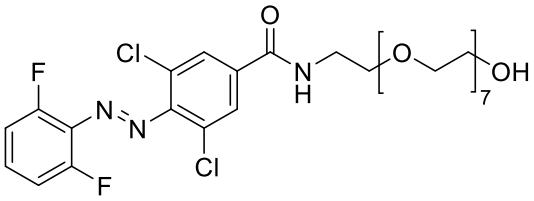
Table des molécules :



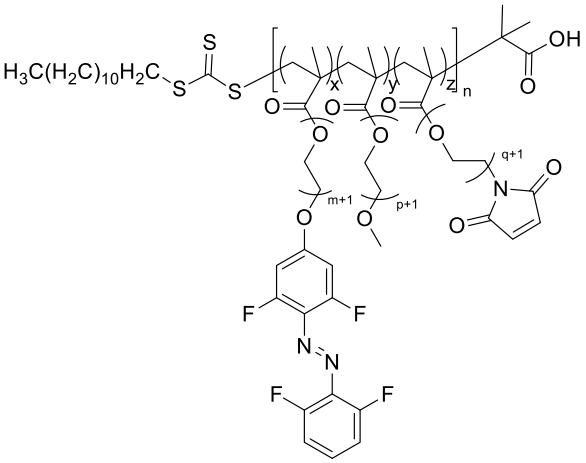
AZO-POE



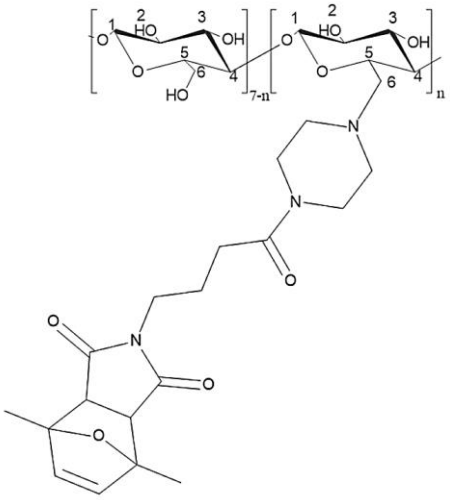
4F-AZO-POE



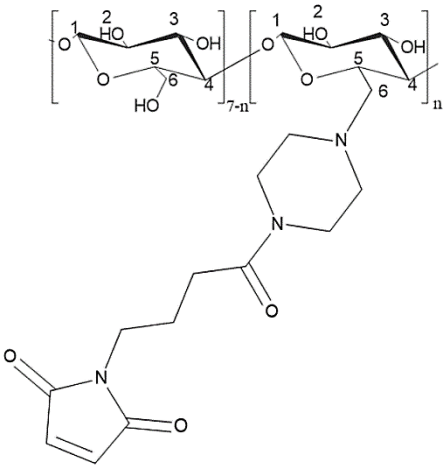
2Cl2F-AZO-POE



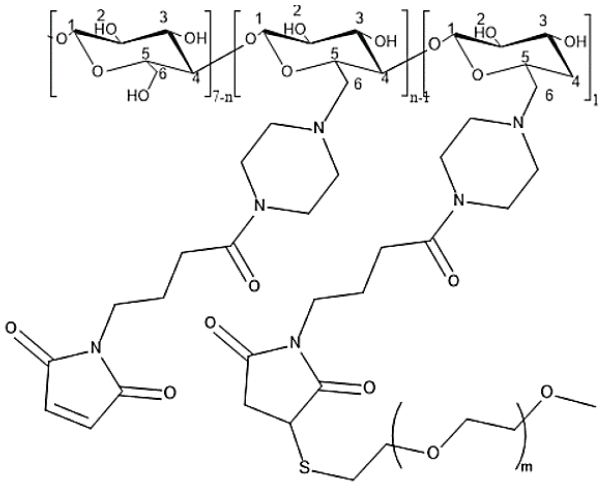
Terpolymère



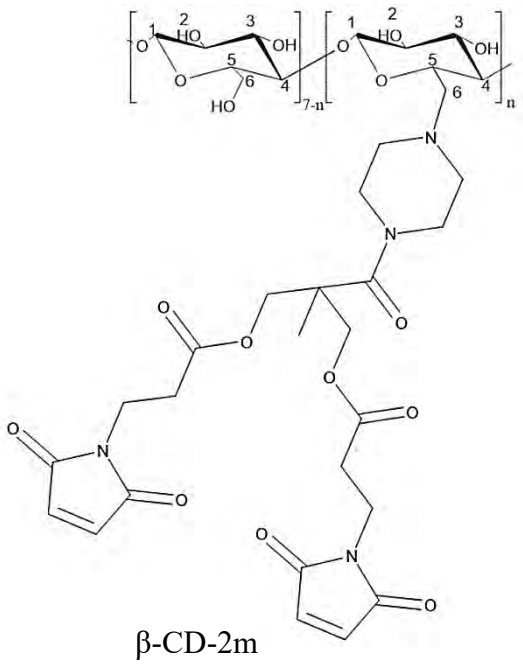
β-CD-m_p



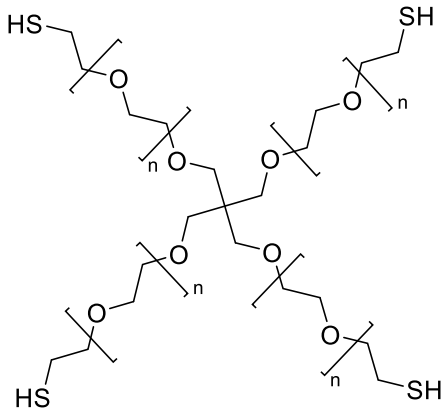
β-CD-m



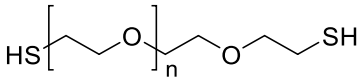
β-CD-m-POE



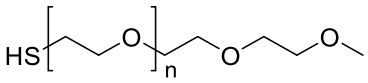
β-CD-2m



POE-tétrathiol ou tétrathiol ou POE-4SH



POE-dithiol ou dihiol ou POE-2SH



POE-monothiol ou monothiol ou POE-SH

INTRODUCTION GENERALE

Les hydrogels sont définis comme des réseaux polymères gonflés d'eau. Leurs propriétés sont très variables en fonction des polymères utilisés et de leurs interactions avec le solvant. Un hydrogel est dit stimulable s'il peut subir des changements physiques ou chimiques en réponse à un stimulus. La découverte de tels matériaux a ouvert les portes d'un vaste domaine de recherche et leur conception a fait l'objet de nombreuses applications notamment dans le domaine de la culture cellulaire, de la délivrance de médicaments, mais également dans des capteurs ou systèmes de micro fluidiques. Différents stimuli externes ont été utilisés pour solliciter de tels systèmes, par exemple la température, le pH ou encore la lumière. La versatilité des hydrogels en fait des matériaux ajustables, sur mesure, dédiés à l'application désirée. De nombreux travaux réalisés au cours des dernières années ont utilisé des hydrogels biocompatibles comme plateformes de culture cellulaire en deux ou trois dimensions.

Dans les tissus, les cellules perçoivent leur environnement par l'intermédiaire de signaux biochimiques et mécaniques. Ceux-ci influencent les comportements cellulaires, tels que leur prolifération, leur migration ou leur différenciation. Les hydrogels permettent d'étudier les comportements biologiques dans des environnements ressemblant à la matrice extra-cellulaire, qui entoure les cellules dans leur milieu naturel. Cependant, des hydrogels statiques, aux propriétés immuables, ne suffisent pas pour comprendre les mécanismes biologiques complexes, qui ont lieu dans une matrice en constant changement. La nécessité de trouver de nouveaux systèmes, dynamiques, a ouvert un champ de recherche important en biologie, mettant à profit les hydrogels stimulables. Plus précisément, des hydrogels à rigidité contrôlable, qui sont des candidats idéaux pour l'étude approfondie des relations entre développement cellulaire et contraintes mécaniques.

La mécanobiologie s'intéresse aux conséquences des contraintes mécaniques sur les comportements de cellules ou de tissus vivants. La mécanique de la matrice extra-cellulaire régit en effet de nombreux processus biologiques, parmi eux, les phénomènes impliqués dans la fonction cardiaque. De nombreux efforts ont été faits afin de régénérer des tissus cardiaques endommagés. Par exemple, l'utilisation de cellules souches embryonnaires a montré un grand succès pour la réparation de tissus cardiaques. Cependant, des problèmes d'arythmie courants traduisent une mauvaise cohésion des cellules au sein du nouveau tissu. Le tissu cardiaque contractile est particulièrement sensible aux propriétés mécaniques de son environnement. L'application de contraintes mécaniques à l'aide d'un hydrogel stimulable pourrait apporter de nouvelles connaissances en termes de création de cardiomyocytes plus robustes dans le temps. C'est dans ce contexte que s'inscrit ce travail de thèse financé par l'Agence Nationale pour la

Recherche (projet ANR Gellight 2018-2021). En effet, l'équipe de recherche du Dr. C. Galès, partenaire du projet, de l'Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC), étudie les relations entre l'architecture du tissu cardiaque (plus précisément des cellules contractiles cardiaques) et les fonctions du cœur. L'objectif initial de ce projet ANR a été le développement d'un hydrogel stimulable qui permettrait de simuler les propriétés mécaniques de la matrice de cellules saines et malades afin d'étudier les réponses cellulaires qui y sont associées. Un tel hydrogel a ensuite été envisagé pour servir de porte-échantillons pour l'imagerie d'échantillons biologiques vivants *in vitro* en microscopie. Plus particulièrement, la microscopie photonique, qui permet l'imagerie du vivant en trois dimensions, a été une application visée par ce projet de thèse. Un travail de post-doctorat effectué par le Dr. J. Royes-Mir a servi de preuve de concept au travail réalisé lors de cette thèse. Un premier hydrogel à rigidité photo-contrôlable avait alors été mis au point. Ce gel mettait en jeu la formation et dissociation de complexes hôte/invité sensibles à la lumière, qui modifiaient ses propriétés mécaniques. Il s'agit de l'un des premiers systèmes montrant des changements de propriétés mécaniques d'une telle amplitude. Cet hydrogel possède néanmoins certains défauts que ce projet propose de pallier. Premièrement, il nécessite de la lumière ultra-violette pour perdre en rigidité et de telles radiations sont peu adaptées à des applications en biologie car elles sont néfastes pour les cellules et pénètrent très peu les tissus. De plus la synthèse du gel n'a pas pu être éxécutée sans l'ajout d'un cosolvant organique, dont on aimerait s'affranchir. L'objectif de ce manuscrit est de décrire les pistes explorées dans l'optique de former des hydrogels à rigidité photo-contrôlable à l'aide de lumière visible pour l'étude de relations entre la mécanique de la matrice extra-cellulaire et les comportements cellulaires.

Le premier chapitre fait état de la littérature sur les hydrogels en général, les molécules et interactions stimulables par la lumière, et enfin leur incorporation dans des hydrogels à destination des domaines de la biologie. Dans le deuxième chapitre, deux dérivés d'azobenzène photo-stimulables dans le domaine du visible ont été caractérisés dans l'eau, ainsi que leurs interactions avec la β-cyclodextrine. Dans le troixième chapitre, la formation d'hydrogels à partir de trois briques de synthèse formant un « double » réseau de réticulation chimique et physique, photo-stimulable a été discutée. La caractérisation des hydrogels a été décrite dans ce chapitre ainsi que les difficultés rencontrées en fonction des molécules choisies pour la synthèse des gels. Enfin le dernier chapitre porte sur l'utilisation des gels développés pour encapsuler des échantillons biologiques. En particulier, une biopsie cardiaque a pu être imagée par cet intermédiaire.

CHAPITRE 1

Introduction bibliographique

Le chapitre d'introduction bibliographique définit, dans un premier temps, la matrice extra cellulaire et souligne l'importance de ses interactions avec les cellules dans tous les mécanismes biologiques. Ensuite, il développe les principales stratégies utilisées pour la conception d'hydrogels chimiques et physiques. Dans un troisième temps, il décrit, respectivement, les différentes molécules photochromes qui ont la capacité de changer de forme et de propriétés en fonction de la lumière qu'ils absorbent ainsi que les stratégies d'obtentions de systèmes répondant à la lumière visible. Les interactions supramoléculaires particulières existant entre l'azobenzène ou ses dérivés et les cyclodextrines sont abordés dans un quatrième temps. Enfin, ce chapitre présente les différents hydrogels à base d'azobenzène ou de ses dérivés développés par le passé, pour l'étude de phénomènes biologiques. Cette partie met notamment en lumière la multitude d'hydrogels stimulables développés au cours des dernières années ainsi que la pertinence de l'utilisation d'un système sensible à la lumière pour l'obtention de systèmes facilement réversibles (Figure 1).

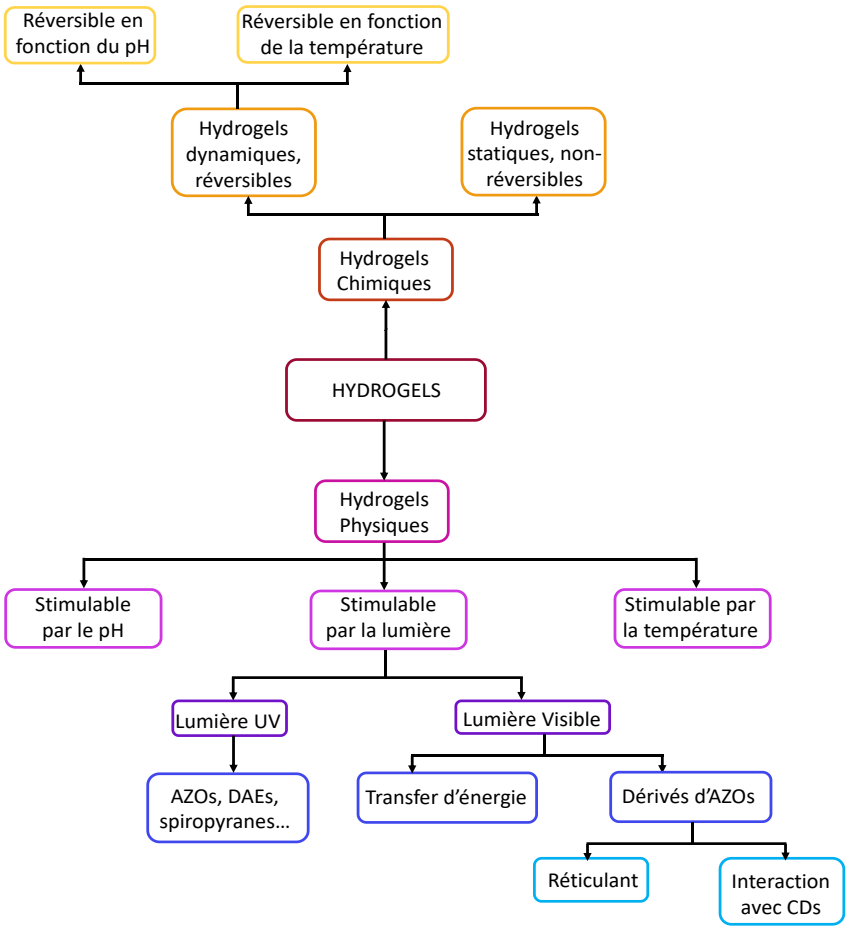


Figure 1: Schéma représentatif des différentes familles d'hydrogels avec une attention particulière portée sur les hydrogels stimulables par la lumière.

I. L'environnement cellulaire

I.1. La matrice extra-cellulaire (MEC)

La matrice extra-cellulaire (MEC) regroupe l'ensemble des composantes extracellulaires qui forment un réseau en trois dimensions. C'est elle qui donne au tissu ses propriétés biomécaniques et structurelles. Il s'agit d'un système très dynamique qui régit de nombreux processus cellulaires[1].

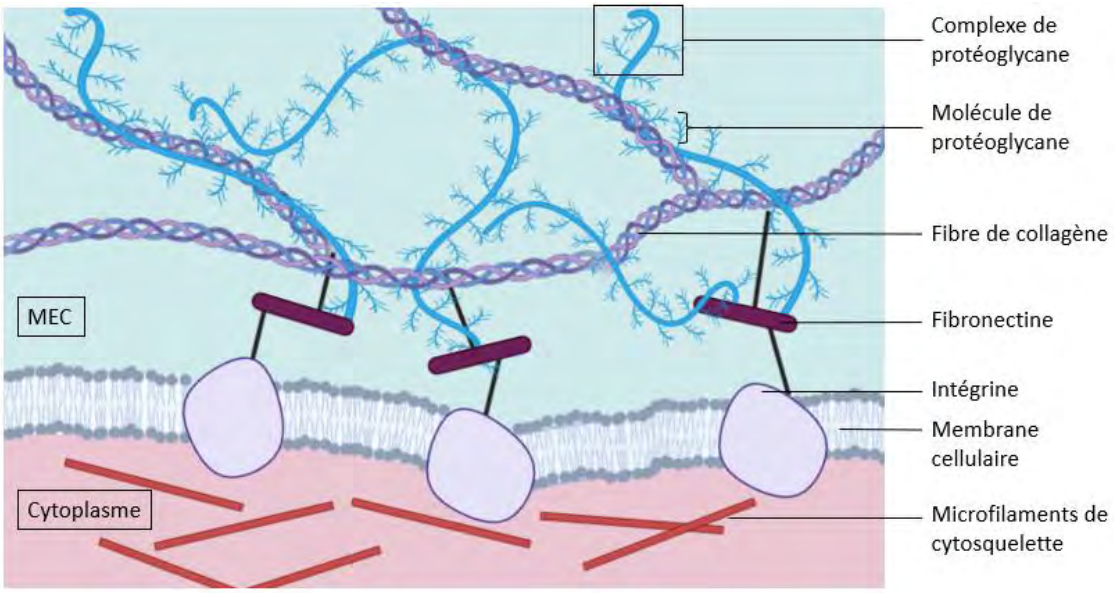


Figure 2 : Schéma de l'interface entre la cellule et la matrice extra-cellulaire. Réalisé avec BioRender.

La composition précise et la structure de la MEC varie selon les tissus. Ses deux composantes majoritaires sont des protéines fibreuses (collagène, laminine, fibronectine, élastine) et les glycanes (protéoglycanes (PGs) et glycosaminoglycanes (GAGs)[1]. Les GAGs remplissent les interstices de la MEC. Ils sont chargés négativement et séquestrent les molécules de signalisation telles que les facteurs de croissance. Le collagène (souvent de type I ou II) est associé à d'autres protéines ainsi qu'aux PGs pour former une matrice fibrillaire structurée en 3D (Figure 2). Cette matrice joue un rôle essentiel dans le contrôle des fonctions et mécanismes cellulaires, notamment de par ses propriétés mécaniques.

I.2. Cellules et rigidité de la MEC

La MEC est sécrétée par les différentes cellules de l'organisme, épithéliales, endothéliales, immunitaires, fibroblastes etc… Toutes ces cellules sont entourées et intégrées dans le réseau de matrice. Elles interagissent par ailleurs avec la MEC grâce à leurs récepteurs de

surface (Figure 3) comme les intégrines, les récepteurs à domaine discoïdine, les PGs de surface ou les récepteurs d'acide hyaluronique CD44[1]. Ainsi, les cellules sont capables de recevoir des signaux de la MEC qui dictent leur comportement. Des facteurs de croissance tels que des cytokines ou chimiokines sont intégrés à la MEC et peuvent être libérés, quand les conditions nécessaires sont réunies, pour agir sur les cellules. Notamment, les modifications de rigidité de leur environnement influencent l'adhésion, la dynamique des cellules et leur activité métabolique[2] ainsi que leur morphologie et la conformation de l'intégrine[3]. En effet, les cellules possèdent des récepteurs qui leur permettent de sentir la rigidité de leur environnement changer. Ainsi, la MEC peut guider les cellules en jouant sur ses propriétés internes comme la porosité, la rigidité ou encore la topographie. Par exemple, grâce à sa forte rigidité sur le site d'une blessure, la MEC attire les cellules nécessaires à la réparation des tissus[4]. Cette capacité qu'ont les cellules à suivre un gradient de rigidité de la MEC est appelée durotaxie.

De nombreux autres phénomènes biologiques tels que la croissance, la migration, la différentiation, la survie, l'homéostasie, et la morphogenèse[5–7], sont ainsi régis ou guidés par les propriétés de la MEC. Les cellules contribuent également à la constante réorganisation spatiale de la MEC en contrôlant sa production et sa dégradation. En effet, c'est par l'intermédiaire d'enzymes produites par les cellules, les métalloprotéases matricielles (MMPs pour « matrix metalloproteinases »), que celles-ci peuvent dégrader la MEC pour, ensuite, la remodeler[1]. Les modifications et réarrangements de la MEC sont des mécanismes importants puisqu'ils permettent de réguler les fonctions et processus cellulaires comme le renouvellement de cellules souches[8] ou encore la cicatrisation[9].

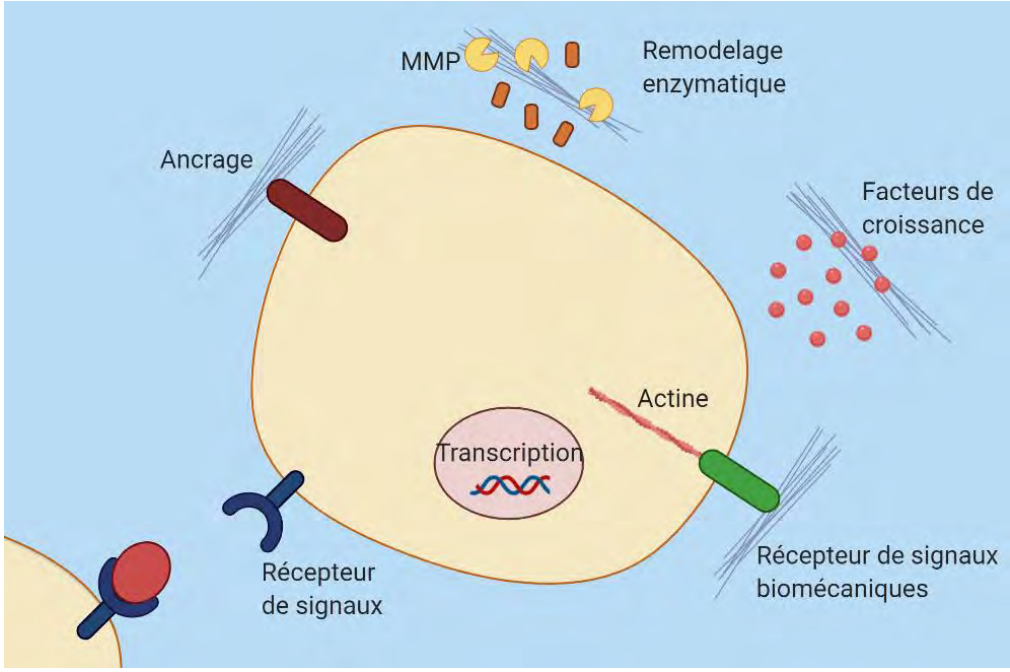


Figure 3 : Facteurs de la MEC influençant le comportement cellulaire[8]. Réalisé avec BioRender.

La MEC est un environnement complexe et dynamique qui régule les comportements cellulaires. La coordination multifactorielle entre cellules et MEC participe au bon fonctionnement des organismes, cependant, il n'est pas rare d'observer des anomalies dans le fonctionnement de cette dynamique complexe.

I.3. Anomalies et développement de pathologies

Une dynamique anormale de la MEC engendre des migrations, proliférations et morts cellulaires dérégulées, ainsi qu'une perte de différenciation. Les conséquences de tels événements sont graves puisqu'elles favorisent la formation de fibrose dans les tissus et le développement de cancers[10,11].

Par exemple, ces dérèglements sont particulièrement probables suite à une blessure, durant le processus de cicatrisation. Ils sont dus à une altération de l'équilibre entre la dégradation de la MEC et sa production. Dans ces conditions, la MEC est surproduite, à cause d'une surafflUence de fibroblastes, et donc très rigide. Ces zones où la MEC a remplacé le tissu natif sont dites fibreuses, atteinte de fibrose. Le tissu perd ainsi en fonctionnalité, ce qui peut conduire au dysfonctionnement d'organes vitaux[12]. La fibrose peut survenir dans presque toutes les parties du corps et représente une cause majeure de morbidité et mortalité dans le monde[13]. Lorsqu'elle touche le cœur, la fibrose génère notamment de l'arythmie et de l'insuffisance cardiaque[14]. Il a également été montré que la rigidité des tissus fibreux jouait un rôle de catalyseur dans la

prolifération de certains cancers[15].

La MEC a donc un rôle déterminant dans l'apparition ou la progression de nombreuses maladies chroniques. Comprendre les mécanismes régissant la MEC est ainsi essentiel pour développer de nouvelles solutions thérapeutiques et de nouveaux outils de régénération tissulaire.

Le contrôle des propriétés de la MEC est devenu un élément déterminant dans la voie de la compréhension de ses interactions avec les cellules. La conception d'une MEC sur mesure pourrait notamment permettre le contrôle de processus biologiques en vue de thérapies. Dans cette optique, les hydrogels se sont avérés être d'excellents candidats pour la création de MEC de synthèse. En effet, il est possible de contrôler leur propriétés chimiques, mécaniques et de surface pour mieux influencer le développement des tissus, la progression de maladies ou la cicatrisation[16].

II. Généralités sur les hydrogels

II.1. Définitions

Les hydrogels sont constitués d'un réseau polymère structuré en trois dimensions dans l'espace et qui a la capacité de se gonfler d'eau. Ils peuvent être naturels, ou de synthèse. Sont appelés hydrogels naturels, ou biosourcés, les gels formés de polymères extraits d'organismes naturels. Ils présentent l'avantage d'être biocompatible, biodégradable et non-toxiques. Les hydrogels de synthèse sont, quant à eux, des architectures créées sur mesure afin d'atteindre des propriétés structurales, biologiques ou mécaniques recherchées. Ils présentent des propriétés plus reproductibles et contrôlables que les hydrogels naturels. Les hydrogels peuvent également être divisés en deux grandes catégories : les hydrogels chimiques et les hydrogels physiques. Leurs différences proviennent des stratégies de synthèse employées : la formation d'hydrogels chimiques se fait par réticulation du polymère par la création de liaisons covalentes, et celle d'hydrogels physiques résulte d'interactions faibles qui créent un assemblage en trois dimensions. Ces hydrogels ont des propriétés qui, en fonction des composantes utilisées, peuvent être ajustées pour l'application désirée. Ils représentent donc d'excellentes plateformes pour la culture cellulaire par exemple.

Dans cette partie, les propriétés et domaines d'applications des différents types d'hydrogels seront développés. Des exemples d'hydrogels naturels seront d'abord donnés puis les stratégies de synthèse et les phénomènes intervenant dans la construction d'hydrogels chimiques et physiques seront détaillés.

II.2. Les hydrogels naturels

Les hydrogels formés à partir de gélifiants polymères naturels sont souvent utilisés dans les domaines biomédicaux, en ingénierie tissulaire par exemple, car ils sont des composants de la MEC ou possèdent des propriétés macromoléculaires qui en sont proches. Les gélifiants polymères naturels les plus utilisés sont le collagène, la gélatine, le chitosane, l'agarose, l'alginate, la fibrine et l'acide hyaluronique.

II.2.1. Le collagène et la gélatine

Chez l'homme, on distingue 28 protéines différentes appelées « collagène »[17]. Le collagène de type I est l'un des constituants majeurs de la MEC[18,19] et il a été beaucoup utilisé dans le domaine biomédical. Il s'agit de la protéine la plus présente dans les tissus des mammifères, notamment dans la peau et les vaisseaux sanguins[17], ce qui en fait un matériau très attractif pour les applications telles que la délivrance de médicaments[20,21] et la médecine régénérative[22,23]. De plus, il est facilement et rapidement extrait de la peau ou des tendons animaux. Le collagène a la capacité de s'organiser, dans les conditions physiologiques, en fibrilles qui forment alors un réseau, donnant au matériau ses propriétés mécaniques si spécifiques[17]. Sur ces fibrilles, peuvent se fixer des protéines de la MEC comme la fibronectine. Plusieurs récepteurs de surface des cellules reconnaissent également la structure en triple hélice du collagène, les principales étant les intégrines[24]. Les collagénases sont des enzymes qui ont la capacité de dégrader le collagène ce qui permet des remodelages du réseau préalablement formé *in vivo.* Le collagène est non seulement biocompatible mais aussi biodégradable[21] et sa structure en triple hélice permet une bonne adhésion et diffusion des cellules dans sa masse.
Cependant, deux inconvénients majeurs du collagène I sont : son antigénicité (même si faible)[25] et le risque qu'il présente de transmission de certaines maladies infectieuses[26]. La gélatine est un collagène de type I dénaturé, les liaisons chimiques du gel ont été rompues. Elle est moins antigénique que son parent mais ses propriétés mécaniques sont mauvaises. Pour remédier à cela, elle peut être réticulée chimiquement mais de la toxicité peut alors survenir. La gélatine a donc été particulièrement utilisée combinée à des polymères biocompatibles pour pallier ses faibles propriétés mécaniques et sa toxicité induite par l'ajout d'agents réticulants[27,28].

II.2.2.La fibrine

La fibrine est une protéine, présente chez les mammifères, qui nait du clivage par la thrombine des fibrinopeptides portées par le fibrinogène, qui sont ensuite polymérisés sous l'action

d'enzymes, formant la fibrine[29]. La fibrine est activement engagée dans le processus de cicatrisation. Elle permet notamment l'adhésion des plaquettes et des leucocytes sur le site d'une blessure[30–32]. De la même manière que le collagène (II.2.1), la fibrine peut se lier à plusieurs récepteurs d'adhésion des cellules tels que l'intégrine[32]. Grâce à son rôle dans la réparation spontanée des plaies et à sa biocompatibilité, les hydrogels à base de fibrine sont les plus largement utilisés pour la régénération tissulaire dans le domaine clinique.

En 2006, Ho *et al.* utilisèrent des gels 3D de fibrine par contenant des quantités contrôlées de fibrinogène et de thrombine. Ces gels ont servi de support pour la culture *in vitro* et l'injection de cellules souches mésenchymateuses humaines (hMSCs)[33]. Les chercheurs observèrent notamment que la prolifération des hMSCs dans le gel dépend des concentrations en réactifs et que leur différenciation pourrait être influencée par les propriétés mécaniques du gel.

Contrairement à la matrice de collagène qui se forme lentement et de manière non contrôlée par les cellules qui la sécrètent, les gels de fibrine s'assemblent rapidement et cette polymérisation peut être tout à fait contrôlée. De plus, il est possible d'incorporer des propriétés biologiques par le biais d'autres protéines de la MEC au gel de fibrine.

II.2.3.L'alginate et l'agarose

L'alginate est un polysaccharide anionique extrait des algues brunes qui peut être gélifié dans des conditions douces, en présence de cations divalents. L'alginate a été largement utilisé comme plateforme pour la culture cellulaire en 3D, comme vecteur d'encapsulation de cellules et comme support pour l'ingénierie tissulaire[34–36]. Il s'agit d'un copolymère à block contenant les deux monomères acide β-D-mannuronique (unité M) et l'acide α-L-guluronique (unité G) liés entre eux par liaisons osidiques β-1-4 (Figure 4). Ce sont les unités G qui ont la capacité de complexer les cations. Un cation divalent peut donc former un complexe avec plusieurs chaînes d'alginate et jouer le rôle de point de réticulation formant un réseau d'alginate en trois dimension, gel d'alginate. Le comportement mécanique et les propriétés des gels d'alginate dépendent du choix du polysaccharide choisi (provenance, rapport M/G, masse molaire) et de sa mise en forme. Notamment, leurs caractéristiques en tension varient grandement en fonction du ratio de blocs G dans le polymère[37]. Une grande contenance en unité G permet la formation d'hydrogels plus résistants et plus ductiles que des gels contenant une majorité d'unités M. La composition du solvant utilisé peut aussi jouer un rôle sur les propriétés mécaniques des gels d'alginate. De plus, le temps d'incubation dans le tampon est source de perte de tenue mécanique en compression et en cisaillement[38] à cause de la diffusion des cations divalents en

dehors de la matrice.

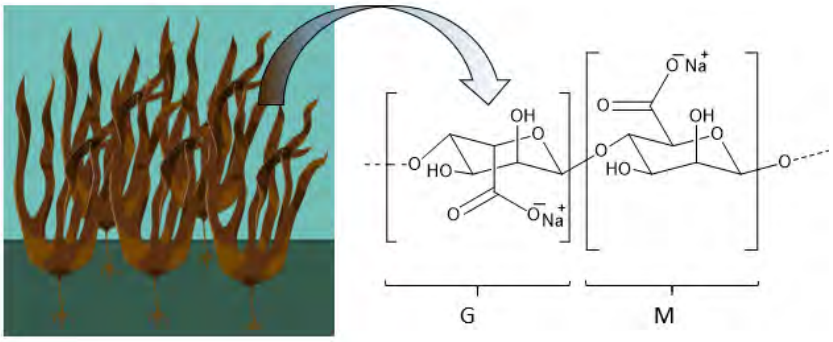


Figure 4 : Structure chimique de la molécule d'alginate extraite des algues brunes.

Pour cette dernière raison, des gels d'alginates réticulés chimiquement par des molécules bifonctionnelles ont été développés. Lee *et al.* ont décrit des gels d'alginate réticulés par des agents réticulant organiques[39]. Ils ont ainsi pu contrôler leurs propriétés mécaniques en compression et leur degré de gonflement qui dépendent essentiellement de la densité de réticulation et des caractéristiques de l'agent de réticulation.

L'agarose est un polysaccharide linéaire de β-D-galactopyranose et 3,6-anhydro-α-L-galactopyranose (Figure 5). Il provient d'une haute purification de l'agar, lui-même extrait des algues rouges[40]. Sa gélification est thermoréversible : au-dessus de sa température de gélification T_{gel}, l'agarose est sous forme liquide et, en dessous de T_{gel}, les molécules s'arrangent pour former un gel. Cette température de gélification varie, en fonction du type d'agarose, entre environ 15 et 35 °C.

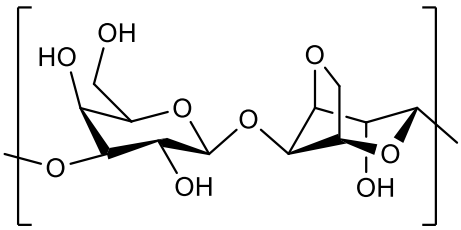


Figure 5 : Schéma d'une unité de répétition de l'agarose.

L'agarose est un composé hydrophile et non chargé sur lequel les cellules n'adhèrent pas[41], ce qui en fait un bon candidat pour l'électrophorèse, pour lequel il a été largement utilisé[42]. L'agarose a également été utilisé comme matériau de culture cellulaire. Par exemple, Mauck *et al.* ont étudié le comportement de chondrocytes cultivés sur des gels d'agarose[43]. Ils ont noté que les cellules cultivées avec une légère contrainte mécanique forment un tissu plus rigide que leurs homologues cultivées sans cette contrainte.

L'agarose est un biomatériau non cytotoxique, biodégradable, qui a la capacité de conserver au cours du temps la forme dans laquelle il a été moulé, propriété intéressante pour des applications de bioimpression en trois dimensions[44].

II.2.4.L'acide hyaluronique (AH)

L'acide hyaluronique (AH), ou hyaluronane, est un polysaccharide linéaire (Figure 6) isolé pour la première fois à partir de l'humeur vitrée de l'œil par Meyer en 1934[45]. Il s'agit d'un glycosaminoglycane, composant important de la MEC, présent dans de nombreux tissus humains. L'AH est aujourd'hui essentiellement produit par fermentation bactérienne, ce qui permet sa synthèse en quantités industrielles et de façon reproductible[46]. En raison des charges négatives dont il est porteur, ce polysaccharide est largement hydraté et une partie de cette eau est immobilisée au sein de sa structure[47]. C'est grâce à sa large teneur en eau que l'AH apporte de la flexibilité aux tissus qu'il compose et qu'il assure la lubrification nécessaire au travail des tissus musculaires[48]. De plus, l'AH a la capacité d'interagir avec les cellules via certains de leur récepteurs de surface qui participent à la signalisation régulée par le facteur de croissance[49].

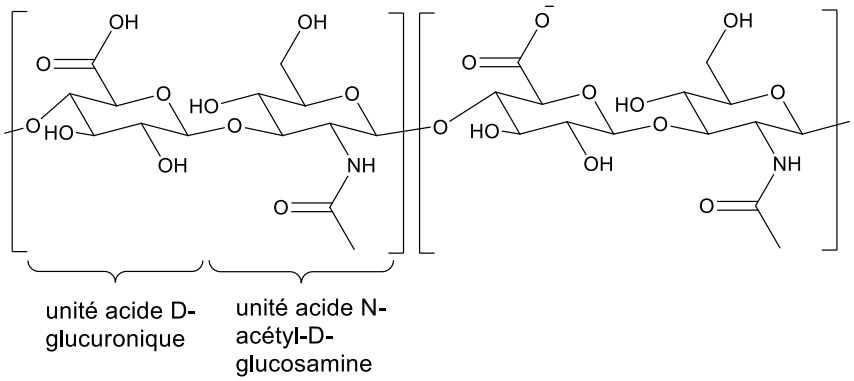


Figure 6 : Formule chimique de l'acide hyaluronique (AH) formé d'unités disaccharides répétitives d'acide D-glucuronique et N-acétyl glucosamine

Il a été démontré que l'AH pouvait être utilisé, sous forme d'hydrogel, pour réparer par exemple, des cartilages[50] ou des os[51] déficients. Cependant, ses propriétés mécaniques sont limitées, les chimistes ont donc été incités à trouver des solutions pour optimiser sa résistance. Des modifications chimiques au niveau de la fonction acide carboxylique de l'acide D-glucuronique, des fonctions alcools primaires et secondaires ainsi que du groupe N-acétyle après désacétylation de celui-ci avec des molécules fonctionnelles, ont rendu ce polymère plus adapté à la biomédecine et ont fait l'objet d'une revue par Schanté *et al.*[52]. Ainsi, l'AH modifié

peut être soit conjugué soit réticulé avec lui-même ou d'autres polymères tels que le polyéthylène glycol (PEG)[53] par exemple. Ceci permet la création d'un réseau en trois dimensions, insoluble dont les propriétés mécaniques sont améliorées. Les nombreuses possibilités de modifications qu'offre l'AH sont autant de possibilités pour contrôler et optimiser les propriétés du matériau final. La versatilité de leurs propriétés ainsi que l'accessibilité de l'AH font de ses dérivés des composés attractifs pour la création de MEC de synthèse. Ils trouvent déjà des applications dans la réparation de tissus et la délivrance de médicaments.

II.3. Les hydrogels de synthèse

Les hydrogels naturels ont le grand avantage d'être biocompatibles, parfois biodégradables, et de promouvoir la prolifération d'un grand nombre de cellules. Cependant, de tels matériaux sont souvent mal définis et il peut être complexe d'adapter leur propriétés mécaniques et biochimiques[54]. De plus, ils sont facilement contaminés ou dégradés, il est donc difficile d'y étudier véritablement des réponses cellulaires. C'est à ces problématiques que répondent les hydrogels de synthèse. Créés en laboratoire, leurs compositions sont contrôlées afin d'obtenir *in fine* des matériaux aux propriétés physiques et chimiques désirées.

II.3.1.Les hydrogels chimiques

Un hydrogel est dit chimique s'il s'agit d'un réseau formé par l'association de chaînes polymères *via* des liaisons covalentes. De nombreuses réactions ont été utilisées pour synthétiser des hydrogels chimiques (Figure 7)[16]. Le choix de la stratégie de synthèse employée conditionne les propriétés du matériau final telles que son taux de gonflement, sa porosité ou encore ses propriétés mécaniques.

Une méthode particulièrement développée pour la synthèse d'hydrogels est la polymérisation radicalaire. Il s'agit d'une réaction en chaîne où l'addition d'un monomère sur un bout de chaîne activé, sous forme de radical, récrée un bout de chaîne réactif[55]. Elle est très utilisée à l'échelle industrielle également car elle a les avantages d'être assez facile à mettre en œuvre, notamment dans l'eau, et de tolérer des traces d'impuretés[56]. Les monomères vinyliques sont les plus couramment utilisés. Leur polymérisation met en jeu un amorceur radicalaire dont la proportion relative au monomère influence les propriétés physico-chimiques finales du polymère. Il existe, en outre, une multitude de monomères disponibles pour exécuter la polymérisation radicalaire comme par exemple, l'acide acrylique (AA) ou le N-isopropylacrylamide (NIPAM). Certains

polymères naturels peuvent être substitués avec des groupements acrylates ou méthacrylates dans le but de former des hydrogels bioactifs ou biocompatibles. Cependant, certains de ces monomères et conditions d'amorçage peuvent être toxiques pour des cellules[57]. Un autre inconvénient de ces polymères est qu'il est difficile d'obtenir des hydrogels aux structures ordonnées et homogènes avec la polymérisation radicalaire à cause de son caractère non-contrôlé.

Il est possible de préparer des hydrogels à partir de polymères contenant des fonctions qui réagissent par exemple par estérification, amidification ou ouverture d'époxyde. De même, la réaction entre une amine et un aldéhyde conduit à la formation d'une base de Schiff dans des conditions douces de synthèse et sans ajout d'agent de réticulation[58]. Les groupes fonctionnels résiduels peuvent ensuite être de nouveau réticulés ou bien laissés comme tels afin d'y greffer des molécules bioactives, par exemple. Ainsi, des polymères naturels comme l'AH, le chitosane ou le dextrane peuvent réagir selon cette réaction avec d'autres polymères naturels ou synthétiques porteurs de groupes amines et ainsi former des hydrogels[59,60]. Le temps de prise du gel ainsi que ses propriétés physiques finales dépendent du rapport entre les fonctions réactives. Cette réaction est également utilisée pour la synthèse d'hydrogel, sans catalyseur, par formation d'oxime à partir de polymère contenant des hydroxylamines[61]. De tels matériaux ont été amplement utilisés pour le développement de gels injectables en médecine régénérative.

La chimie click regroupe un ensemble de réactions très rapides et efficaces, réalisables dans des conditions douces de synthèse. Les réactions de chimie click les plus couramment utilisées pour la formation de gels chimiques sont la cycloaddition azoture/alcyne, la réaction de Diels-Alder et la réaction thiol-ène. La cycloaddition azoture/alcyne est catalysée par le cuivre (I) dont la cytotoxicité réduit la biocompatibilité[62]. Une alternative pour réaliser cette réaction sans catalyseur est d'utiliser un cycloalcyne. Cette méthode et a permis de synthétiser des gels de poly(oxyde d'éthylène) (POE) dépourvus de trace de catalyseur toxique[63].

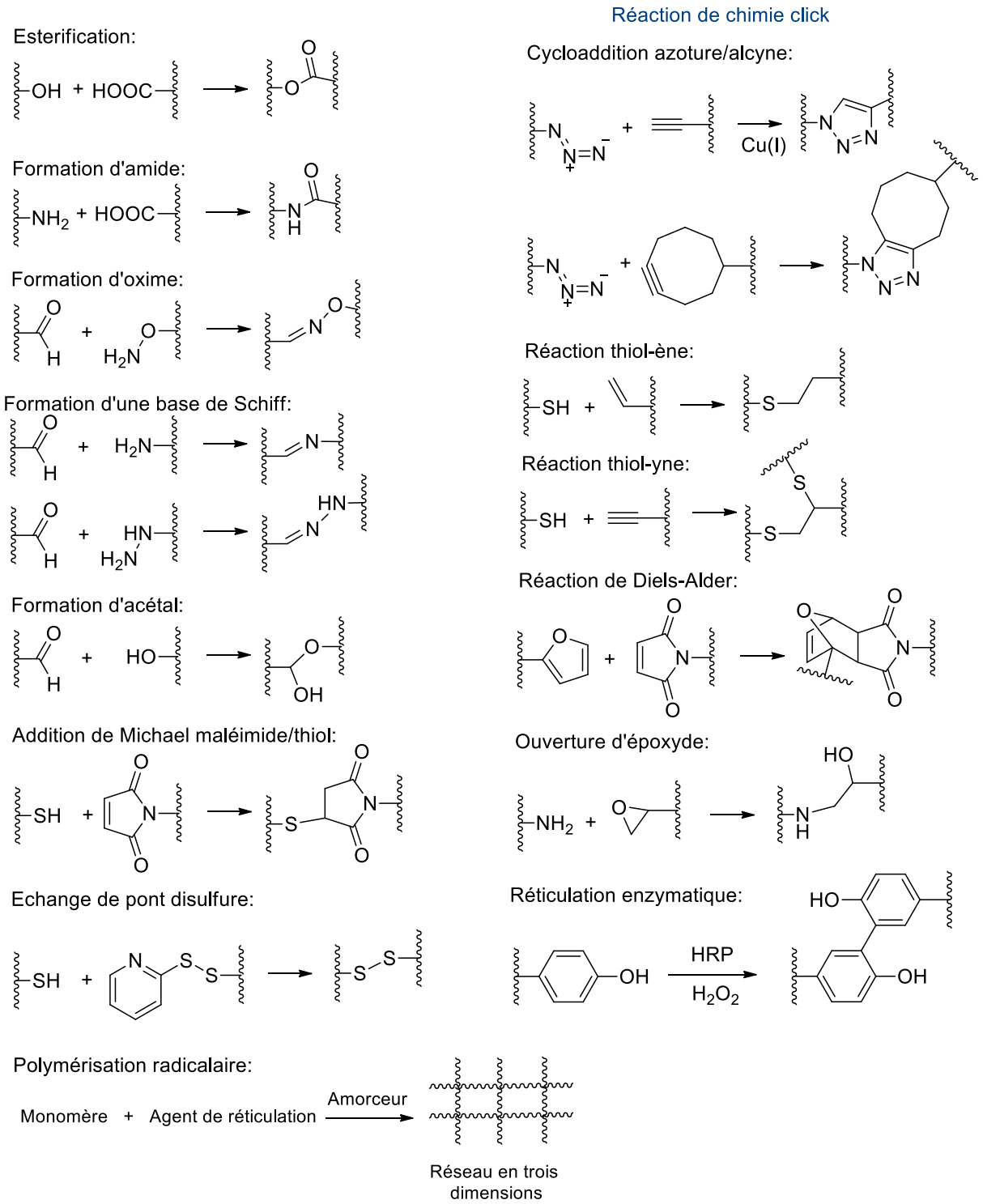


Figure 7 : Représentation schématisée des réactions utilisées pour la formation d'hydrogels chimiques. Schéma inspiré de [16]. HRP : peroxydase de raifort

La réaction de Diels-Alder permet la synthèse d'hydrogels en l'absence de catalyseur. Elle met en jeu un diène et un diénophile qui réagissent pour former un cyclohexène substitué. La réaction de Diels-Alder a servi à la formation d'hydrogels à base d'AH dont elle permet de

contrôler les propriétés mécaniques et de dégradation[64]. Elle a cependant l'inconvénient d'être une réaction plutôt lente et donc inadaptée pour certaines applications comme la formation de gels *in situ.* Les réactions thiol-ène durant lesquelles un thiol et un alcène réagissent pour former un thioéther, sont également largement exploitées comme stratégie de synthèse d'hydrogels. Ces réactions peuvent fonctionner selon différents mécanismes : par additions radicalaires successives ou par additions de Michael catalysées par une base ou un nucléophile. La réaction de Michael « maléimide/thiol » a été utilisée pour la formation *in situ* d'hydrogel à base de POE et l'encapsulation de cellules[65,66]. Les additions thiol-ène radicalaires sont amorcées par la réaction d'un amorceur sur le groupe thiol qui forme un radical thiyl (RS•). Cette étape peut être activée par la température, la lumière ou par sa décomposition spontanée. La plupart du temps, cependant, cette réaction est photo-amorcée et permet la mise au point de réseaux polymères très uniformes[67].

La réticulation enzymatique est une autre méthode permettant la synthèse d'hydrogels à partir de chaînes polymères dans des conditions douces de synthèse. Des polymères contenant des réactifs comme la tyramine, tyrosine ou dopamine subissent une gélification rapide par oxydation avec le peroxyde d'hydrogène et catalysée par la peroxydase de raifort[68].

Même si certaines liaisons chimiques ont la capacité de se former et de se rompre de manière réversible, comme dans le cas des bases de Schiff et des cycloadditions et rétro-cycloadditions de Diels-Alder furane-maléimide, la majorité des hydrogels chimiques sont formés de façon irréversible.

La création de liaisons covalentes entre des polymères est un moyen très reconnu de former des hydrogels variés avec des propriétés physico-chimiques contrôlées et notamment des propriétés mécaniques relativement importantes. Cependant, une fois formés, ils ne sont souvent plus modulables et leur réponse à des stimuli extérieurs est limitée. De plus, leur formation peut nécessiter la présence de solvants organiques. Pour ces raisons, les hydrogels réticulés chimiquement ne sont pas des matériaux de choix pour l'étude de systèmes biologiques dynamiques. Les hydrogels physiques sont en revanche des matériaux idéaux pour de telles applications.

II.3.2.Hydrogels dynamiques

Certains hydrogels sont préparés par l'intermédiaire de liaisons dynamiques qui peuvent subir des changements structuraux en réponse à un stimuli donné. Dans des conditions précises, ces liaisons peuvent se former ou se rompre tandis que dans d'autres, elles agissent en tant que lien

covalent du gel. Ces gels sont appelés hydrogels dynamiques. La coordination métal-ligand est un exemple de création de points de réticulation réversibles. De nombreuses réactions chimiques permettent également l'obtention d'hydrogels dynamiques.

II.3.2.1.Coordination métal-ligand

Les ligands sont des molécules présentant des atomes riches en électrons et sont capables de se lier à des métaux de transition en leur partageant des électrons provenant d'orbitales non liantes. Lorsque deux ligands ou plus sont incorporés sur une chaîne polymère, il est possible de former des hydrogels supramoléculaires par ajout d'ions métalliques qui se coordinent aux ligands (Figure 8). La coordination métal-ligand peut être réalisée en milieu aqueux et en milieu organique. La stabilité du gel est fortement influencée par les énergies de liaisons entre métal et ligands qui doivent donc être judicieusement choisis[69].

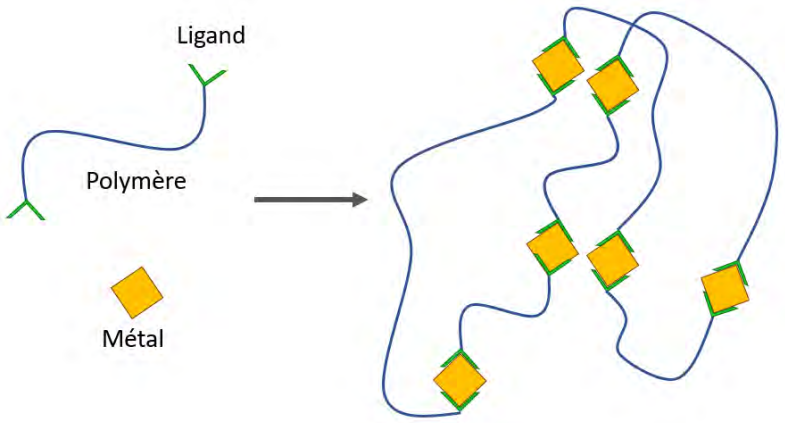


Figure 8 : Schéma de la formation d'hydrogel par coordination métal-ligand.

Schubert *et al.* ont étudié la formation de complexes à base de ligands chélatants terpyridine et la formation d'hydrogels à partir de leurs interactions avec différents ions métalliques. Ils observèrent notamment que l'utilisation de l'ion Ru^{2+} procure à l'hydrogel une stabilité thermique jusqu'à 250 °C alors qu'un gel formé d'ions Fe^{2+} n'est stable que jusqu'à 160 °C[70]. En outre, les complexes de terpyridine avec l'ion Ni^{3+} ne sont pas affectés par un changement de pH alors que les mêmes complexes avec l'ion Zn^{2+} peuvent être facilement dissociés en milieu acide ou basique[70].

Un autre exemple d'hydrogel formé à partir d'interactions métal-ligand résulte du mélange d'acide polyacrylique (PAA) et d'un complexe de citrate de fer(III)[71]. Une fois en contact, les ions Fe^{3+} se lient lentement aux ions carboxylates du PAA pour former un gel. Les ions Fe^{3+} peuvent être réduits s'ils sont exposés à la lumière blanche en présence d'acide citrique. Comme les ions Fe^{2+} ne peuvent pas complexer les ions carboxylates, le gel subit une transition gel-sol

s'il est irradié par de la lumière blanche. Le retour réversible à un état gel est possible par exposition de la solution à de l'oxygène.

Les interactions métal-ligands permettent donc la synthèse d'hydrogels aux propriétés diverses. Ces gels peuvent répondre à des stimuli comme le pH ou la lumière, et parfois de manière réversible.

II.3.2.2.Liaisons chimiques réversibles

Certaines réactions de chimie organique permettent la formation et la destruction de liaisons chimiques covalentes de manière réversible. Perera et Ayres ont recensé en 2020 ces réactions et leur applications au développement d'hydrogels à rigidité contrôlable (Figure 9)[72].

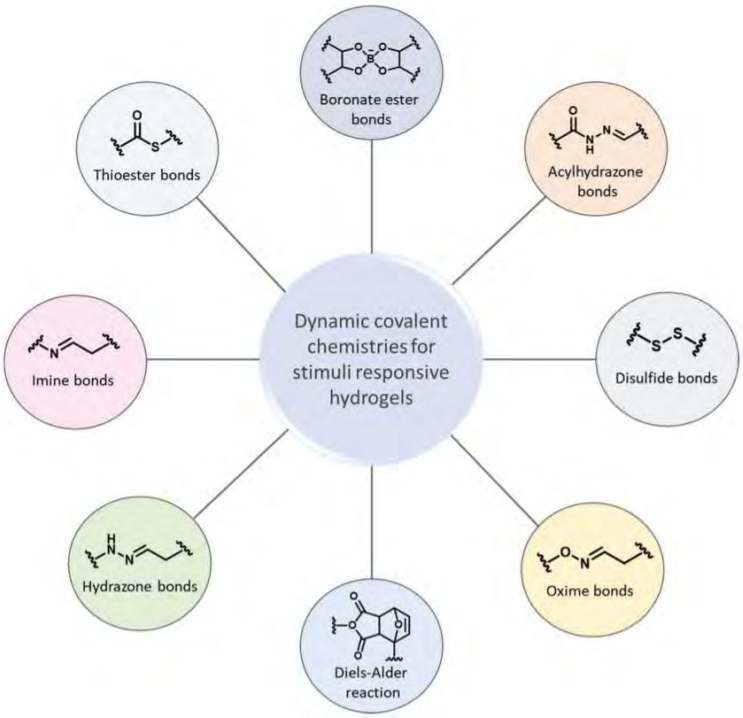


Figure 9 : Liaisons covalentes réversibles utilisées dans la préparation d'hydrogels stimulables. Reproduit depuis Perera et Ayres[72].

La réaction de Diels-Alder est par exemple soumise à un contrôle cinétique et dynamique, la réaction directe s'effectue lorsque $\Delta H > T\Delta S$ et la réaction *retro* lorsque $\Delta H < T\Delta S$. Cette réaction entre un polymère de dextrane modifié avec des fulvènes et un POE dichloro-acide maléique a été utilisée par Chen *et coll.* (Figure 10)[73]. Ce gel a montré d'excellentes propriétés d'auto-réparation dans les conditions physiologiques (pH 7,4 et 37°C). Les auteurs ont évalué la réparation des gels en observant sa capacité à récupérer d'une griffure d'une certaine profondeur. Ils ont trouvé que le gel avait la capacité de se régénérer presque à l'identique, ce qui suggèrent des applications possibles dans le domaine biomédical.

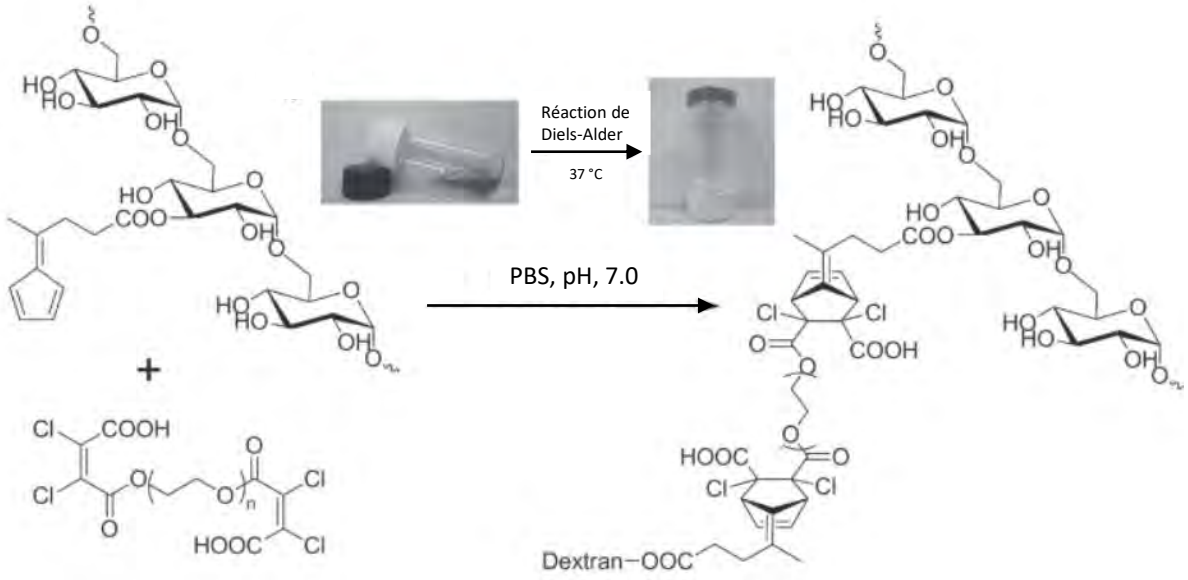


Figure 10 : Structure chimique des hydrogels dynamiques à base de dextrane réticulés par la réaction de Diels-Alder entre des groupes fulvènes et l'acide dichloromaléique. Reproduit depuis[73].

Les liaisons disulfures sont un autre exemple de liaisons dynamiques. Elles proviennent de l'oxydation des thiols. Le même groupe de recherche a développé un gel aux propriétés d'auto-réparation, qui combine des liaisons disulfures et acrylhydrazones (Figure 11)[74]. Dans un environnement basique, ces gels peuvent se réparer par échange de ponts disulfures. Ce processus est réversible sur plusieurs cycles. Les liaisons acrylhydrazones permettent d'activer le caractère autoréparant en conditions acides et d'obtenir un gel répondant au changement de pH.

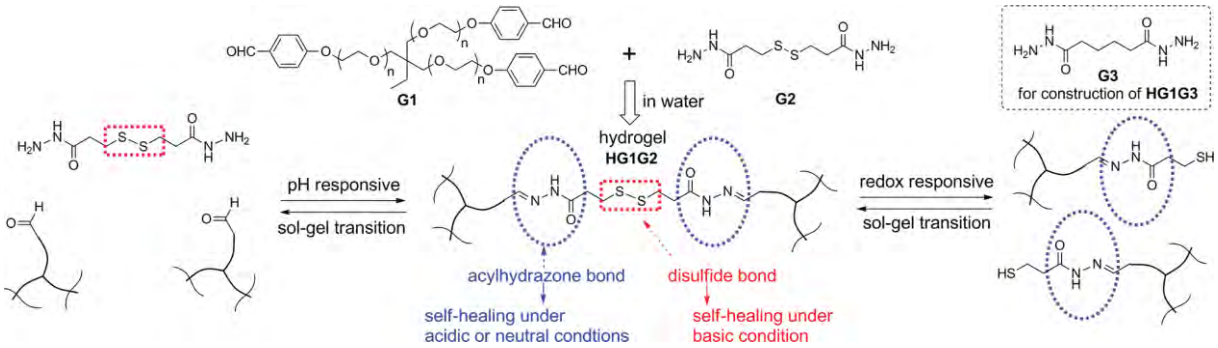


Figure 11 : Stratégie de construction d'un hydrogel dynamique capable de s'autoréparer en fonction du pH. Reproduit depuis[74].

Les hydrogels dynamiques ont de très bonnes propriétés d'autoréparation et sont de bons candidats pour le domaine du biomédical en tant que support pour la régénérescence d'organes ou la délivrance de principes actifs contrôlée. Leur réponse est cependant soumise à de nombreux facteurs extérieurs et l'ajustement de leurs propriétés peuvent en faire des systèmes

complexes. Les gels physiques offrent une alternative dont les propriétés sont facilement ajustables et réversibles en fonction de très nombreux stimuli tels que la température, le pH, la lumière ou la force ionique.

II.3.3.Hydrogels physiques : mécanismes de formation

Les hydrogels dits physiques sont caractérises par des nœuds de réticulation non permanents. Ils sont formés au-delà d'une concentration critique, à partir de laquelle les chaînes de polymères quittent le régime dilué et interagissent entre elles. La formation de gel est donc guidée par l'enchevêtrement des chaînes de polymères, souvent favorisé par des interactions faibles qui assurent la cohérence du réseau en trois dimensions. Les interactions impliquées dans la formation de gels physiques sont essentiellement les liaisons hydrogène, les interactions de van der Waals et les interactions ioniques.

II.3.3.1.Liaisons hydrogène

Les liaisons hydrogène proviennent d'interactions électrostatiques de type dipôle/dipôle induit. Elles se forment si un atome d'hydrogène est lié de façon covalente à un atome fortement électronégatif. Dans ce cas, l'hydrogène porte une fraction de charge positive et peut donc être attiré par un autre atome riche en électron. Les liaisons hydrogènes sont directionnelles, leur énergie d'interaction est de l'ordre de 10 à 50 kJ.mol^{-1} et elles représentent la principale force motrice des assemblages biomoléculaires. Elles assurent par exemple la stabilité de l'acide désoxyribonucléique (ADN) sous sa forme de double hélice au travers de liens reliant deux nucléotides par paires[75] (Figure 12) et peuvent être exploitées pour la formation d'hydrogels physiques.

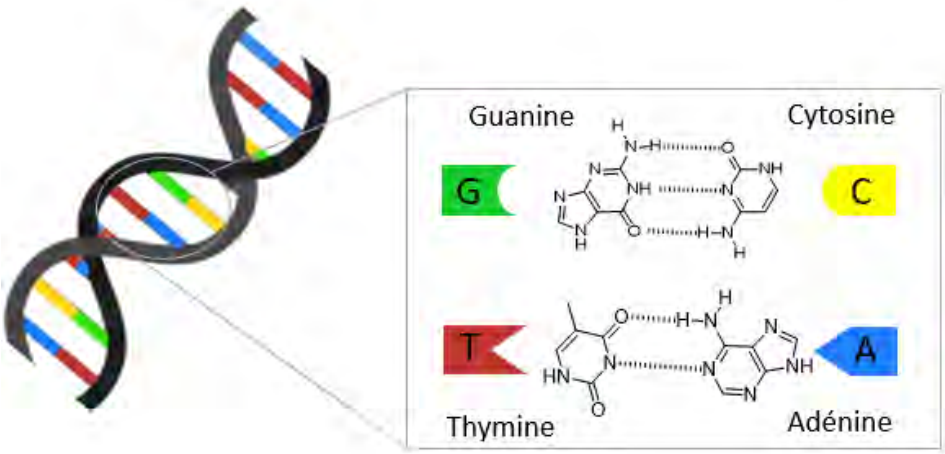


Figure 12 : Représentation schématique de l'ADN et des liaisons hydrogène (tirets) présentes entre les couples de bases nucléiques A/T et G/C.

Le groupe de Meijer a développé une structure uréidopyrimidone dont les unités forment des dimères via quatre liaisons hydrogène[76] (Figure 13a.). Formés à partir d'un poly(oxyde de propylène-co-oxyde d'éthylène) de faible masse molaire porteur de trois -OH terminaux (Figure 13b.), ces dimères sont utilisés dans la formation d'hydrogels physiques. Le polymère synthétisé est formé d'un réseau créé par des liaisons hydrogène réversibles et il possède des propriétés viscoélastiques. De plus, la constante de dimérisation est assez élevée pour permettre l'obtention de matériaux possédant des propriétés mécaniques plus satisfaisantes que celles des précédents gels physiques développés.

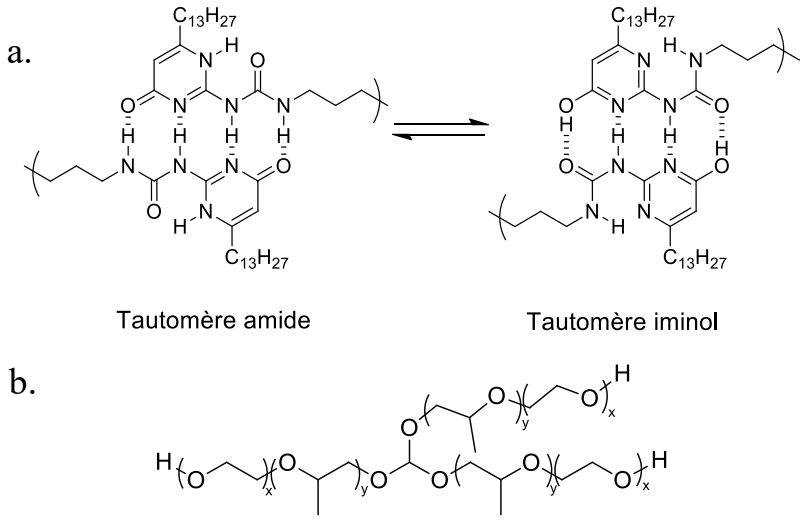


Figure 13 : a. Représentation schématique des formes tautomères de dimère uréidopyrimidone contenant quatre liaisons hydrogène développées par Lange et al.[76]. b. Formule du poly(oxyde de propylène-co-oxyde d'éthylène) utilisé après réaction avec un diisocyanate puis avec une isocytosine pour former des gels à partir des dimères uréidopyrimidone[76].

Ces dimères, greffés sur un squelette à base de POE, ont été utilisés par le même groupe pour la mise au point d'un gel réversible en solution aqueuse via un changement de pH[77]. L'hydrogel ne se forme que pour des pH <8,5 car les dimères sont solidement associés par quatre liaisons hydrogène. Par contre, lorsque le pH est supérieur à 8,5, le polymère est à l'état liquide car la déprotonation des phénols du tautomère iminol (Figure 13) conduit à la dissociation des dimères. La rapidité de ces transitions sol-gel fait de ce gel un matériau idéal pour des applications nécessitant une injection au travers d'un cathéter.

II.3.3.2.Interactions ioniques

Certains hydrogels sont formés par l'intermédiaire d'interactions ioniques. C'est le cas des polymères chargés ou polyélectrolytes, qui, mélangés avec des charges opposées, portées par des ions ou autre polymère, conduisent à la formation d'un gel. C'est le cas de l'alginate par

exemple, qui, comme déjà mentionné, peut former un hydrogel en présence de cations divalents[37] (Figure 14a.). De même, le chitosane, polymère biosourcé et chargé positivement, a la capacité de former des hydrogels par mélange avec des ions ou molécules chargés négativement[78].

Dans un autre exemple, Hunt *et coll.* décrivent la formation d'un hydrogel physique à partir du mélange de deux copolymères triblocs solubles dans l'eau de type ABA et de charges opposées. Le bloc A représente le bloc chargé, il s'agit d'un polyanion pour une partie des polymères et d'un polycation pour l'autre partie, tandis que le bloc B représente un polymère hydrosoluble, POE par exemple[79] (Figure 14b.). L'association des blocs ioniques de charges opposées forme des régions denses en polymère chargé appelées coacervats. Ces coacervats jouent le rôle des nœuds de réticulation d'un hydrogel physique et forment un réseau en trois dimensions. Plusieurs polymères ioniques ne différant que par la nature du bloc A, ont été testés pour la synthèse de gels. Les auteurs ont ainsi pu observer que les propriétés mécaniques du matériau final dépendaient beaucoup des pKa des acides conjugués des polyions. Les gels formés à partir de groupes ioniques faibles (ammoniums et carboxylates) sont visqueux alors que ceux provenant du mélange de groupes ioniques plus forts (sulfonates et guanidiniums) sont plus stables et montrent un comportement élastique. Ces hydrogels basés sur la formation de coacervats ont plusieurs avantages : ils ne nécessitent pas l'utilisation de solvants organiques, leur synthèse est très modulable, les interactions ioniques sont efficaces et spécifiques, leurs propriétés mécaniques peuvent être contrôlées par la concentration en polymère, le pH et l'addition de sels. De plus, ces gels se forment très rapidement, à température ambiante sur simple mélange de deux polymères en faibles concentrations (3-5 % massique).

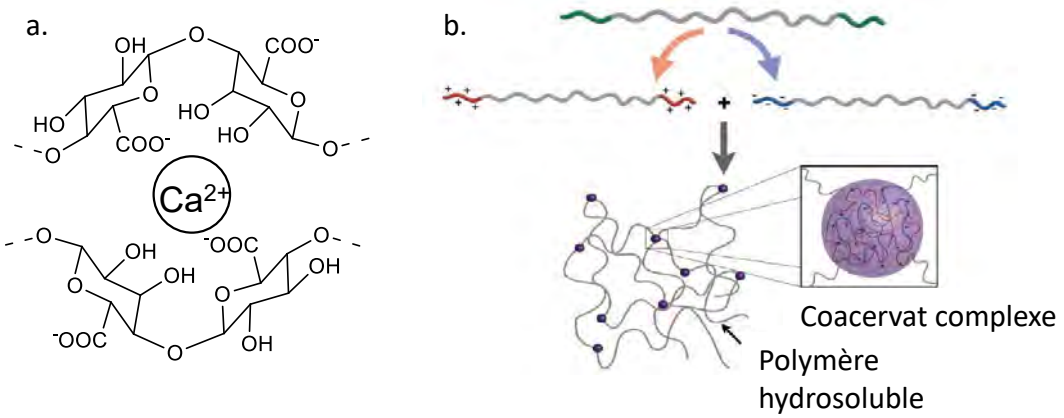


Figure 14: Représentation schématique d'hydrogels construits à partir d'interactions ioniques entre a. l'alginate et les ions calcium et b. polyanions et polycations formant des coacervats. b. Image reproduite d'après [79].

Un autre avantage plus général à l'utilisation d'hydrogels construits avec des polymères chargés est la facilité à les dissocier en ajoutant des sels qui font écran aux interactions ioniques. Ainsi, il est possible de dissoudre ces réseaux en trois dimensions afin de pouvoir les regélifier aisément[80].

II.3.4.Hydrogels physiques : matériaux stimulables

Les hydrogels physiques peuvent subir une transition sol-gel en fonctions des interactions que subissent les chaînes de polymères. Ces interactions peuvent provenir de l'auto agrégation entre des chaînes, la présence de stéréo-complexation ou de complexation hôte-invité entre molécules. Des conditions telles que la température, la lumière ou le pH sont responsables des transitions de phase des hydrogels physiques. Cette partie décrit le fonctionnement et stratégies de synthèse d'hydrogels physiques répondant à des stimuli extérieurs. Les forces non covalentes qui régissent ces gels sont, la plupart du temps, réversibles et représentent des outils essentiels à l'apport de dynamisme au sein d'un hydrogel.

II.3.4.1.Formation d'un gel par stimulus thermique

Certains polymères ont la capacité de former des gels lorsqu'un changement de température engendre l'organisation de leurs chaines de telle façon qu'elles forment un réseau organisé en trois dimensions. Ces polymères sont alors dits thermosensibles, c'est-à-dire qu'ils subissent des changements, de solubilité ou des transitions de phase, en réponse à la température de leur environnement. C'est le cas de l'alcool polyvinylique (PVA), qui peut être réticulé physiquement par application de cycles de congélation/décongélation successifs[81]. En effet, ces cycles répétés forment des cristallites, dont le nombre et la stabilité augmentent avec le nombre de cycles appliqués. Cela engendre finalement la formation d'un hydrogel très élastique et stable à température ambiante[82].

Le poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM) est le plus populaire des polymères thermosensibles et il a fait l'objet d'une étude conséquente par Schild[83]. En solution aqueuse, il peut subir une transition de phase réversible lorsque la température passe au-dessus de 32 °C[84]. Ce phénomène est appelé LCST pour « lower critical solution temperature » (température de solution critique inférieure). Cette température critique dépend de nombreux paramètres : la structure chimique du polymère, la masse molaire du polymère, la présence de sels en solutions. La LCST n'existe qu'au-delà d'une concentration critique pour laquelle les chaînes peuvent s'enchevêtrer. L'augmentation de la température détruit les interactions faibles

entre chaînes voisines et conduit à la précipitation de ces portions devenues insolubles. La LCST du PNIPAM varie entre 30 et 35 °C. Ce polymère a été largement étudié pour réaliser des polymères thermosensibles à LCST contrôlée. En effet, sa copolymérisation avec des monomères hydrophiles, permet d'augmenter la LCST tandis que l'ajout de parties hydrophobes l'abaisse[85]. Yin et Cheng développèrent des hydrogels mixtes de PNIPAM et de POE. Ces gels sont formés soit par réticulation physique soit par agrégation micellaire en fonction de la nature du copolymère et sont utilisés en tant qu'hydrogels injectables. Le NIPAM a été également copolymérisé avec l'AH afin d'obtenir des polymères thermosensibles et biocompatibles[86] pour le domaine biomédical.

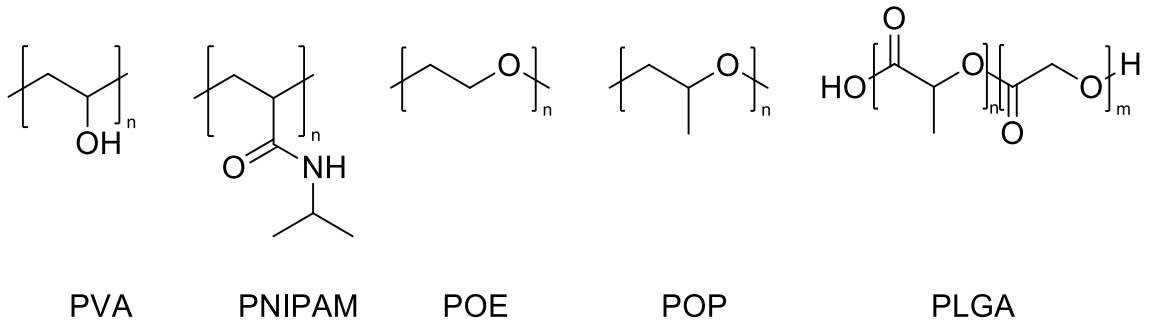


Figure 15: Représentation de polymères thermosensibles ou utilisés pour la synthèse de polymère thermosensibles.

Le POE est aussi bien connu pour ses propriétés thermosensibles et sa LCST. Il est notamment utilisé en copolymérisation avec le poly(oxyde de propylène) (POP) sous forme de polymère tribloc POE-POP-POE (Pluronic®) pour des applications médicales[87]. Un polymère POE–PLGA–POE où PLGA est le poly(acide lactique-*co*-glycolique) forme un hydrogel biodégradable dont la formation a lieu à la température du corps[88].

II.3.4.2.Stéréo-complexation

Le terme « stéréo-complexation » décrit le phénomène d'association stéréosélective intervenant entre des polymères de différentes tacticités et primant sur une interaction entre polymères de même tacticité [89,90]. Un exemple bien connu de stéréo-complexation est celle entre le PMMA isotactique et syndiotactique découverte par Fox *et coll.* en 1958[91]. De même, le mélange de solutions de poly(acide L-lactique) (PLLA) et poly(acide D-lactique) (PDLA) conduit à la formation d'hydrogels biocompatibles et biodégradables lorsque la concentration d'espèce en solution dépasse la concentration critique de formation de gel. Les deux stéréoisomères s'associent en forme d'hélice favorisée par les interactions de Van der Waals. Dans le but de délivrer des gènes, Liu *et coll.* ont développé des hydrogels par stéréo-complexation composés

de micelles de polymères triblocs PLLA-POE-PLLA et PDLA-POE-PDLA[92]. Les micelles de PLLA-POE-PLLA (P1) contiennent un polymère PLA-PEI-PLA (P2) et de l'ADN. Le poly(éthylène imine) (PEI) est un polymère cationique utilisé pour condenser l'ADN (Figure 16). La température de la transition sol-gel peut être ajustée en fonction de la concentration en polymères, de leurs masses molaires et du ratio P1/P2. Ces gels peuvent donc être chargés avec de l'ADN puis se dissocier facilement en milieu acide, ils sont ainsi adaptés à l'injection et à la délivrance de gènes.

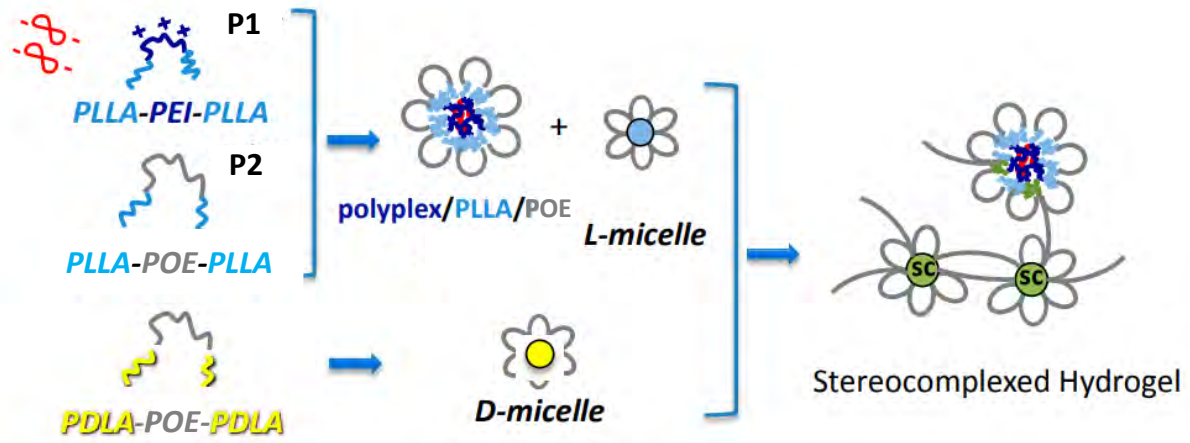


Figure 16: Schéma de formation d'un hydrogel stéréo-complexé à partir de micelles de PLA-POE-PLA pour la délivrance de gènes. Image reproduite depuis [92].

II.3.5.Interactions hôte/invité

Les interactions hôte/invité mettent en jeu une molécule dite « hôte » qui possède une cavité et une molécule dite « invitée » pour laquelle il est thermodynamiquement favorable de s'insérer dans la cavité de l'hôte. Les molécules hôtes les plus utilisées sont les cyclodextrines (CDs)[93,94], les cucurbituriles (CB[n])[95] et les éthers couronnes[96] (Figure 17). Les forces de Van der Waals jouent un rôle important dans la stabilité des complexes hôte/invité. Il arrive que les liaisons hydrogène ou la tension de cycle soient aussi impliquées dans ce type de complexation[16].

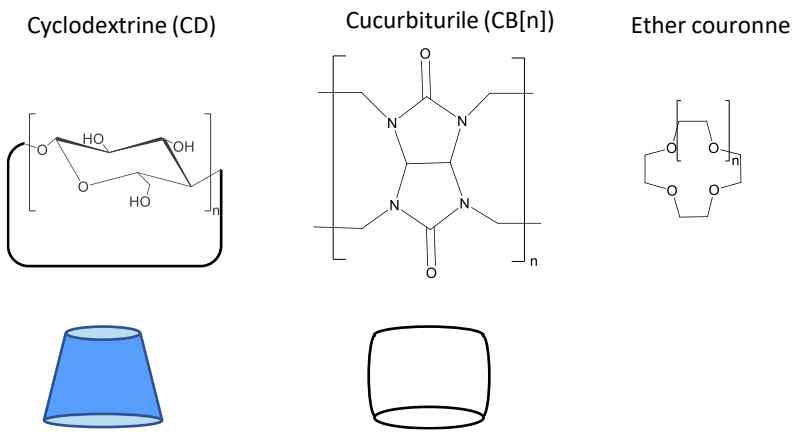


Figure 17: Structures et représentations schématiques des molécules hôtes les plus communes.

De même que les interactions métal-ligands, la complexation hôte/invité peut être utilisée pour la synthèse d'hydrogels. Ainsi, Appel *et coll.* développèrent un hydrogel réversible basé sur la complexation de deux molécules invitées, le viologène et le 2-naphtol, par le CB[8][97]. Ces deux molécules, au préalable fonctionnalisées avec une unité monomère, sont polymérisées puis mélangées à une solution de cucurbiturile (Figure 18a.). La large cavité du CB[8] a la capacité d'accueillir les deux molécules invitées en un complexe 1:1:1 ce qui génère la formation de l'hydrogel. Cet hydrogel possède de meilleures propriétés mécaniques que celles des gels formés par des interactions hôte/invité précédemment développés (module de plateau : 350-600 Pa et viscosité à cisaillement nul : 55 Pa.s) et peut être déstructuré par traitement thermique.

Le groupe de Ritter a développé des hydrogels à partir d'adamantane fixé sur différents squelettes polyacrylamide et de dimères de β-cyclodextrine (β-CD)[98]. Le motif adamantane est fortement hydrophobe et s'insère avec une forte affinité dans la cavité hydrophobe de la β-CD[93]. Harada *et coll.* ont également utilisé des complexes d'adamantane et β-CD pour préparer des hydrogels hautement élastiques[99]. Dans cet exemple, les deux molécules, hôte et invitée, sont fonctionnalisées avec un motif acrylamide, puis mélangées pour former un complexe supramoléculaire. Les complexes sont ensuite polymérisés pour former un hydrogel (Figure 18b.). L'inclusion de l'adamantane dans la cavité de la cyclodextrine agit comme un agent de réticulation supramoléculaire maintenant la structure 3D. Les cyclodextrines peuvent, en général, complexer de nombreuses molécules photochromes[100], dont l'azobenzène. Le cas des complexes azobenzène/cyclodextrine sera détaillé par la suite.

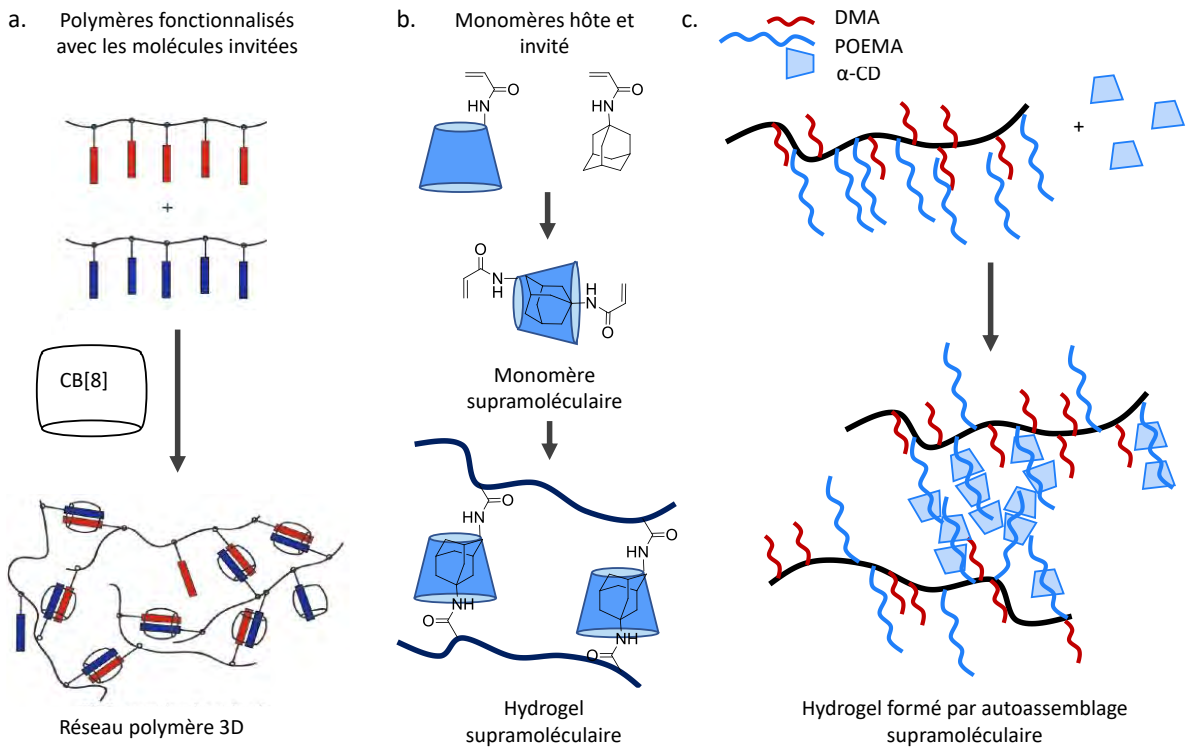


Figure 18: Stratégies employées pour la synthèse d'hydrogel à partir d'interactions hôte/invité supramoléculaires. a. Images reproduites d'après Appel *et coll.*[97].

En plus des petites molécules, les cyclodextrines peuvent complexer de longues chaînes alcanes hydrophobes, mais aussi des polymères hydrosolubles comme le POE. Ren *et coll.* ont utilisé le complexe entre la α-cyclodextrine (α-CD) et un copolymère poly[poly(oxyde d'éthylènre) méthyl éther méthacrylate]-co-poly[2-(diméthylamino)éthylméthacrylate] (PPOEMA-co-PDMA) en solution dans l'eau pour synthétiser des hydrogels sensibles à la température et au pH[101]. A température ambiante et à pH>7, les chaines pendantes de POE sont complexées par l'α-cyclodextrine[102]. La gélification provient de l'autoassemblage supramoléculaire entre les chaînes de POE complexées et les molécules de cyclodextrine (Figure 18c.). En milieu acide, l'amine tertiaire des branches DMA est sous sa forme protonée ce qui a pour effet de déstructurer l'hydrogel et de faire revenir le système à un état sol. L'assemblage est également thermosensible à pH fixé. Ces deux stimuli peuvent modifier l'état du système de manière réversible permettant un contrôle des propriétés de l'hydrogel.

L'exploitation de liaisons non covalentes pour la création de matériaux stimulables étend considérablement le champ d'application des hydrogels, notamment au domaine médical. En effet, la possibilité de dissocier des hydrogels par l'intermédiaire d'un changement de température ou de pH permet d'envisager d'utiliser de tels matériaux pour des applications thérapeutiques au contact de tissus vivants. Pour exercer un contrôle encore plus pointu sur ces

architectures, il est possible d'y incorporer des briques répondant spécifiquement à des stimuli comme le pH, la température, la lumière, le champ électrique ou les contraintes mécaniques. Mohamed *et coll.* décrivent dans une revue les stratégies d'obtention et de fabrication d'hydrogels stimulables pour la manipulation du vivant[16]. De tous les stimuli étudiés, la lumière visible s'impose comme un stimulus non invasif pertinent pour activer des systèmes à l'interface de la biologie. C'est la raison pour laquelle la recherche autour de nouveaux matériaux répondant à la lumière est particulièrement active actuellement.

III.Molécules photo-sensibles et photo-commutables

La lumière visible est un stimulus non invasif, cytocompatible, qui peut être appliqué très localement, par l'intermédiaire d'un laser par exemple, avec une intensité et une longueur d'onde parfaitement contrôlables. L'utilisation de monomères photo-sensibles ou l'insertion de molécules photo-commutables sur les squelettes polymères permet le développement de systèmes photo-sensibles. Cependant, beaucoup de ces systèmes répondent en partie, ou de façon plus efficace à la lumière ultraviolette (UV), toxique pour les cellules. Cette partie liste les molécules photo-sensibles les plus étudiées et les stratégies utilisées pour obtenir des molécules sensibles sélectivement et efficacement à la lumière visible.

III.1. Définition et intérêt

Les molécules photo-commutables sont des molécules qui ont la capacité de subir une isomérisation réversible sous l'action de la lumière. De nombreux composés ont déjà été remarqués pour leurs propriétés photo-sensibles tels que les spiropyranes, les stilbènes, les azobenzènes (AZOs), ou encore les diaryléthènes (DAEs)[103] (Figure 19). De tels composés offrent d'innombrables possibilités d'applications notamment dans le domaine de la science des matériaux[104] et de la biologie[105].

Dès la fin des années 1960, Erlanger *et coll*. ont développé des ligands azobenzène pour le récepteur de l'acétylcholine. Grâce à la grande différence d'activité entre les isomères *cis* et *trans*, il a été possible de réguler la différence de potentiel de la membrane[106]. Plus récemment, de nombreux photoinhibiteurs de l'acétylcholinestérase ont été développés pour la pharmacologie[107].

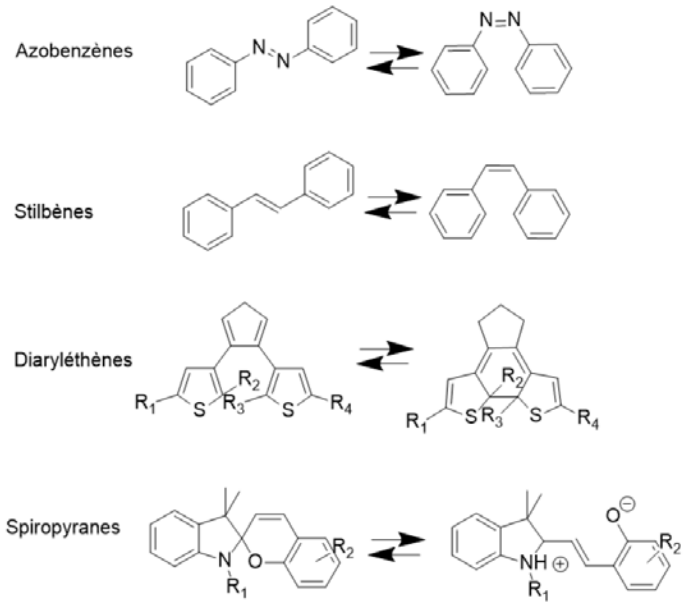


Figure 19: Exemples de systèmes stimulables par lumière UV ou visible.

C'est dans le cadre de ce deuxième champ d'application que la recherche s'est concentrée autour de composés répondant à la lumière visible et proche infrarouge (NIR) plutôt qu'aux UVs. En effet, les molécules mentionnées précédemment ne s'isomérisent que sous irradiation UV dans au moins un sens. Par exemple l'azobenzène passe de la forme *trans* à la forme *cis*, découverte par Hartley en 1937[108], lorsqu'il est éclairé par un rayonnement UV. Bien qu'elles soient efficaces, ces irradiations dans l'UV peuvent endommager les systèmes biologiques et ne pénètrent que partiellement dans les tissus [7].

La stabilité de ces isomères est aussi un point particulièrement étudié. L'obtention d'un système bimodal stable n'est pas si aisé puisque l'un des deux isomères est toujours instable thermiquement et a donc tendance à se transformer en sa forme la plus stable, parfois en des temps de l'ordre de la microseconde. La littérature recense donc de nombreux systèmes permettant des transformations sous lumière visible dans les deux sens et dont les deux isomères sont stables dans le temps.

III.2.L'azobenzène

La découverte de l'azobenzène date du milieu du XIX siècle[109]. À la suite de celle-ci, il a été un composé d'importance dans l'industrie des colorants synthétiques. Ce n'est qu'après la découverte et l'isolement de son isomère *cis* par Hartley que l'azobenzène a été largement étudié pour ses propriétés photochimiques. La Figure 20a.[110] montre les spectres des deux formes de l'azobenzène[111]. L'isomère *trans* possède une forte bande d'absorption $\pi \rightarrow \pi^*$ vers

320 nm et une faible bande n→π* vers 440 nm. Cette deuxième transition est de faible intensité car interdite par des considérations de symétrie[112]. L'isomère *cis* absorbe beaucoup moins dans l'UV. Il a des longueurs d'onde maximales un peu différentes, 280 et 250 nm. En revanche, il absorbe de façon plus importante à 440 nm car la modification de sa symétrie par rapport au trans facilite la transition n→π*. Malgré un léger déplacement hypsochrome pour la forme *cis*, les deux spectres se chevauchent en grande partie.

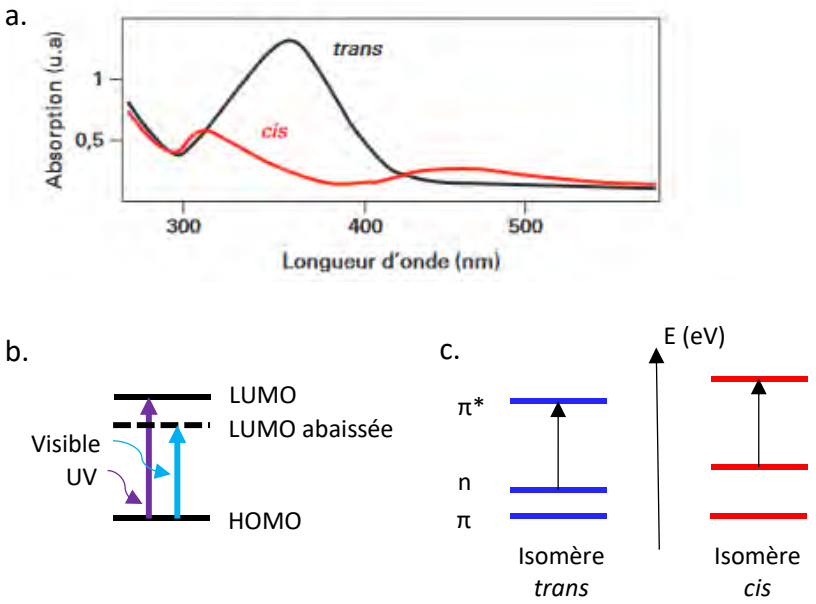


Figure 20: a. Spectre d'absorption des isomères cis (rouge) et trans (noir). b. Diagramme énergétique de la transition HOMO/LUMO d'un composé photoswitch. c. Diagramme énergétique des orbitales π, n et π* de l'azobenzène.

L'AZO *trans* est plus stable thermodynamiquement que l'AZO *cis*[113]. Il est plan avec un moment dipolaire quasi nul. La forme *cis* adopte une conformation dans laquelle l'angle de torsion entre les phényles vaut environ 55°, son moment dipolaire vaut 3 Debye, elle est donc plus polaire que son isomère[114,115].

Dans le cas des AZOs, les transitions nécessitant des photons de hautes énergies impliquent les orbitales π en tant qu'HOMO (« highest occupied molecular orbital » pour orbitale moléculaire occupée la plus haute) et π* en tant que LUMO (« lowest unoccupied molecular orbital » pour orbitale moléculaire la plus basse vacante). Une façon intuitive d'obtenir des systèmes répondant dans le visible serait d'abaisser l'écart d'énergie entre HOMO et LUMO (Figure 20b. et c.). Cependant un problème se pose car l'AZO possède une deuxième transition électronique principale n→π* utilisée pour l'isomérisation retour qui correspond à une irradiation dans le bleu. Lorsque la bande d'absorption de la transition π→π* est décalée vers le rouge, elle risque

de recouvrir celle de la transition n→π*, ce qui ne permet plus une isomérisation sélective du composé[103]. En effet, pour obtenir une isomérisation la plus complète possible, c'est-à-dire un état photo-stationnaire (PSS pour photostationnary state) le plus enrichi possible en isomère souhaité, deux critères sont nécessaires. Premièrement, il faut que chaque isomère absorbe quantitativement la radiation émise c'est-à-dire que son coefficient d'extinction molaire ε_λ pour cette radiation λ soit grand. Deuxièmement, les isomérisations doivent survenir efficacement en présence de lumière, c'est-à-dire avoir des rendements photochimiques φ élevés, de façon à ce que la quantité de lumière requise à l'isomérisation ne soit pas trop grande[114]. Les isomérisations doivent également requérir des énergies bien différentes de telle façon qu'une radiation de longueur d'onde donnée ne provoque qu'une isomérisation et pas la réaction inverse simultanément. Le cas échéant, l'état photo-stationnaire sera un mélange des deux composés.

III.3.Azobenzènes stimulables directement et de façon réversible dans le visible

L'azobenzène est bien connu de la littérature, et son isomérisation réversible l'a rendu populaire dans la conception de nombreux systèmes photo-stimulables. Cependant, la lumière UV, nécessaire à son isomérisation *trans*→*cis*, limite son champ d'application dans le domaine de la biologie. Plusieurs azobenzènes répondant à la lumière visible ont donc été développés au cours de ces quinze dernières années afin de pallier cette limite.

III.3.1.Systèmes à pont C2

En 2009, Siewersten *et coll.* décrivent des azobenzènes contenant un pont C2 (Figure 21) qui permettent l'obtention de photo conversion presque totale grâce à un large espacement entre les bandes d'absorption des transitions π→π* des deux isomères (environ 100 nm)[116]. De plus la tension de cycle qu'impose ce pont rend l'isomère *cis* plus stable que l'isomère *trans* ce qui n'avait encore jamais été observé pour des azobenzènes.

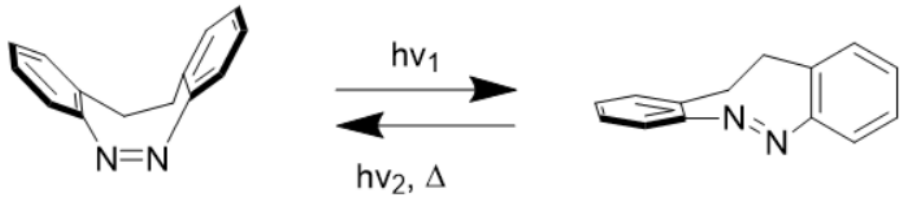


Figure 21: Exemple d'un azobenzène à pont C2 : à gauche la forme cis thermiquement stable, a la possibilité d'être isomérisé en sa forme trans (droite) par absorption d'un photon.

III.3.2.AZO coordinés BF_2

Des composés AZO coordinés BF_2 (Figure 22) ont été développés quelques années plus tard par le groupe d'Aprahamian[117,118]. Ces nouveaux systèmes peuvent être sollicités dans le proche infra-rouge via leur transition π→π* qui est beaucoup plus faible en énergie que dans les systèmes AZO classiques. Cela est d'autant plus intéressant que ces bandes sont bien séparées pour chaque isomère et ne recouvrent pas les transitions n→π*.

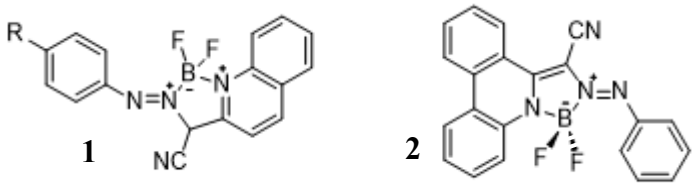


Figure 22: Exemple d'AZO coordinés BF_2.

L'ajout de groupes R donneurs d'électrons à la molécule **1** permet notamment de décaler vers le rouge la longueur maximale d'absorption du composé trans de 35 nm à 160 nm par rapport à la molécule parent (R=H), permettant ainsi l'isomérisation trans→cis sous irradiation dans le proche infra-rouge. La présence de groupes électro-donneur en position *para* augmente de plus la résistance à l'hydrolyse du composé en solution[117]. Plus particulièrement, le composé *cis* est beaucoup moins sensible à l'hydrolyse que son isomère. Cependant, plus les transitions sont décalées vers les hautes longueurs d'onde, moins l'isomère *cis* est stable. La résistance de composés de type **1** à la réduction par le glutathion, présent à l'intérieur des cellules, a été prouvée élevée[117]. La molécule **2** a été développée par le même groupe quelques années plus tard et a, en plus de sa capacité à s'isomériser lorsqu'elle est stimulée par de la lumière visible, la possibilité de créer des interactions π-π intermoléculaires entre les groupes phénanthridine. Dans ce cas, en fonction de la concentration, la présence d'agrégats peut apparaître et celle-ci influence grandement la cinétique d'isomérisation *cis* → *trans*. La stabilité de la forme *cis* de ce composé peut donc être contrôlée par sa concentration.

III.3.3. AZO porteurs de groupes donneur ou attracteur d'électrons

Beharry *et coll.* développèrent en 2011 un système azobenzène porteur de quatre groupes méthoxy, électro-attracteurs, en position *ortho* de la fonction diazo sur les cycles aromatiques (Figure 23a.)[119]. Dans la configuration *trans*, la proximité des doublets non liants des atomes d'oxygène et d'azote crée des interactions défavorables augmentant l'énergie de l'orbitale n du composé. Ce phénomène tend à augmenter l'écart entre les orbitales n et π* conduisant à un

déplacement vers le rouge de la bande d'absorption correspondante. La bande d'absorption du composé *cis* restant quasiment inchangée, il devient alors plus aisé de stimuler sélectivement et dans le visible chaque forme avec des photons d'énergies adaptées. Cependant, ce composé est sensible à la présence de glutathion. En solution à 1 mM et pH7, il se dégrade rapidement, $t_{1/2}$ ~1.5 h. Ce phénomène est une limite à l'application de cet azobenzène dans des environnements biologiques.

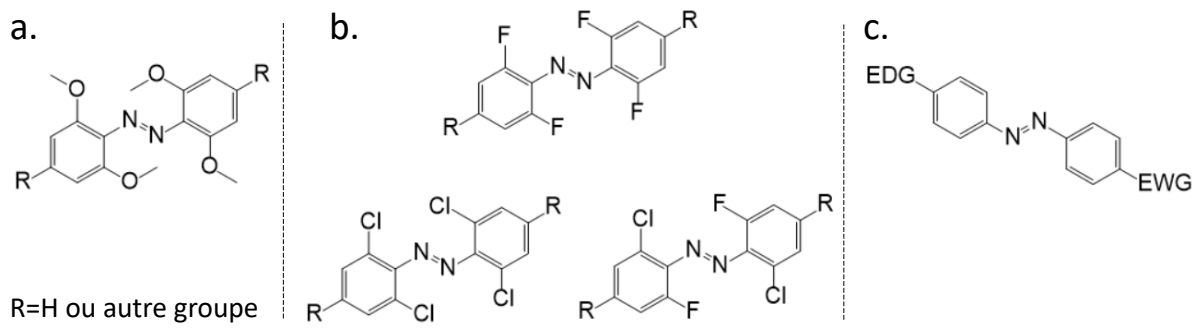


Figure 23: Azobenzènes substitués avec des groupes a. attracteurs d'électrons et b. donneurs d'électrons. c. Push-pull système.

Rapidement après cette découverte, plusieurs groupes se sont intéressés aux composés stimulables par la lumière visible. Le groupe de Hecht développa un azobenzène porteur de quatre atomes de fluor en position ortho (Figure 23b.)[111]. Ces atomes de fluor électro-donneurs stabilisent l'orbitale n du cis en réduisant les répulsions électroniques présentes aux alentours de la double liaison N=N. Ce phénomène augmente l'énergie de la transition n→π* et conduit à un déplacement vers les plus faibles longueurs d'onde de la bande d'absorption correspondante. La forme *cis* de ce composé est exceptionnellement stable, avec un temps de demi-vie d'environ 700 jours à 25 °C[111]. Cette valeur est étonnamment élevée si on la compare à celle des azobenzènes à pont C2 qui vaut environ 5h[116] et à celle des azobenzènes développés par le groupe de G. A. Woolley, d'environ 14 jours[119]. L'ajout de groupes attracteurs d'électrons de type dérivés d'acide carboxylique en *para* des benzènes permet d'atteindre une séparation maximale de 50 nm entre les maxima d'absorbance des bandes n→π* des deux isomères, réduisant cependant la stabilité thermique du *cis*[105]. En 2020, Konrad *et coll.* ont publié une étude détaillant l'influence d'atomes de chlore en position *ortho* sur les propriétés géométriques et photophysiques des azobenzènes, par modélisation informatique[120]. Ils ont montré que la substitution en *ortho* par des chlores plutôt que des fluors décalent les bandes n→π* vers le rouge et conduit à une superposition importante des spectres du *trans* et du *cis* à ce niveau. Ceci

est dû au fait que les nuages électroniques des chlores, plus importants que ceux des fluors, recouvrent partiellement les doublets non liants des azotes. Ce composé ne peut pas être isomérisé sélectivement par de la lumière visible. Par contre, il montre qu'un azobenzène contenant deux fluors et deux chlores en positions *ortho*, comme montré Figure 23b., bénéficie des avantages des deux types de substituants. Ceci permet un décalage de la bande n→π* vers les longueurs d'onde de faibles énergies, permettant son isomérisation sélective grâce à la lumière rouge. Ces résultats mettent en évidence que les différentes substitutions possibles sur les azobenzènes influencent beaucoup leur géométrie et *in fine* leurs propriétés photophysiques. Dans le cadre d'une collaboration pour ce projet de thèse, un dérivé d'azobenzène portant en position *ortho* deux chlores et deux fluors a également été synthétisé par S. Pearson (Leibniz-Institut für Neue Materialien gGmbH, Saarbrücke). Ce dérivé d'AZO est tel que les chlores et les fluors sont chacun d'un côté de la liaison N=N. Ses propriétés photochimiques seront étudiées par la suite afin de déterminer si les substituants choisis favorisent une isomérisation sélective à la lumière visible.

Il est ainsi possible de concevoir des azobenzènes correspondant exactement aux applications désirées. Dans cette optique, des azobenzènes dits « push-pull » ont été développés. Il s'agit d'azobenzènes substitués en *para* par, d'un côté un groupe donneur d'électrons et de l'autre un groupe électroattracteur (Figure 23c.). Comme pour les systèmes BF_2, c'est la bande π→π* qui subit un décalage vers les plus basses fréquences. De la même façon la stabilité de l'isomère *cis* est donc réduite[103], et cela, de façon d'autant plus prononcée si les substituants sont très donneurs ou très attracteurs. Cette absence de stabilité pour l'un des isomères limite donc les champs d'application de ces composés en comparaison avec les azobenzènes substitués en position *ortho*.

III.4.Activation via transfert d'énergie dans le visible

La plupart des molécules photochromes utilisées aujourd'hui répondent à des longueurs d'onde hautes en énergies, du domaine de l'UV. Il est possible de synthétiser à façon des molécules répondant au domaine du visible, cependant les synthèses ne sont pas toujours aisées. Pour pallier ces difficultés, certains groupes ont utilisé des photosensibilisateurs, qui ont la capacité d'absorber de la lumière visible et de la transformer en lumière UV utilisable par les photochromes déjà connus.

III.4.1.Activation de l'état triplet

L'activation par transfert d'énergie repose sur le rôle d'un agent appelé photo-sensibilisateur. Cet agent doit pouvoir absorber un photon d'énergie E_1 et transmettre à la molécule photo-stimulable une énergie différente $E_2>E_1$ qui permettra la réaction photochimique (Figure 24), l'isomérisation dans le cas de l'azobenzène. Ce transfert d'énergie peut se faire de façon inter- ou intramoléculaire en fonction des espèces réactives choisies.

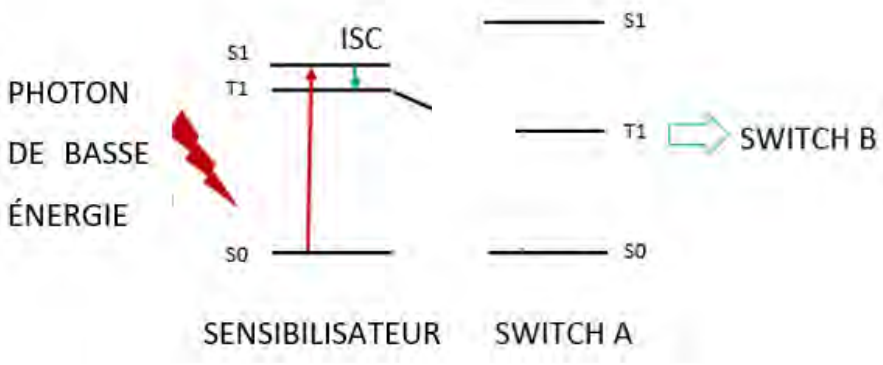


Figure 24: Schéma d'une photoexcitation par activation de l'état triplet (ISC pour inter system crossing).

L'activation de l'état triplet ne peut avoir lieu que si la molécule photo-stimulable a la capacité de s'isomériser via son état triplet T1. Dans ce cas, un photon de faible énergie excite le sensibilisateur dans un état S1 puis dans un état T1 suite à une conversion inter système (ISC). Un premier exemple de cette stratégie d'activation a été décrit par le groupe de L. De Cola où des DAEs sont isomérisés via l'irradiation de bandes caractéristiques de transfert de charge métal-ligand (MLCT pour « metal-to-ligand charge-transfer »)[121]. Dans cet exemple, le DAE est physiquement lié, via des liaisons covalentes, à des ligands bipyridine eux-mêmes complexés à un atome de ruthénium. Plus récemment, Van Leeuwen *et coll.* ont montré qu'il était possible de réaliser l'isomérisation Z→E de dérivés de stilbène grâce à l'état triplet[122].

III.4.2.Transfert d'énergie à des nanoparticules à upconversion (UCNP)

Le phénomène d'upconversion a été découvert dans le milieu des années 1960s par Auzel[123]. Il s'agit d'un procéssus non linéaire qui consiste en l'absorption successive d'un ou plusieurs photons de même énergie puis à la réémission d'un seul photon de plus grande énergie. Des systèmes utilisant l'upconversion pourraient donc servir d'intermédiaire entre un « photoswitch », photochrome qui ne réagit qu'à la lumière UV et une source de lumière visible, comme le suggère la Figure 25.

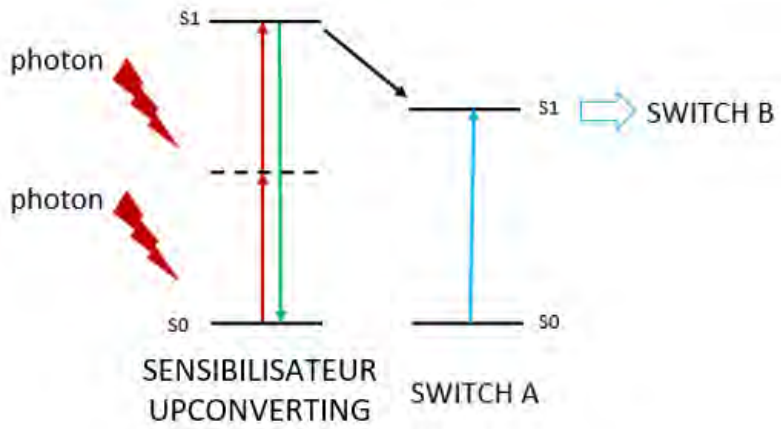


Figure 25: Schéma d'une photoexcitation par le biais d'UCNP permettant le passage d'un « switch » de sa forme A à sa forme B.

N. R. Branda et ses collaborateurs expérimentèrent en 2009 l'isomérisation de DAEs avec de la lumière NIR (980 nm). Ils utilisèrent des nanoparticules nanocristallines $NaYF_4$ dopées avec des ions lanthanides[124], à savoir, soit Tm^{3+} et Yb^{3+} soit Er^{3+} et Yb^{3+} déjà reconnues pour leur efficacité et pertinence en tant que sensibilisateurs pour ce type de molécules photo-sensibles. Ces systèmes n'étaient cependant pas réversibles. Un an plus tard le même groupe développa des UCNPs permettant la réversibilité du système. Celles-ci ont une structure cœur-double écorces dont le cœur est en $NaYF_4$ dopé TmYb, entouré d'une couche de $NaYF_4$ dopé ErYb et d'une enveloppe extérieure de $NaYF_4$ non dopé. Il est particulièrement intéressant de noter que l'énergie de la radiation émise par l'UCNP peut être contrôlée par l'intensité de la radiation à 980 nm[125].

III.4.3.L'absorption multi-photons

Le principe d'absorption bi-photons, ou plus généralement multi-photons, permet d'accéder à des états excités avec des photons de moins grande énergie que la transition considérée. Il s'agit ainsi d'une méthode intéressante dans le but d'activer des composés photochromes avec des longueurs d'onde visibles, proches infra-rouges. La probabilité d'une absorption bi-photon est non linéaire, et varie avec le carré de l'intensité lumineuse émise. Cependant, cette probabilité souvent très faible implique l'utilisation d'émission laser intense pour mettre en œuvre l'absorption bi-photon. C'est pour cette raison que l'excitation bi-photon indirecte d'un photochrome depuis une molécule antenne par transfert d'énergie a été utilisée avec plus d'efficacité et de polyvalence que l'excitation bi-photon directe.

L'absorption de plusieurs photons de basse énergie par un fluorophore peut ainsi être utilisée pour exciter un photochrome qui lui est proche dans l'espace, par transfert non radiatif, comme

le processus FRET (Förster Resonance Energy Transfer). Il s'agit d'un phénomène qui résulte d'interactions dipôle-dipôle entre deux espèces proches dans l'espace, soit mélangées, soit liées de façon covalente entre elles. L'une est donatrice d'énergie ici le fluorophore à deux photons, et l'autre acceptrice, ici la molécule photo-stimulable. Les deux molécules doivent exhiber une compatibilité énergétique, c'est-à-dire que leur spectre d'émission et d'absorption doivent se recouvrir afin que le transfert puisse avoir lieu.

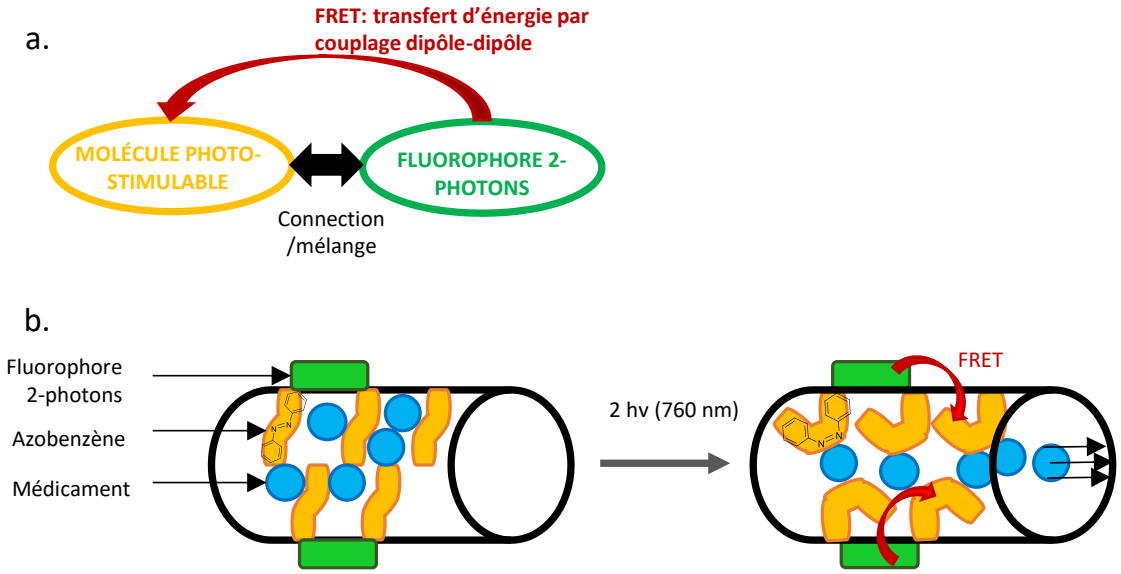


Figure 26: a. Schéma de principe du processus FRET et b. exemple de son utilisation pour la délivrance de principe actif à partir d'AZOs.

Croissant *et coll.* exploitèrent cette technique pour la délivrance de principe actif au niveau de cellules cancéreuses[126]. Ils utilisèrent des nanoparticules de silice nanoporeuses contenant le principe actif piégé par des azobenzènes ainsi qu'un fluorophore (Figure 26). Le fluorophore absorbe la lumière de longueur d'onde 760 nm et émet de la fluorescence à 420 nm ce qui correspond à la bande d'absorption $\pi \rightarrow \pi^*$ de l'azobenzène. Ce dernier s'isomérise et ce faisant, libère le principe actif piégé dans la silice.

III.4.4.Isomérisation par transfert d'électron

L'utilisation de lumière UV peut également être remplacée par un transfert d'électron entre le sensibilisateur et la molécule photo-sensible. Un tel processus a pour intérêt de conduire à l'obtention d'une espèce plus réactive qui sera capable de réagir avec un apport d'énergie moins important, soit une longueur d'onde plus grande.

Cette technique a été utilisée par Kurihara *et coll.* afin de n'utiliser qu'une même longueur d'onde pour isomériser un complexe ferrocène-azobenzène dans les deux sens[127]. La Figure 27

montre comment marche le cycle de photoisomérisation. Le complexe Fe(II)-*trans* peut être isomérisé par absorption d'une radiation à 546 nm pour obtenir un PSS enrichi en *cis*. L'oxydation de ce PSS permet d'obtenir un composé possédant de nouvelles caractéristiques spectrales qui peut alors être complètement isomérisé en complexe trans sous la même irradiation à 546 nm.

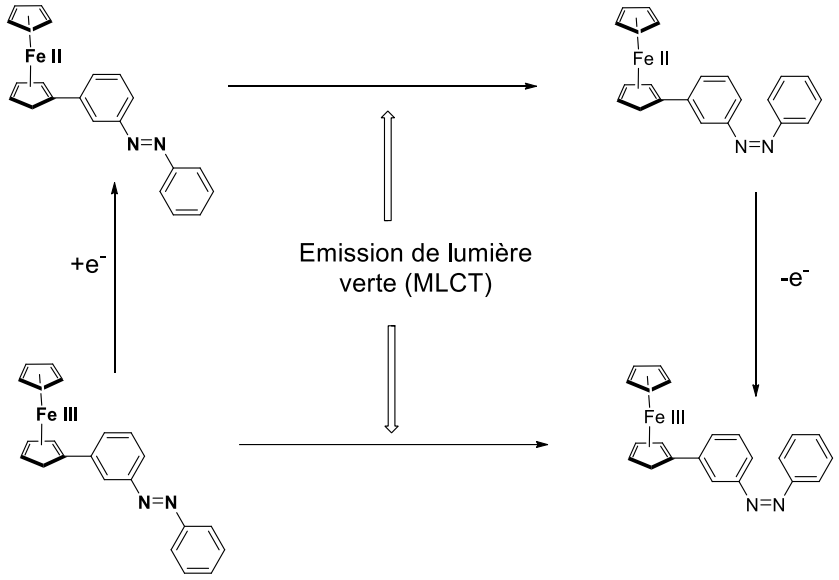


Figure 27 : Schéma d'une isomérisation par transfert d'électron d'un complexe ferrocène-azobenzène.

Il existe de nombreuses voies d'obtention de molécules photo-sensibles répondant dans le domaine du visible. Les AZOs ont l'avantage de pouvoir être fonctionnalisés en différentes positions des benzènes. Ces fonctionnalisations permettent de contrôler les propriétés spectrales du dérivé d'AZO ainsi formé. Les AZOs ont également l'avantage de pouvoir être stabilisés dans leur forme *cis* sur des temps de l'ordre de l'expérimentation. Ils peuvent également être résistant à la réduction par le glutathion, ce qui en fait de bons candidats pour mener des études en milieu biologique. Ce travail se concentrera donc sur l'utilisation de dérivés d'AZO sensibles à la lumière visible pour la synthèse de gels aux propriétés photo-modulables.

IV.Complexes d'inclusion avec les cyclodextrines

Les AZOs ont donc des propriétés chimiques et photophysiques particulièrement intéressantes pour la synthèse d'hydrogels photo-stimulables dans le cadre d'applications à l'étude du vivant. En plus de cela, ils ont la capacité de former des complexes d'inclusion avec les cyclodextrines, molécules hydrosolubles possédant une cavité hydrophobe qui peut accueillir des molécules invitées. De tels complexes ont déjà été utilisés pour la formation d'hydrogels physiques photo-stimulables. Cette partie définit les caractéristiques des cyclodextrines puis des complexes

AZO/CD, depuis leur modélisation à des exemples de complexation de dérivés d'AZO.

IV.1. Les cyclodextrines

Les cyclodextrines (CDs) sont des oligosaccharides cycliques qui proviennent de la digestion enzymatique de l'amidon. Elles ont été découvertes par Antoine Villiers qui a, en 1891, réussi à isoler les produits de dégradation, par la glycosyltransférase de l'amidon[128] . Il en existe trois principales, qui ont chacune un nombre différent d'unité D-glucopyranose. La α-cyclodextrine (α-CD) en contient 6, la β-cyclodextrine (β-CD) 7 et la γ-cyclodextrine (γ-CD) 8 (Figure 28)[129]. Ces unités α-D-glucopyranose, en conformation chaise, sont liées par des liaisons glycosidiques α-(1, 4) formant ainsi une structure torique dont la taille dépend du nombre d'unités glucopyranose[130] (Figure 29). En solution dans l'eau, une cyclodextrine peut être vue comme un cône tronqué.

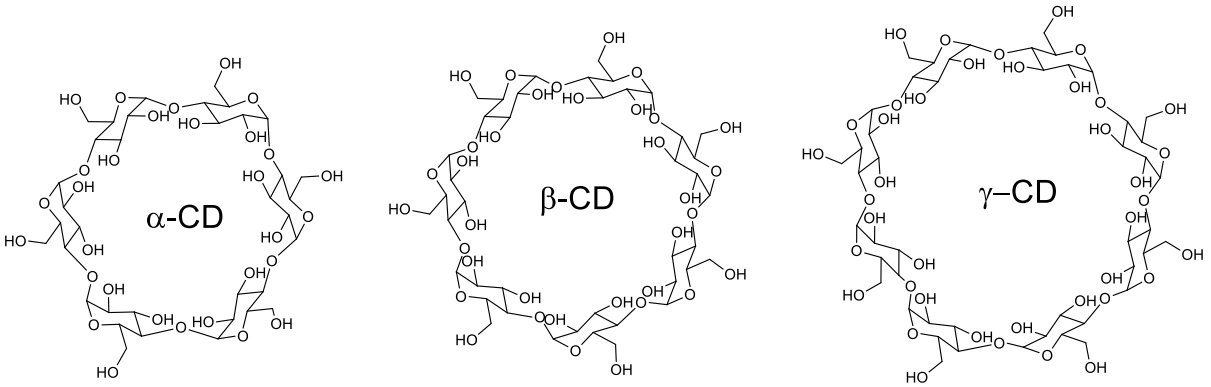
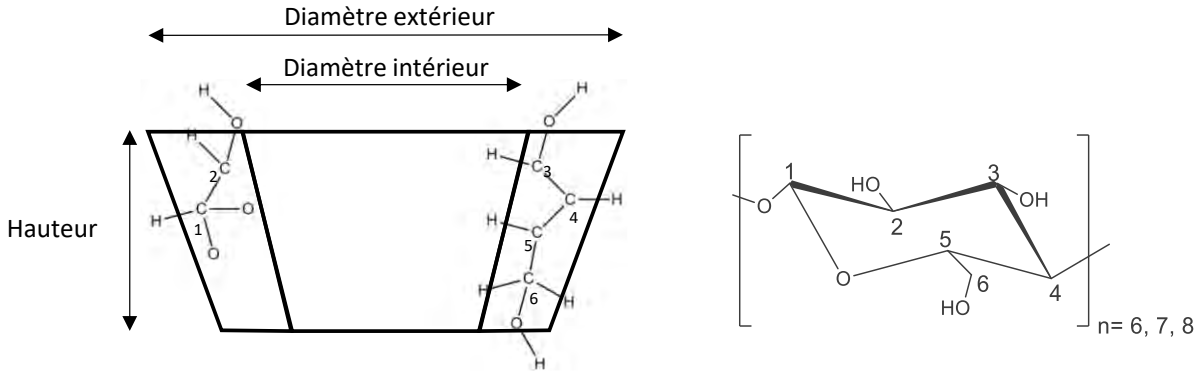


Figure 28: Structure chimique des α-, β-, et γ-cyclodextrines.

La structure des CDs est également caractérisée par la localisation de tous les groupements hydroxyles à l'extérieur de la cavité ce qui rend le composé hydrophile. Plus précisément, les hydroxyles secondaires ($C_{(2)}$-OH et $C_{(3)}$-OH) se situent du côté de la grande ouverture tandis que les hydroxyles primaires ($C_{(6)}$-OH) sont, eux, du côté de la petite ouverture (Figure 29). D'autre part, les atomes d'hydrogène ($C_{(3)}$-H, $C_{(5)}$-H, $C_{(6)}$-H_{ab}) ainsi que les fonctions oxydes d'éther et acétals constituant la cavité interne rendent celle-ci hydrophobe.

Avec leur cavité hydrophobe, les cyclodextrines ont la capacité d'interagir avec de très nombreuses substances. En 1952, F. Cramer a, pour la première fois, mis en évidence la complexation de plusieurs colorants dans la cavité de la β-CD[131]. Les forces motrices de ces complexes d'inclusion sont les interactions de Van der Waals qui se forment entre l'intérieur hydrophobe de la cavité et la molécules hydrophobes invitée, excluant l'eau. Ce phénomène peut être aussi appelé « effet hydrophobe ». De nombreuses autres molécules invitées ont été

étudiées pour leur complexation dans les différentes cyclodextrines[132]. Plus précisément, les CDs sont utilisées pour augmenter la solubilité dans l'eau de molécules organiques hydrophobes telles que certains médicaments. Par exemple, Loftsson *et coll.* développèrent des complexes de dorzolamide dans des dérivés de cyclodextrine pour des formulations de collyres[133]. Les complexes à base de β-CD ont été particulièrement utilisés pour la délivrance d'anti-inflammatoires car elle est peu coûteuse, peut être ingérée facilement et a une bonne affinité pour les anti-inflammatoires[134,69].



	α-CD	β-CD	γ-CD
Hauteur	7.8	7.8	7.8
Diamètre intérieur	5.7	7.8	9.5
Diamètre extérieur	13.7	15.3	16.9

Figure 29: Caractéristiques dimensionnelles des α-, β-, et γ-cyclodextrines et dénomination des atomes sur une unité en conformation chaise. Tailles des cavités données en angström (Å).

Les cyclodextrines sont ainsi largement utilisées dans les domaines pharmaceutiques, dans la délivrance de médicaments, en cosmétique et dans les industries alimentaire et chimique.

IV.2.Modélisation de l'interaction hôte/invité avec l'AZO

L'azobenzène est un composé photochromique hydrophobe qui a donc la possibilité, comme l'adamantane[135,93], le ferrocène[136] et d'autres molécules, de s'introduire dans la cavité des cyclodextrines en formant des complexes appelés hôte/invité.

Il existe dans la littérature de nombreuses études théorisant l'entrée d'une molécule invitée dans la cavité d'un hôte. La théorie fonctionnelle de la densité (DFT) est une méthode de calcul permettant, en théorie, de déterminer la structure électronique exacte d'une molécule par des calculs quantiques. La DFT repose sur l'idée, dérivée des théorèmes de Hohenberg et Kohn, que l'état électronique d'un système peut être entièrement déterminé par la densité électronique

de son état fondamental. Déterminer la structure électronique exacte d'un système moléculaire se résume donc à calculer les énergies des conformations possibles et à trouver celle qui minimise son énergie totale. Di Motta *et coll*. utilisent la DFT pour interpréter des résultats expérimentaux de dichroïsme circulaire et déterminer les propriétés conformationnelles d'un rotaxane dont le composé invité est lié de façon covalente à la molécule hôte (Figure 30A). Ce rotaxane est formé par l'inclusion dans une β-cyclodextrine d'un azobenzène en forme *trans,* lié à un agent fluorescent : le naphthalimide[137]. Les calculs théoriques permettent de repérer la présence de conformations préférentielles, de basse énergie, et de modéliser leurs spectres d'absorption UV-visible et de dichroïsme circulaire.

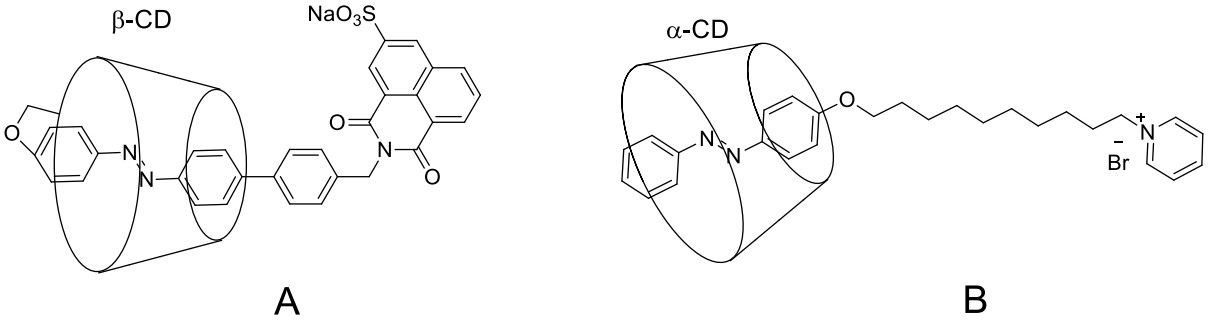


Figure 30: Systèmes étudiés en DFT et DM dans la littérature, (A) est le rotaxane de Di Motta et coll. et (B) est formé d'un bromure de 4-phénoxydécylpyridinium azobenzène et d'une α-CD.

Le désavantage majeur de la DFT est la puissance de calcul nécessaire à sa mise en pratique pour des systèmes de plusieurs dizaines ou centaines d'atomes. L'absence d'accès à un ordinateur puissant engendre donc des temps de calcul accrus. Ceci est encore plus valable pour les calculs d'énergies en présence d'un solvant quelconque. Di Motta *et coll.* ont donc recours à la modélisation en dynamique moléculaire afin d'étudier l'influence de l'eau comme solvant sur la géométrie de leur rotaxane.

La dynamique moléculaire (DM) est une méthode également utilisée pour caractériser les complexes supramoléculaires, qui permet de prévoir les mouvements moléculaires au cours du temps. Cette technique de simulation numérique tient compte des caractéristiques de l'environnement extérieur (température, pression, solvant etc…) et se place dans le cadre de la mécanique newtonienne. Elle est aujourd'hui appliquée à de nombreux domaines comme la science des matériaux, la chimie organique, la biologie pour modéliser des systèmes plus ou moins complexes. Zheng *et coll*. l'utilisèrent par exemple pour étudier le mouvement d'un azobenzène tensioactif (Figure 30B) dans l'α-CD en milieu aqueux[138]. La Figure 31 montre les

positions à 5 ns et 10 ns extraites de la modélisation du passage de l'azobenzène tensioactif dans la cavité de l'α-CD pour plusieurs conditions initiales. Les conditions étudiées sont la conformation de l'azobenzène (*cis* ou *trans*), le sens de la cyclodextrine (Δ ou ∇) et le bout de chaîne initialement présent dans la cavité (↓ s'il s'agit de la tête hydrophile, ↑ s'il s'agit de l'azobenzène). L'étude dynamique de ce système souligne l'importance des conditions initiales sur la conformation préférentiellement adoptée par le système.

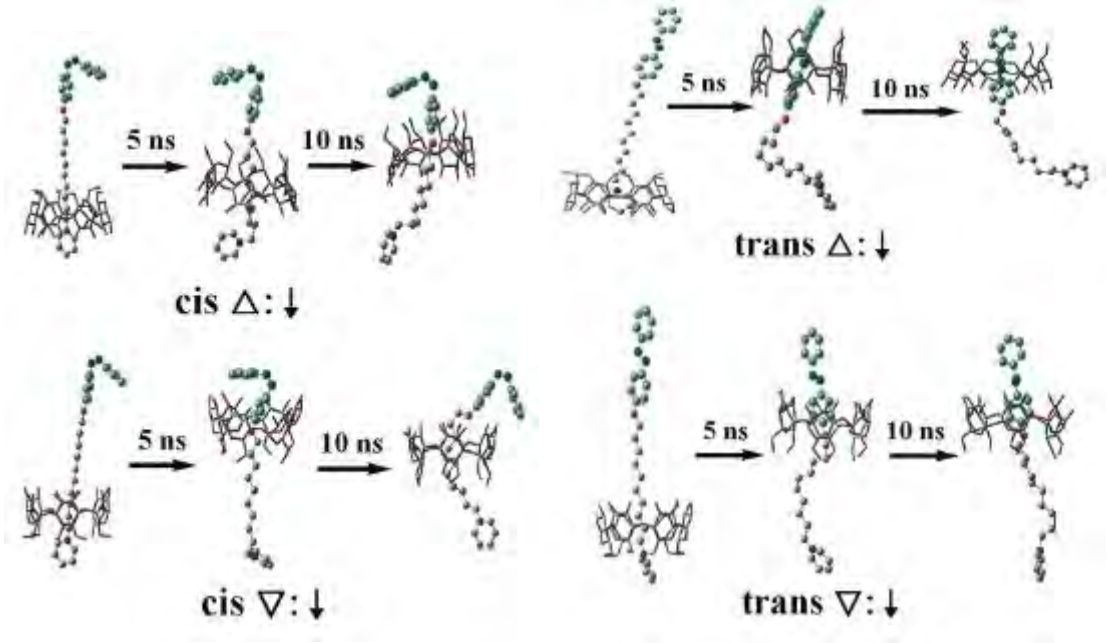


Figure 31: Positions cruciales dans le processus d'assemblage du complexe lorsque l'azobenzène est sous forme cis (gauche) et trans (droite), modélisées par la dynamique moléculaire. Les molécules d'eau n'ont pas été affichées pour favoriser la lisibilité. Les atomes de l'α-CD sont représentés par des traits tandis que ceux de l'azobenzène sont représentés par des sphères. Image reproduite depuis[138].

Les méthodes de modélisation numérique sont des outils pratiques pour la prévision ou l'interprétation de résultats expérimentaux. Ces méthodes peuvent être coûteuses en temps et doivent être rigoureusement mises au point afin de ne pas en tirer de fausses conclusions. La DFT et la DM sont deux méthodes qui ont été utilisées avec succès dans la caractérisation des paramètres influençant la formation de complexes supramoléculaires hôte/invité.

IV.3.Paramètres influençant la formation du complexe AZO/CD

Les cyclodextrines ne complexent pas toutes les molécules de la même manière. En effet, en fonction de leur géométrie, de leur moment dipolaire ou de leur capacité à former des liaisons hydrogènes, les molécules vont former ou non des complexes plus ou moins stables avec les différentes CDs. Les caractéristiques de l'AZO dans le cadre de sa complexation avec les CDs

ont été étudiées par plusieurs groupes de recherche, expérimentalement, et par le calcul.

IV.3.1.Dimensions et géométrie

Des calculs de DFT ont permis de déterminer les géométries et tailles des deux isomères de l'azobenzène (Figure 32). L'isomère *trans* est long de 9 Å et large de 4,5 Å tandis que son isomère *cis*, plus compact, est long de 7,1 Å pour 4 Å de largeur et une épaisseur de 4,6 Å[139]. De plus, les deux isomères ont deux géométries bien différentes dans l'espace : l'AZO *trans* est plan tandis que l'AZO *cis* est coudé.

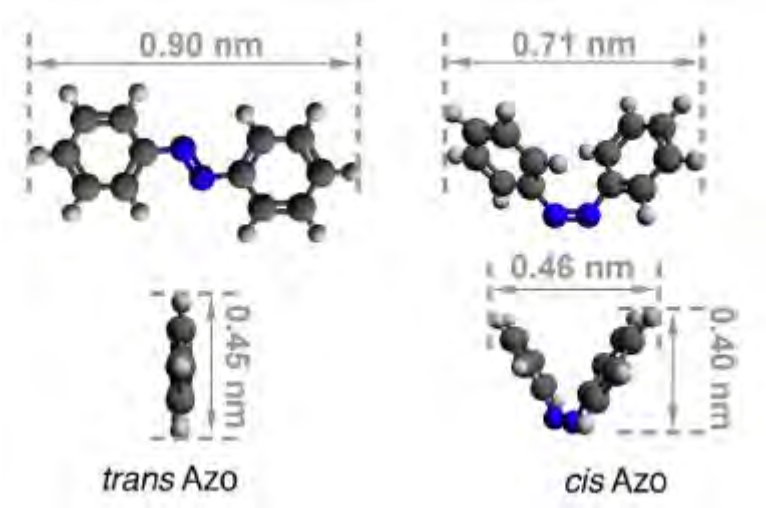


Figure 32: Modèles calculés en DFT des azobenzènes trans et cis. Figure reproduite d'après [139].

La taille et la planéité jouent sur l'inclusion de l'AZO dans la cavité des cyclodextrines. Par exemple, la non planéité et l'encombrement stérique de l'AZO *cis* ne lui permettent pas d'entrer dans l'α-CD[138]. A l'inverse, l'AZO *trans* est facilement inséré dans les α- et β-cyclodextrines et s'y oriente souvent de manière identique : parallèlement à l'axe de la cavité de la CD[138]. La γ-CD possède une large cavité dont le diamètre intérieur mesure environ 9 Å. Elle est capable de complexer deux azobenzènes[140,141] qui s'agencent sous forme de couches, une molécule par-dessus l'autre. Un tel confinement pourrait même avoir des conséquences sur la photochimie des azobenzènes[141].

IV.3.2.Moment dipolaire

La cavité des cyclodextrines est hydrophobe. En milieu aqueux, le moment dipolaire d'une molécule va déterminer l'insertion de celle-ci dans la cavité de la CD. L'AZO *trans* possède un moment dipolaire quasiment nul du fait de sa planéité, ce qui le rend plutôt hydrophobe. L'AZO *cis*, plus polaire que son isomère ($\mu \approx 3D$)[139], donc plus hydrophile, a moins tendance à interagir

avec la cavité hydrophobe des cyclodextrines en milieu aqueux.

IV.3.3.Liaisons hydrogène

La présence de liaisons hydrogène entre la molécule invitée et la cavité de l'hôte peut également influencer ces interactions supramoléculaires. En effet, les interactions hydrogène gênent le mouvement de la molécule invitée et ont tendance à stabiliser le complexe. L'effet de gêne induit par ces liaisons est même plus important que les effets des interactions de Van der Waals, souvent déterminantes dans les complexes de cyclodextrine[141].

En conclusion, dans l'eau, l'isomère *trans* a plus d'affinité avec les α- et β-CD que sa forme *cis* qui s'échappe majoritairement de la cavité en dissociant le complexe[140,142]. Ceci peut être source de comportements macroscopiques distincts. Par exemple, Tomatsu et coll. ont étudié un polyacide acrylique possédant un groupement pendant un N,N'-dodécane-di-p-phénylazobenzamide (Figure 33) capable de former un complexe d'inclusion avec l'α-CD en milieu aqueux[143].

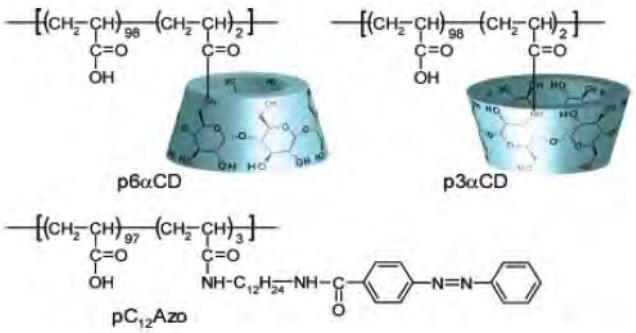


Figure 33: Structure des composés utilisés par Tomatsu et coll. pour la formation d'un polymère à la viscosité photo-réversible par complexation d'un AZO à l'α-CD [143].

L'isomérisation de l'azobenzène et ses interactions avec la CD influent directement les propriétés physiques du mélange. Une diminution de la viscosité a pu être observée au cours de la transformation *trans*→*cis* tandis que la réaction inverse génère un léger épaississement du milieu. La RMN valide ce que suggèrent les suivis de viscosité : l'AZO *cis* est majoritairement dissocié de l'α-CD alors que sa forme *trans* s'y complexe.

Les aptitudes de l'azobenzène à former ou non des complexes avec les CDs en fonction de son état d'isomérisation a fait l'objet de nombreuses études. Cela a notamment permis des avancées notables dans la création de matériaux intelligents. Ces travaux ne s'arrêtent cependant pas à l'étude de l'AZO mais à beaucoup de ses dérivés qui apportent aux systèmes étudiés de nouvelles propriétés ou paramètres de contrôle.

IV.4.Complexes supramoléculaires entre dérivés d'azobenzène et cyclodextrine

Le système AZO/CD est bien connu de la communauté scientifique. Cependant la littérature rapporte également de nombreux travaux de modification de l'azobenzène pour lui donner les propriétés spectrales désirées, comme vu dans le III. D'après le paragraphe précédent, ces nouveaux dérivés de l'azobenzène n'ont certainement pas les mêmes propriétés que l'azobenzène hydrogéné lorsqu'il s'agit de former des complexes hôte/invité avec les différentes cyclodextrines.

Par exemple, certains groupes ont modifié l'azobenzène avec des groupements électro-donneurs ou accepteurs en position *ortho* pour permettre l'isomérisation sous irradiation dans le visible. D'autre part, certains azobenzènes ont été substitués avec une tête hydrophile[138] ou bien une chaîne POE[144] afin de le rendre hydrosoluble. La présence de substituants est susceptible de modifier les propriétés de planéité, d'encombrement stérique et les moments dipolaires des molécules par rapport à l'AZO et donc de modifier leur capacité à complexer les CDs ainsi que l'orientation des molécules invitées dans la cavité[137]. L'étude de chaque nouveau complexe entre AZOs modifiés et CDs est donc nécessaire et importante car ces systèmes permettent de réaliser des matériaux aux propriétés contrôlables et modifiables facilement, à la demande.

L'incorporation du système AZO/CD dans des matrices plus complexes, polymères par exemple, permet en effet l'obtention de matériaux photo-stimulables[94]. Par exemple, un azobenzène substitué en *ortho* par quatre méthoxy a été utilisé associé avec la β-CD sur un squelette poly(acide acrylique) pour le relargage contrôlé de protéine par de la lumière rouge[145].

Bien que les systèmes AZO/CD traditionnels soient associés avec un AZO *trans* et dissociés lorsqu'il est en *cis*, les propriétés d'inclusion dans les cyclodextrines sont modifiées lorsque des substitutions interviennent. Notamment, le groupe de Wu a décrit un azobenzène substitué en *ortho* par quatre isopropoxy qui peut être isomérisé de *trans* à *cis* par de la lumière verte ou rouge et de *cis* à *trans* par de la lumière bleue. Il est intéressant de noter que la forme *cis* de cet azobenzène a la capacité d'entrer dans la large cavité de la γ-CD alors que la forme *trans* n'est pas complexée[146]. D'autre part, Zhang *et coll.* ont montré que la forme *cis* du 4,4'-(diazène-1,2-diyl)bis(3,5-acide difluorobenzoïque) (Figure 34a.) formait un complexe plus stable avec la β-CD que son isomère *trans*[147]. Huang *et coll.* firent la même observation avec un azobenzène porteur de quatre fluors en *ortho* et d'une chaine POE en *para*[144] (Figure 34 b.).

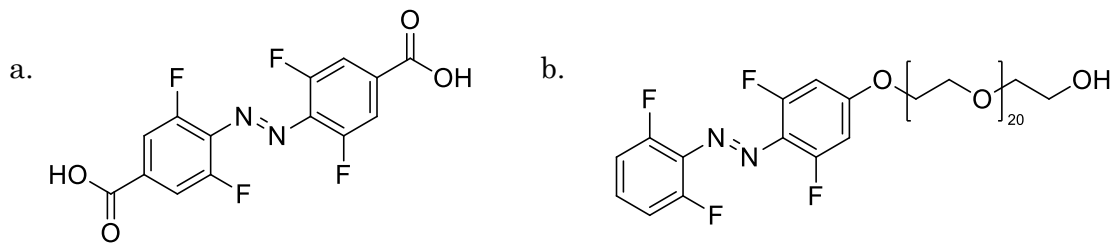


Figure 34: Structures des azobenzènes tétra fluorés étudiés en présence de β-CD par a. Zhang et coll. et b. Huang et coll.

Les matériaux formés à partir de complexes entre dérivés d'AZO répondant dans le visible et CDs s'avèrent particulièrement pertinents pour étudier le vivant puisqu'ils peuvent être conçus spécifiquement pour l'utilisation désirée. De plus, la lumière visible est un stimulus cytocompatible et non invasif qui convient tout à fait au travail en présence de systèmes biologiques. C'est pour cette raison que de nombreux hydrogels sensibles à la lumière ont émergé au cours des dernières années, et parmi eux des systèmes basés sur les interactions AZO/CD.

V. Hydrogels sensibles à la lumière au service de la biologie

Les possibilités offertes par la chimie ont permis le développement d'un grand nombre de matériaux. Les hydrogels notamment, ont fait l'objet de nombre d'études dans le domaine de la biologie cellulaire et de l'ingénierie tissulaire. Ils sont composés de polymères hydrophiles organisés en une structure gonflée d'eau qui permet la diffusion d'oxygène, nutriments et molécules bioactives dans leur masse[16]. Ces matériaux, aux propriétés définies et contrôlées, sont les plateformes idéales pour étudier et guider les comportements cellulaires. Cependant, les premiers hydrogels développés sont dits statiques, c'est-à-dire qu'ils possèdent des propriétés immuables. Ces matériaux imitent mal le comportement dynamique de la MEC native, environnement naturel des cellules. C'est pour cette raison que de nouveaux systèmes émergent, dont les propriétés physiques et chimiques peuvent changer en réponse à des stimuli biocompatibles externes. Ces nouvelles plateformes, dynamiques, sont des outils prometteurs pour la création de MEC de synthèse et la manipulation, à la demande, d'échantillons biologiques. Parmi les stimuli biocompatibles, la lumière s'est démarquée par son caractère non invasif évident. La partie qui suit fait état, dans un premier temps, des hydrogels photo-stimulables développées au cours des dernières années pour l'étude des systèmes biologiques. Dans un deuxième temps, elle se concentrera sur la description des hydrogels aux propriétés

photoréversibles, puis, en particulier, sur les gels formés à partir d'interactions azobenzène/cyclodextrine.

V.1.Hydrogels à rigidité contrôlable par la lumière

L'insertion d'unités photochromes sur un squelette hydrogel a été utilisé pour apporter du dynamisme aux matrices polymères. Par exemple, la lumière a été utilisée pour déstructurer ou bien former lentement des hydrogels. Ainsi, les propriétés de ces derniers peuvent être contrôlées et modifiées au cours du temps. De tels matériaux ont été largement utilisés afin d'étudier les réponses cellulaires à des stimuli mécaniques. En effet, de nombreuses études ont démontré que le vivant était sensible à la rigidité de son entourage[148], c'est la mécanobiologie. Afin d'imiter et d'étudier des phénomènes pathologiques tels que la fibrose par exemple, il est nécessaire de disposer de plateformes dont la rigidité varie de celle d'un tissu sain à celle d'un tissu malade, ou inversement. Différentes approches sont utilisées à cette fin, le gel peut être ramolli de façon contrôlée en rompant des liaisons, il peut être rigidifié en augmentant le nombre de point de réticulation ou bien certains gels sont conçus selon un gradient de propriétés mécaniques.

V.1.1.Ramollissement contrôlée de la matrice

Le groupe d'Anseth a mis au point, en 2009, un hydrogel dynamique pouvant servir de support de culture cellulaire [149]. Dans cet exemple, un dérivé d'éther de nitrobenzyl sensible à la lumière est introduit comme agent réticulant dans un hydrogel de POE (Figure 35a.). L'irradiation à 366 nm ou 405 nm de l'unité photochrome conduit au clivage des liaisons esters et à un abaissement de la densité de réticulation (Figure 35b.). La vitesse de dégradation de l'hydrogel dépend de l'intensité de l'irradiation ainsi que la longueur d'onde choisie. Ainsi, le module du gel a pu être précisément diminué et ajusté pour étudier son influence sur le comportement de cellules souches mésenchymateuses humaines (hMSCs). Ces cellules ont été encapsulées dans un hydrogel densément réticulé et le mélange a été soumis à plusieurs courtes irradiations (~ 100 s) successives de lumière UV (Figure 35c.). Dans une étude précédente, Bryant *et coll.* ont montré que l'irradiation de fibroblastes et chondrocytes par lumière UV à 6-8 $mW.cm^{-2}$ pendant 10 min n'engendrait pas de cytotoxicité[150]. Le groupe de recherche d'Anseth s'est par la suite basé sur cette étude pour justifier l'utilisation de lumière UV en présence de cellules. Au cours de la dégradation du gel, les cellules se sont propagées dans sa masse. Les auteurs utilisent ensuite cet hydrogel pour réaliser un motif en trois dimensions. A l'aide d'un masque, certaines

zones sont couvertes tandis que d'autres non. Après irradiation, les zones exposées à la lumière se sont dégradées et la surface du gel est constituée d'une alternance de creux et de bosses (Figure 35d.). L'étude de hMSCs encapsulées dans cette structure montra notamment que la création d'un motif en trois dimensions orienterait la migration des cellules.

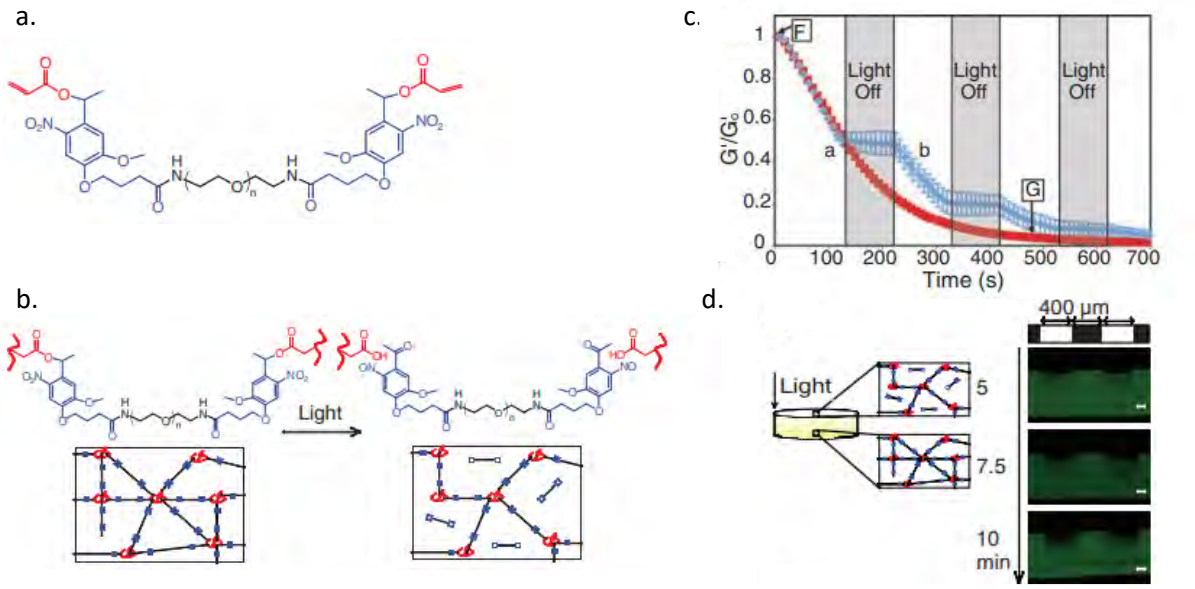


Figure 35: Synthèse d'hydrogel photodégradable en deux et trois dimensions aux propriétés physiques contrôlables. a. macromonomère photodégradable, b. photo-dégradation de l'hydrogel réticulé, c. diminution de la rigidité du gel au cours de sa dégradation sous irradiation continue (courbe rouge) et périodique (courbe bleue) à 365 nm à 10 mW.cm^{-2}, d. réalisation d'une empreinte 3D à la surface de l'hydrogel. Images reproduites depuis [149].

Plus récemment, ce groupe a utilisé le même hydrogel pour étudier l'influence de la rigidité et de la présence de régions aux propriétés mécaniques distinctes dans la matrice sur le développement des hMSCs[151]. Grâce à l'utilisation d'un masque, un gel de POE composé de zones de rigidité différentes et définies (2 kPa et 10 kPa) est synthétisé. Les expériences de culture de hMSCs suggèrent que les zones rigides sur un motif régulier influencent le destin cellulaire. En effet, au contact de telles zones, les cellules montrent une morphologie allongée et leur propagation augmente de même que l'activation de la « Yes-associated protein » (YAP), une protéine qui, activée, initie les processus de division et de mort cellulaire. Au contraire, si la répartition des zones de haute et de faible rigidité est aléatoire, les cellules ne sont pas sensibles à une augmentation de rigidité. Il semble donc que non seulement la rigidité de la matrice extra cellulaire mais aussi son organisation influence le comportement des hMSCs.

Ce système hydrogel aux liaisons photoclivables a permis l'étude de cellules soumises à un ramollissement de leur environnement mais mieux encore, la conception de supports de culture

aux propriétés mécaniques bien définies. Ces nouvelles plateformes sont adaptées à l'étude des relations entre ECM et cellules.

V.1.2.Rigidification contrôlée de la matrice

Une seconde approche, plus étudiée ces dernières années pour comprendre les relations entre rigidité de la MEC et comportements cellulaires, est le développement d'hydrogels dont la rigidité peut augmenter de façon contrôlée au cours du temps.

En 2015, Anseth et ses collaborateurs ont développé un gel de POE qui peut être rigidifié en présence de cellules en faisant réagir par réaction thiol-ène des fonctions terminales norbornène et mercapto[152]. Les cellules interstitielles de valve (VICs) sont responsables de la sécrétion et du remodelage de la matrice du tissu valvulaire. Ces cellules ont été incorporées dans un gel mou de POE porteur de fonctions terminales norbornène en présence d'un agent de réticulation peptidique et d'un peptide d'adhésion (Figure 36a.). Le phényl-2,4,6-triméthylbenzoyl-phosphinate de lithium (LAP) est utilisé comme photoamorceur pour la réaction thiol-ène. Des gels de différentes rigidités contenant des VICs sont ainsi synthétisés et celui à 0,24 kPa est choisi pour être rigidifié par une seconde réaction thiol-ène (Figure 36b.) entre les POE-norbornènes (POEnb) et un POE portant des fonctions thiol (POESH). En fonction de la concentration en POEnb et POESH, la rigidité finale de l'hydrogel peut être contrôlée *in situ*. Ici, le module du gel passe de 0,24 kPa initialement à 1,2 kPa (gel intermédiaire) ou à 13 kPa (gel rigide). Les auteurs ont ainsi observé que le phénotype des VICs était modifié en fonction de la rigidité du gel dans lequel ils étaient encapsulés.

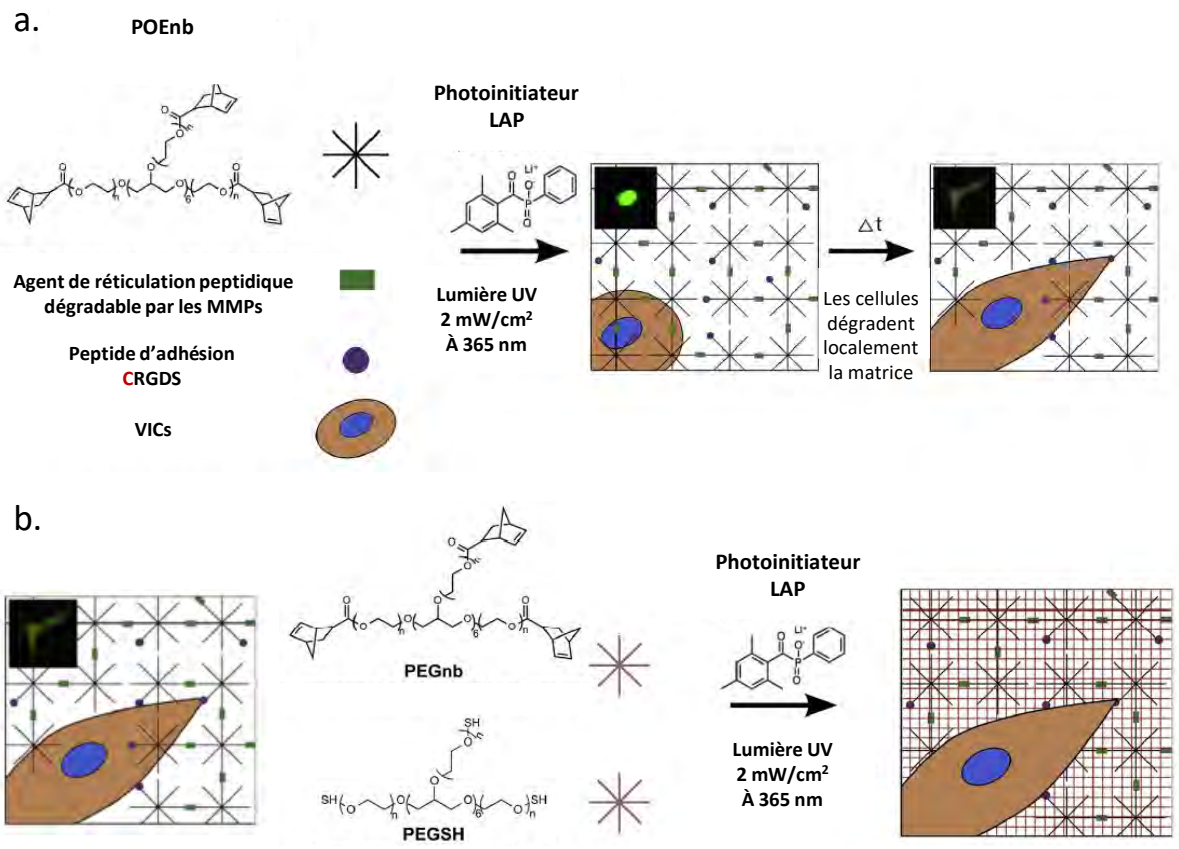


Figure 36: Schéma de a. l'encapsulation de VICs dans l'hydrogel de POE suivi de b. la rigidification de la matrice par ajout de POEnb et POESH. Schéma reproduit d'après[152].

Plus récemment, Liu *et coll.* étudièrent l'influence d'un durcissement en deux étapes de la matrice sur le comportement des cellules pancréatiques cancéreuses humaines COLO-357. La première étape est la formation d'un hydrogel *in situ* par la même réaction thiol-ène que précédemment entre un POEnb à huit branches et un peptide bifonctionnel porteur de fonctions mercapto et de tyrosines (Figure 37a.). La deuxième étape consiste à réticuler de nouveau le gel en utilisant un photoamorceur, la flavine mononucléotide (FMN) qui induit la réticulation de deux tyrosines par leurs groupements phénols sous irradiation à 440 nm (Figure 37b.). Le temps d'exposition à la lumière et son intensité permettent de contrôler la rigidité du gel, tout autre paramètre étant constant. Il a été démontré que plus l'exposition est longue, plus le gel devient rigide. Il en va de même, pour l'intensité de la lampe. Différentes zones d'un même gel contenant de la 5 (6)-ROX-tyramine ont ensuite été irradiées par l'intermédiaire d'un masque, pour permettre la formation des motifs en 3D observables par analyse en fluorescence. La culture de sphéroïdes de COLO-357 dans le gel dynamique et dans un gel mou non-dynamique a montré que la croissance des cellules était ralentie dans le gel dynamique entrainant une activité métabolique plus faible que dans le gel mou. Cependant l'étude de l'expression des

metalloprotéases 2 et 7 suggère que les cellules cancéreuses seraient sujettes à migrer et se répandre dans une matrice rigide.

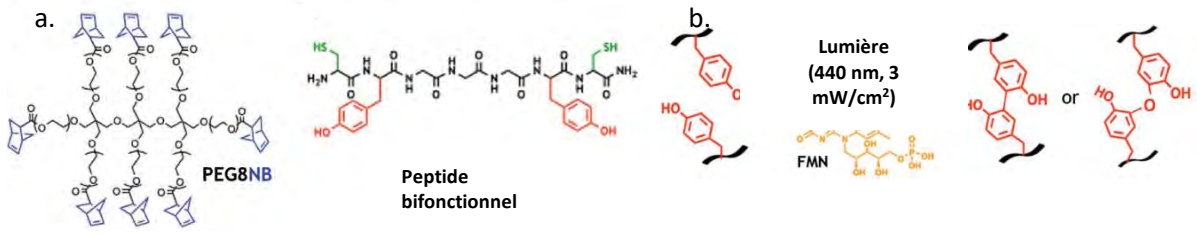


Figure 37: a. Structures de molécules impliquées dans la formation d'un gel à rigidification contrôlée et b. schéma de la réaction de réticulation des tyrosines photoamorcée par la FMN. Schéma reproduit d'après[153].

Le principe de doubles réticulations successives a de nouveau été exploité par le groupe d'Anseth pour le développement d'hydrogel de POE à base d'azadibenzocyclooctyne (DBCO) [154]. Les DBCO subissent dans un premier temps une cycloaddition azoture-alcyne avec un POE-diazide pour former le gel. Puis, dans un second temps la rigidité du gel est accrue par photo-réticulation amorcée par le LAP des cyclooctynes libres (Figure 38). L'utilisation de différents ratio azoture/alcyne a permis l'obtention d'hydrogel aux cinétiques de rigidification différentes. De plus, la cinétique favorable de la cycloaddition azoture-alcyne dans les conditions physiologiques rend cette méthode de synthèse pertinente pour l'encapsulation de cellules. Les hydrogels ainsi formés peuvent donc être rigidifiés à la demande et ont été utilisés pour étudier l'influence de changements de rigidité de la matrice sur des cellules musculaires, des myoblastes de souris C2C12. Pour permettre une bonne adhésion des cellules au gel, le POE-diazide est remplacé par un peptide diazoture. Les cellules musculaires peuvent sentir et répondre aux stimuli mécaniques par la localisation de la YAP. Les cellules incorporées dans un gel qui est ensuite rigidifié sous 24h ne voient pas leur morphologie évoluer et abaissent la quantité de YAP dans leur noyau. Au contraire si ces cellules sont cultivées pendant 6 jours dans un gel mou, et ont le temps de se répandre, une rigidification du gel entraîne un allongement des cellules et une augmentation de la quantité de YAP au niveau du noyau traduisant une réponse cellulaire au changement de propriétés mécaniques de leur environnement.

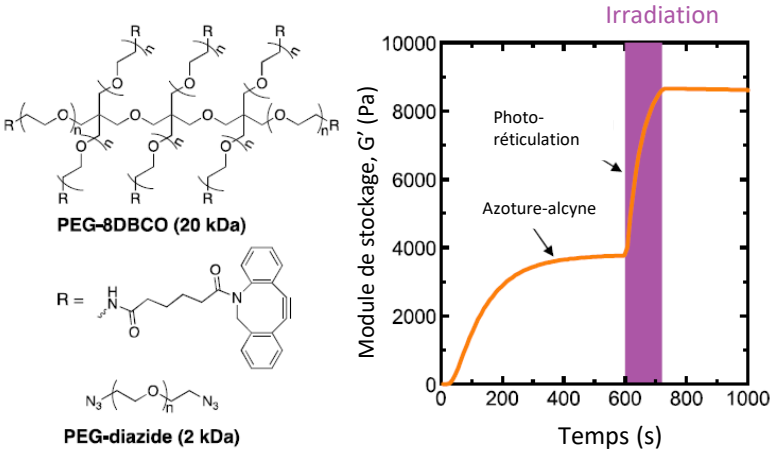


Figure 38: Structure des espèces formant l'hydrogel de DBCO et suivi du module de stockage du matériau au cours de sa formation et rigidification par photo-réticulation. Schéma reproduit d'après [154].

Le même principe a été utiliseé pour réaliser des gels de POE grâce aux fonctions anthracènes qui forment des dimères entre elles sous une irradiation dans l'UV (Figure 39)[155]. Le groupe d'Anseth a étudié la localisation du facteur de transcription NFAT de fibroblastes cardiaques dans ces gels, à rigidité fixe ou modulable, allant de 10 à 50 kPa.

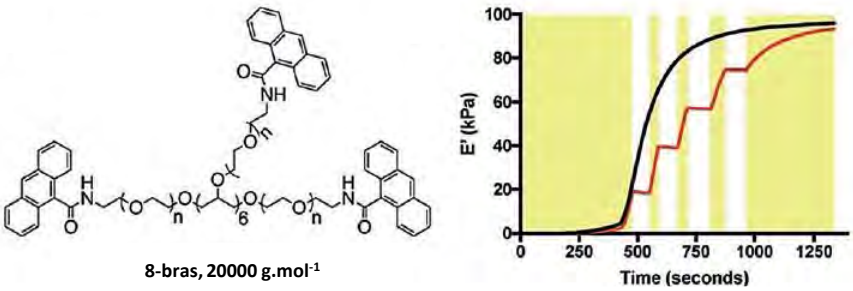


Figure 39: Structure d'un POE-anthracène utilisé pour former des gels et de l'évolution du module d'un gel à 13 wt% au cours de la réticulation sous irradiation continue (ligne noire) ou par étape (ligne rouge). Les bandes jaunes représentent les périodes où la lumière UV est allumée dans l'irradiation par étape. Figure reproduite depuis[155] .

Cette étude montre que la localisation du NFAT passe de cytoplasmique pour un gel statique à nucléaire dans un gel dynamique. Elle prouve donc l'utilité de supports dynamiques pour la mécanobiologie.

L'étude de comportement biologique sur des échantillons soumis à une rigidification spatio-temporelle de leur matrice montre que ceux-ci peuvent répondre de différentes façons à un stimulus mécanique : en se différenciant pour les cellules souches, en délocalisant la YAP pour des myoblastes C2C12 ou le facteur NFAT pour des fibroblastes.

V.1.3.Matrice à gradient de rigidité

Des gels de plus en plus complexes à base de polymères naturels ou synthétiques, imitant de mieux en mieux les propriétés diverses de la MEC voient le jour, basés sur la rigidification en plusieurs étapes de leur matrice. Ces gels font coopérer des stimuli biochimiques et biomécaniques pour comprendre les relations complexes entre cellules et MEC.

Par exemple, Rape *et coll*. décrivent un exemple d'hydrogel de acide hyaluronique--méthacrylate réticulé en deux étapes, caractérisé par deux gradients orthogonaux de rigidité et de concentration en fibronectine (ligand d'adhésion)[156]. Le gel est synthétisé en deux étapes et la fibronectine greffée grâce à la présence de fonctions mercapto incorporées au squelette méthacrylate en amont de la polymérisation (Figure 40). Des glioblastomes humains sont mis en culture sur ces hydrogels et ont permis au groupe d'observer que le microARN miR18 n'était pas contrôlé de la même manière en fonction des propriétés du substrat. Cela a permis de démontrer que la MEC contrôlait l'expression de cet ARN de façon complexe et non linéaire. Cette plateforme a également montré la favorisation d'une différenciation ostéogénique de MSC sur des substrats rigides et riches en fibronectine tandis que des substrats mous favoriseraient une différenciation adipogénique non influencée par la concentration en fibronectine.

Dans la même optique, le groupe d'Anseth développa un hydrogel à base de POE-nb fonctionnalisé par un peptide pour l'encapsulation de cellules en 3D[157]. Ce gel est réticulé par réaction entre POE-nb et dithiol puis il est pourvu de molécules provenant de la MEC par application de stimuli lumineux. Le groupe a ainsi étudié la réponse de VICs encapsulées dans ces gels et a mis en évidence l'importance des paramètres chimiques et mécaniques de la MEC sur le comportement de ces cellules responsables de la fibrose.

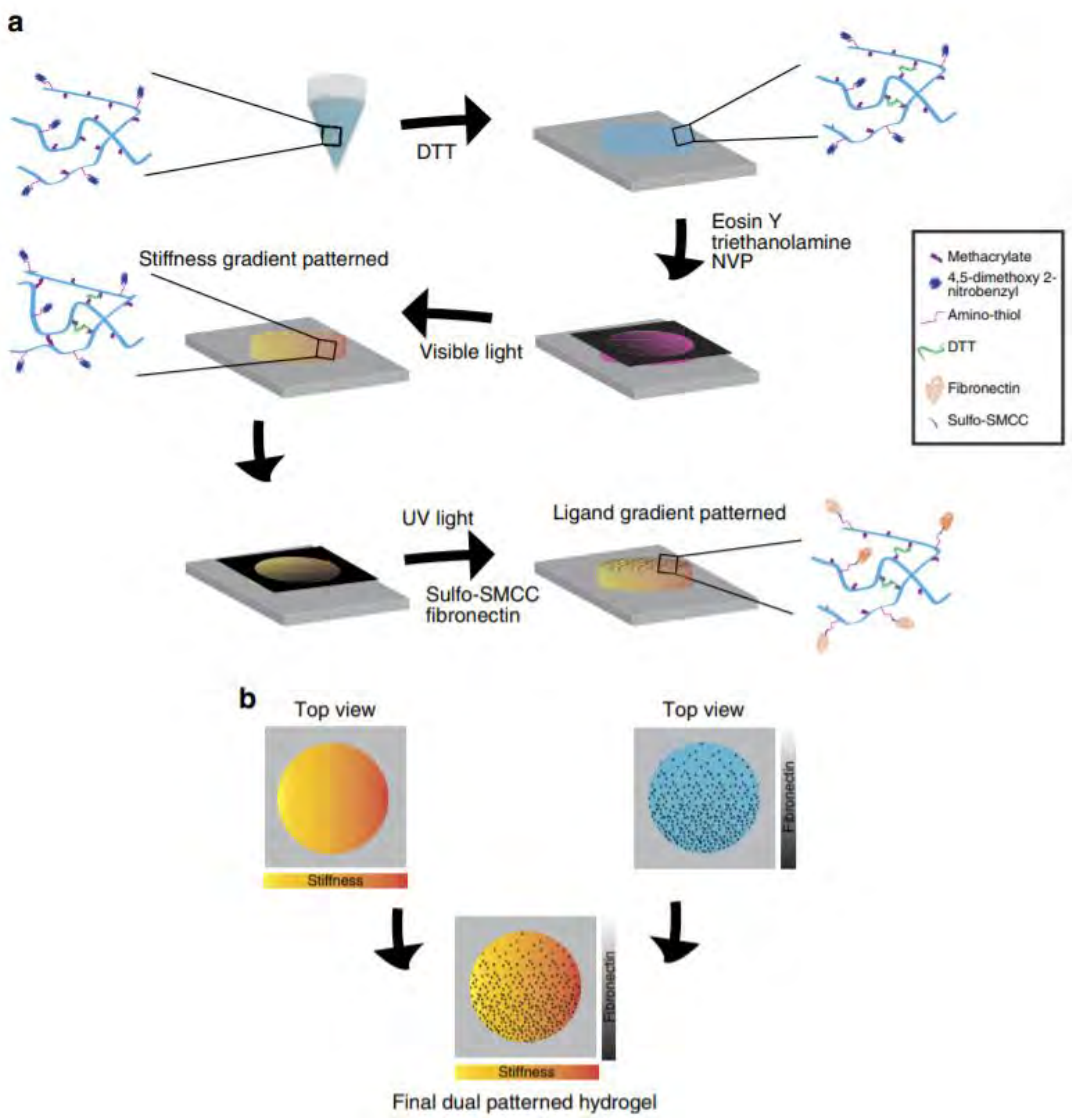


Figure 40: Représentation schématique de la synthèse de gels de AH possédant deux gradients orthogonaux, l'un en rigidité et l'autre en concentration de fibronectine. a. De l'AH-méthacrylate-DMNBAT est réticulé avec la DTT pour former un gel insoluble accroché à une lame de verre. Le gel est ensuite incubé avec un photoamorceur d'éosine Y et exposé à la lumière visible à travers un masque, créant ainsi le gradient de rigidité. Le gel est ensuite exposé à la lumière UV à travers le masque après sa rotation à 90° afin de conjuguer la fibronectine au DMNBAT. b. Représentation des gradients en rigidité et fibronectine. Figure reproduite depuis *Rape et coll.* [156].

En 2020, un hydrogel de dextrane-méthacrylate dit à 4 dimensions a été développé par Zheng *et coll*[158]. Ce gel est préparé de manière similaire à celui de Rape *et coll*., sans la présence de gradient. Il s'agit d'un gel qui peut contenir quatre zones distinctes bien contrôlables et définissables par la lumière, une zone rigide riche en peptide d'adhésion dégradable par les MMPs, une zone rigide sans peptide, une zone molle avec peptide et une zone molle sans peptide (Figure 41). Ce gel a servi pour l'étude de la migration de fibroblastes en sphéroïdes encapsulés dans sa masse. Les résultats montrèrent que les sphéroïdes se désintègrent, ses

cellules se répandent dans le gel, en présence de peptide d'adhésion alors qu'elles restent confinées en son absence. Par ailleurs, lorsque la matrice est rigidifiée, la croissance des sphéroïdes est limitée jusqu'à être stoppée lorsque le degré de réticulation atteint une valeur limite.

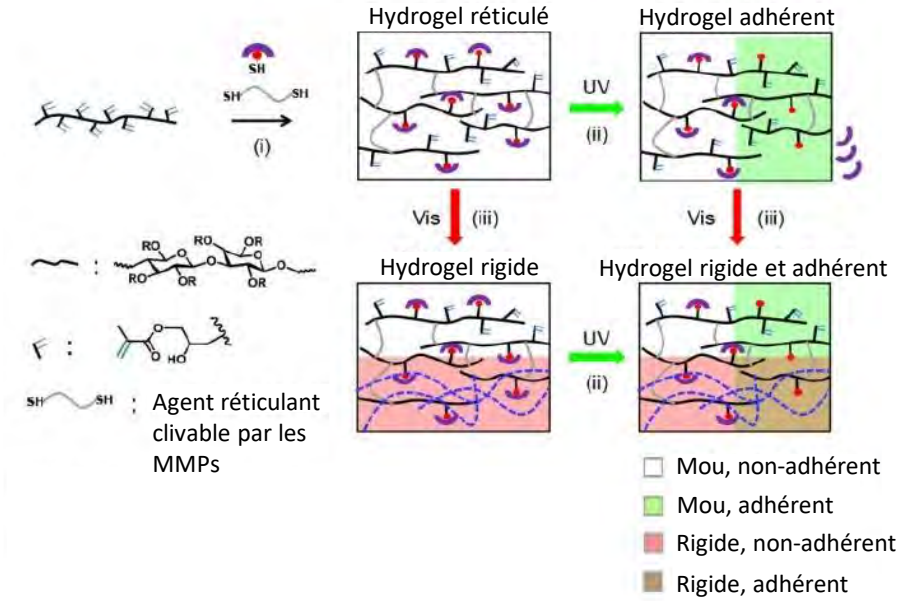


Figure 41: Représentation schématique d'un hydrogel de dextrane 4D. Figure reproduite depuis Zheng *et coll.*[158].

Ces systèmes versatiles ont permis d'activer, de diriger ou d'inhiber la migration et la différenciation cellulaire en fonction des propriétés du support de culture, en 2 ou 3D. Basés sur la photo-rigidification ou photo-greffage de molécule d'adhésion *in situ*, ces matériaux permettent un contrôle indépendant des propriétés biochimiques et biomécaniques de l'environnement cellulaire *in vitro*.

V.2.Systèmes réversibles à base d'azobenzène

Il y a eu, ces dernières années, des avancées notables dans le domaine de la conception de plateforme imitant la MEC pour des applications biologiques. Cependant, peu encore peuvent recréer fidèlement ses propriétés mécaniques changeantes. La nécessité de créer de nouveaux matériaux dynamiques a donc motivé de nombreux groupes de recherche. De récents travaux recensent notamment des systèmes capables de répondre à un stimulus lumineux par des changements structuraux, unidirectionnels ou cycliques. Ces systèmes réversibles permettent de contrôler les propriétés de la matrice de synthèse et lui conférer des propriétés mécaniques modifiables sur demande. L'azobenzène et ses dérivés peuvent changer de conformation, donc de propriétés, de façon réversible lorsqu'ils sont soumis à un stimulus lumineux. Ils ont été

utilisés dans de nombreux exemple d'hydrogels aux propriétés photo-stimulables de façon réversible, soit en tant qu'agent de réticulation insérés dans le réseau, soit en tant que groupement pendant en interaction avec des cyclodextrines dans le but de créer des points de réticulation physique.

V.2.1. Agent réticulant à base d'azobenzène

Un gel à base de POE développé par le groupe d'Anseth a été formé par réticulation avec un peptide photo-stimulable à base d'azobenzène[159]. L'AZO est choisi pour son isomérisation sensible à la lumière, de façon réversible. Ainsi, en fonction de sa forme, *cis* ou *trans*, l'azobenzène déforme le réseau du gel et modifie sa rigidité à l'échelle macroscopique (Figure 42). Les propriétés rhéologiques de ce gel témoignent de son caractère réversible qui perdure après plusieurs irradiations successives malgré une faible amplitude. Un point intéressant à relever dans cette étude est le fait que la conformation *cis* génère un gel plus mou que la conformation *trans*. Cela serait dû à la présence de liaisons hydrogènes entre les peptides photo-stimulables. Celles-ci seraient favorisées en conformation *trans*, créant un réseau plus rigide, et perturbées en conformation *cis*, d'où le réseau plus mou. La biocompatibilité de ce système est confirmée à l'aide de VICs.

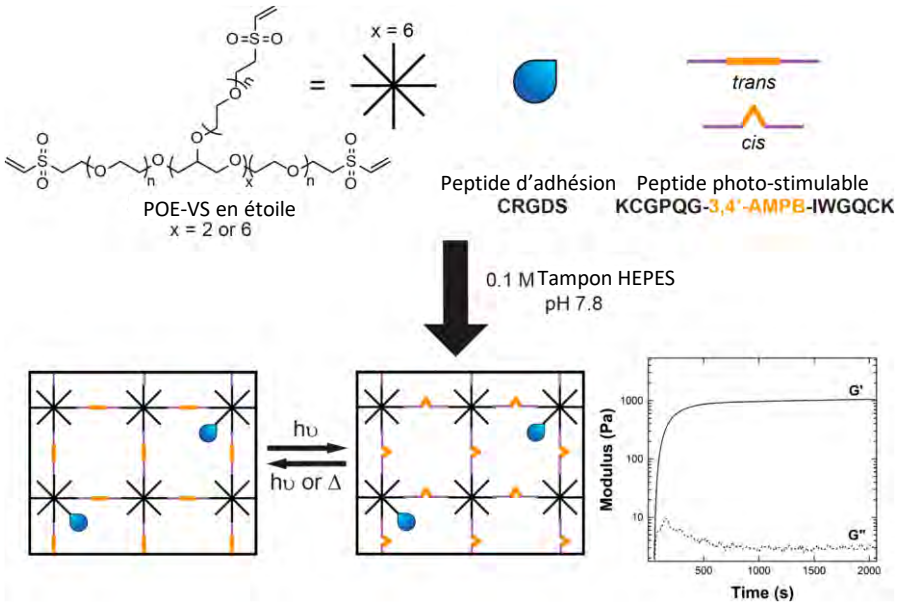


Figure 42: Représentation schématique de la formation de gel photo-stimulables par addition de Michael entre un POE-vinylsulfone à plusieurs bras et un peptide-thiol. Figure reproduite depuis Rosales *et coll.*[159].

Lee *et coll.* ont également développé un hydrogel contenant des agents réticulant dérivés d'AZO, à base d'acrylamide (Figure 43)[160]. En fonction de l'état d'isomérisation des dérivés d'AZO, le gel peut passer d'un état « dur » à un état « mou ». La rigidité des gels est mesurée

par microscopie à force atomique au cours du temps. L'amplitude de diminution de la rigidité est fonction du temps d'irradiation en UV, et peut atteindre 75% après 3h d'irradiation. Des cellules souches mésenchymateuses ont été étudiées en 2D sur ces hydrogels. Ces gels sont ainsi capables de moduler les comportements (morphologie, migration, adhésion) des MSCs grâce au changement de leurs propriétés mécaniques. Il s'agit d'un outil pertinent pour la mécanobiologie.

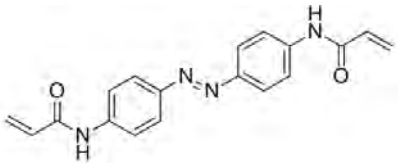


Figure 43: Azobenzène utilisé comme agent réticulant dans la synthèse de gels acrylamides photo-sensibles.

L'utilisation de l'AZO ou de ses dérivés comme agent de réticulation permet donc d'obtenir des gels sensibles à la lumière de façon réversible avec une faible fatigue. Cependant, l'amplitude de la réponse en rigidité n'est pas assez élevée pour modéliser le passage d'un tissu sain à un tissu fibreux (de quelques kPa à plusieurs dizaines de kPa). De plus, pour des temps d'irradiation longs, la question de la cytotoxicité de la lumière UV sur les cellules se pose. Elle peut être un inconvénient à l'utilisation de tels systèmes pour des applications biologiques.
L'azobenzène reste un photochrome de choix dans l'élaboration de matériaux intelligents par son accessibilité et sa facilité à être isomériser. Ses propriétés de complexation avec les cyclodextrines ont su être exploitées dans le but d'obtenir des matériaux photo-stimulables réversibles.

V.2.2.Système réversible grâce à l'interaction azobenzène/cyclodextrine

La majeure partie des gels à base d'AZO et de CD connus de la littérature utilise l'AZO classique (hydrogéné). Il a l'avantage d'être connu de même que ses propriétés d'inclusions dans les cavités des α-CD, β-CD, et γ-CD. Comme vu précédemment, l'isomère *trans* de l'AZO entre dans les α-CD et β-CD, formant un complexe hôte-invité, alors que le *cis* n'a pas la place d'entrer dans la cavité hydrophobe. Plusieurs groupes ont utilisé ces propriétés afin de créer des points de réticulation physique photo-stimulables dans des réseaux hydrogels. Le groupe de Harada s'intéresse depuis plus de dix ans déjà à la conception de matériaux stimulables par la lumière faisant intervenir le complexe entre AZO et CD. Harada, Takashima et Nakahata ont publié une revue en 2014 recensant les matériaux polymères supramoléculaires basés sur des interactions cyclodextrine-invité[94].

V.2.2.1.Réponse à la lumière UV

En 2009, Zhao *et coll.* synthétisèrent un hydrogel à base d'acide désoxycholique modifié avec de la β-CD et d'un PAA-AZO[161]. Lorsque l'AZO est sous forme *trans*, il est complexé par la β-CD et le mélange forme un gel. Lorsque la lumière UV le passe sous forme *cis*, c'est la partie desoxycholate de la β-CD qui pénètre la cavité et dissocie le gel, ramenant le mélange à un état de solution (Figure 44). Ce matériau exhibe donc une transition sol-gel qui pourrait, en fonction de sa biocompatibilité, être intéressante pour l'étude de systèmes biologiques.

Figure 44: Complexe d'inclusion supramoléculaire 1 formé d'un dérivé de β-CD-Déoxycholate 2 et d'un copolymère PAA-AZO 3. Le complexe 1 peut former, en solution aqueuse, un hydrogel disposant d'une transition sol-gel induite par l'isomérisation photo-stimulable de l'unité AZO. Reproduit depuis Zhao *et coll.*[161]

Tamesue et *coll*. du groupe dirigé par Harada, ont développé un an plus tard un hydrogel tout à fait similaire faisant intervenir la complexation de l'AZO comme groupe pendant d'un PAA dans la α-CD greffée sur un polysaccharide, le curdlane (CUR) (Figure 45a.)[162].

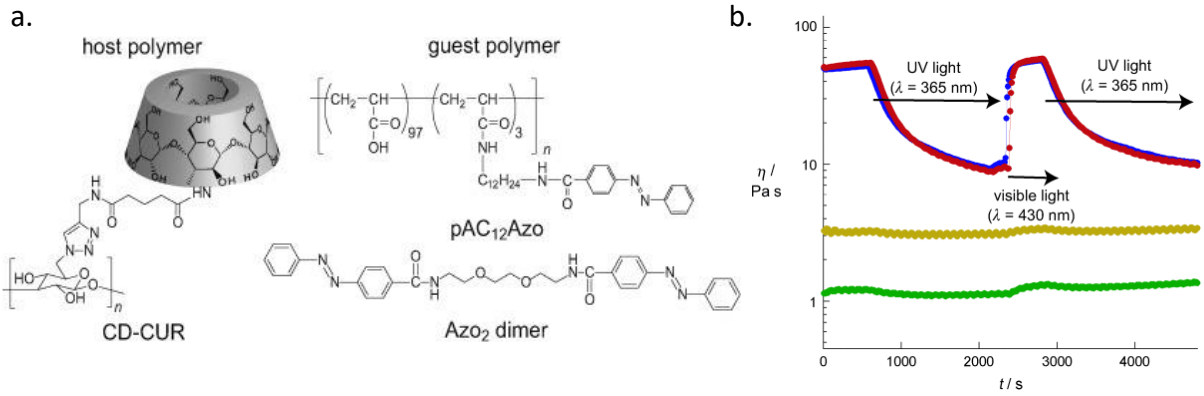


Figure 45: a.Structures du curdlane fonctionnalisé par l' α-CD et des dimères-AZO et PAA-AZO utilisés. b. Suivi de la viscosité de cisaillement au cours du temps sous irradiation UV puis bleue du mélange α-CD-CUD/PAA-AZO (tracé rouge). Comportement des mélanges α-CD-CUD/PAA-AZO en présence de 4 équivalents de $C_{12}CA_2Na_2$ (tracé vert), de tetraethylène glycol (tracé bleu) et de α-CD (tracé jaune). Figures reproduites depuis Tamasue *et coll.*[162].

Le suivi de la viscosité du mélange au cours des irradiations (Figure 45b.) confirme qu'en

fonction de l'isomérisation de l'AZO, le mélange subit un changement : le passage de la forme *trans* à la forme *cis* induit une diminution de la viscosité alors que le retour à la forme *trans* entraine une augmentation de la viscosité jusqu'à gélification. Il est intéressant de noter qu'en présence d'une molécule invitée possédant une constante d'association plus grande que l'azobenzène dans la α-CD, ici un sel de 1,12-décanedicarboxylate de sodium ($C_{12}CA_2Na_2$), le gel revient à l'état sol. De même lors de l'ajout d'un excès de α-CD libre dans la solution, ce qui tend à confirmer le dynamisme des liaisons hôte/invité. L'ajout d'une molécule possédant une constante d'association plus faible que l'azobenzène dans la α-CD, le tétraéthylène glycol, n'affecte pas la viscosité du mélange. D'autre part, le mélange α-CD-CUD/AZO_2 dimère ne forme pas de gel. Cela met en évidence le fait que, non seulement la formation du complexe hôte/invité mais également la présence de multiples points de réticulation, est importante pour générer la formation d'un gel supramoléculaire. Les résultats indiquent que la transition de phase du mélange peut être contrôlée par l'association et la dissociation du complexe α-CD/AZO et que ce changement de phase est réversible. Cependant, ce système est limité par le faible changement de propriétés mécaniques à l'échelle macroscopique dû au fait que la constante d'association entre AZO et α-CD est faible (~ 1000 mol^{-1}).

Le même groupe a travaillé plus tard sur la formation d'hydrogels par autoassemblage amorcé par la complexation entre AZO et CD[142]. Dans ce travail, deux gels à base de polyacrylamide contenant comme groupement pendant, pour l'un un azobenzène, pour l'autre une α- ou β-CD ont été synthétisés par copolymérisation radicalaire (Figure 46a.). La mise en contact de morceaux de gels contenant de la cyclodextrine et de morceaux de gels contenant de l'AZO entraîne l'autoassemblage de ceux-ci par la complexation de leurs fonctions de surface. Lorsque les AZOs sont en forme *trans*, il y a autoassemblage avec les gels contenant de l'α-CD (Figure 46b.). Par contre, lorsque l'AZO est passé en forme *cis* par irradiation UV, l'autoassemblage n'est plus possible qu'avec des gels contenant de la β-CD avec une très faible constante d'association. L'étude de l'influence du nombre de fonctions en surface montre que plus il y a de fonctions, plus les propriétés mécaniques de l'assemblage gel-AZO/gel-CD sont conséquentes. Ces propriétés peuvent être ajustées en faisant varier la densité de fonctions ainsi que l'isomérisation de l'AZO. Un gel est également formé à partir de polyacrylamide contenant à la fois de l'AZO et de l'α-CD. Ce gel montre des propriétés d'autoréparation après découpe.

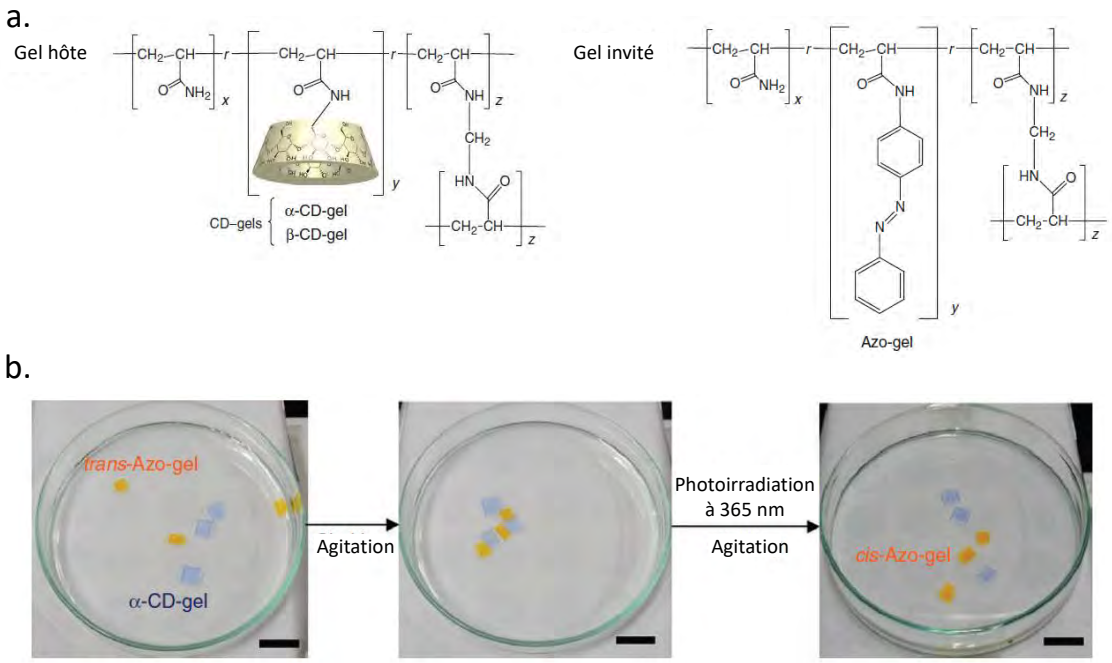


Figure 46: a. Structure chimique des gels hôtes et invités. Les ratios molaires des monomères d'acrylamide, d'hôte ou d'invité acrylamide et de N,N'-méthylbis(acrylamide) sont indiqués par les lettres x, y et z. Ici, x/y/z valent 93/5/2 pour le gel hôte et différentes valeurs pour les gels invités. Le « r » dans la chaîne principale indique qu'il s'agit de copolymères aléatoires. b. Assemblage et dissociation de gels à base de α-CD (bleu pâle) et d'AZO (orange). Les gels s'assemblent sous agitation lorsque l'AZO est sous forme trans. Ils se dissocient lorsque l'AZO est passé sous forme cis par une irradiation à 365 nm. Images reproduites depuis Yamaguchi *et coll.*[142] .

Ma et *coll.* développèrent des microsphères pour la culture cellulaire en 3D, basées sur la complexation AZO/CD[163]. Les sphères sont préparées à base de poly(méthylvinyl éther-alt-acide maléique, contenant des β-CD greffées, réticulé par un agent à base de POE (Figure 47). La complexation des β-CD de surface avec un azobenzène adhérent (AZO-RGD) permet la culture de cellule en 3D sur ces microgels. L'isomérisation de l'AZO-RGD par la lumière UV dissocie le complexe, diminue le nombre de peptides d'adhésion en surface et donc le nombre de cellules. La sensibilité du complexe à la lumière permet le contrôle de la densité cellulaire en surface de ces microsphères.

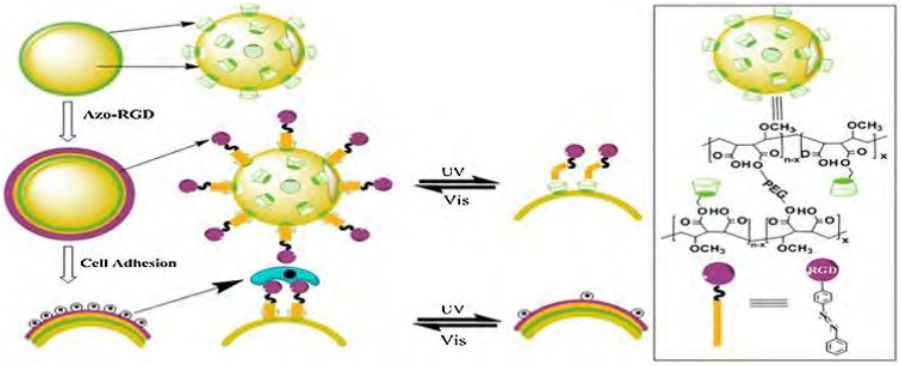


Figure 47 : Schéma représentant la stratégie de synthèse d'hydrogels photo-stimulables pour la culture cellulaire basés sur la complexation entre β-CD et un AZO-RGD. Schéma reproduit depuis Ma *et coll.*[163].

Le groupe de recherche d'Anseth développa, à son tour, un hydrogel d'acide hyaluronique aux propriétés photocontrôlables basées sur l'interaction supramoléculaire entre AZO et α- ou β-CD greffés sur deux polysaccharides indépendants (Figure 48a.)[164]. L'acide 4-phénylazobenzoïque est notamment utilisé comme invité de la β-CD, en ratio molaire 1:1 afin de former des gels aux propriétés viscoélastiques contrôlables. L'étude par rhéologie du module de stockage au cours du temps, sous irradiation à 365 et à 420 nm (Figure 48b.) montre la réversibilité, avec peu de fatigue (5%), des propriétés du gel, qui est dans un état « rigide » lorsque l'AZO est sous forme *trans* et dans un état « mou » lorsque l'AZO est sous forme *cis*. La constante d'association faible mais non nulle de l'isomère cis avec la β-CD permet au mélange de rester sous forme de gel. Les auteurs ont observé qu'augmenter la fonctionnalisation en AZO sur le squelette acide hyaluronique tend à diminuer le caractère viscoélastique du gel et à diminuer l'amplitude de la réponse photo-induite. A l'inverse, augmenter le pourcentage massique de polymère en solution a tendance à augmenter l'amplitude de la réponse pour un gel contenant la plus faible quantité d'AZO. Le module élastique de ces gels est contrôlable par la lumière et varie de l'ordre de 36 à 60% en fonction des propriétés intrinsèques des gels. Ils ne montrent pas de transition de phase, contrairement aux gels physiques précédemment cités, et ont pu être utilisés pour la délivrance de principe actif. La biocompatibilité de ces gels en fait de potentiels candidats en tant que matrice dynamique de culture cellulaire.

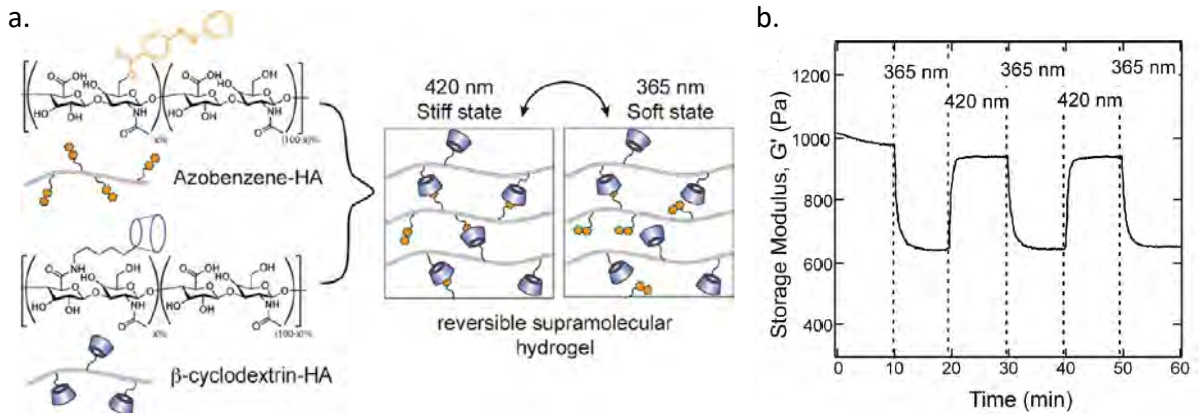


Figure 48 : a. Structure des molécules impliquées dans la synthèse d'un gel photo-stimulable et son schéma de fonctionnement. b. Suivi par rhéologie du module de stockage d'un gel soumis à des irradiations successives au cours du temps. Reproduit depuis Rosales *et coll.*[164]

Royes-Mir et *coll.* ont synthétisé un hydrogel composé d'un réseau physique, entre AZO et β-CD, et d'un réseau chimique[165]. De cette façon le gel n'a pas de forme sol, difficile à manipuler, mais plutôt une forme dite rigide et une forme dite molle. Il s'agit d'un travail réalisé dans le laboratoire où j'ai effectué ce travail de thèse, dans le cadre d'un contrat postdoctoral, et qui a servi de base à celui-ci.

Ce travail s'est focalisé sur la conception d'un hydrogel à rigidité photo-modulable. Il traite de la synthèse d'un hydrogel dont la rigidité peut varier de façon réversible de 30 kPa à 15 kPa environ simplement en appliquant un stimulus lumineux. Peu de travaux décrivent des hydrogels dont la rigidité est modulable avec une telle amplitude. La synthèse du gel met en jeu trois composés (Figure 49a.) : un AZO di-maléimide, une β-CD di-maléimide et un POE-tétrathiol. L'azobenzène assure, dans ce gel, la présence d'un réseau physique réversible grâce à son association avec la β-CD. La réaction de chimie click entre thiol et maléimide est choisie pour assurer la présence d'un réseau chimique qui permet au gel de disposer de propriétés mécaniques pouvant atteindre la rigidité de cellules fibreuses. Les blocs de synthèse à base d'AZO et de CD sont mélangés afin de former le complexe hôte invité. Ils sont ensuite réticulés à l'aide des thiols afin d'obtenir un hydrogel chimique. La complexation de l'AZO sous forme *trans* avec la β-CD lors de la formation du gel assure la présence de points de réticulation physiques dans le gel. Une irradiation UV (365 nm) peut isomériser l'AZO de *trans* à *cis*, induisant la décomplexation entre AZO et β-CD et détruisant le réseau physique. Cela conduit à une diminution de la rigidité du matériau. L'isomérisation retour est effectuée par de la lumière bleue (415 nm) et reconstruit le réseau physique, permettant une récupération des propriétés mécaniques du gel.

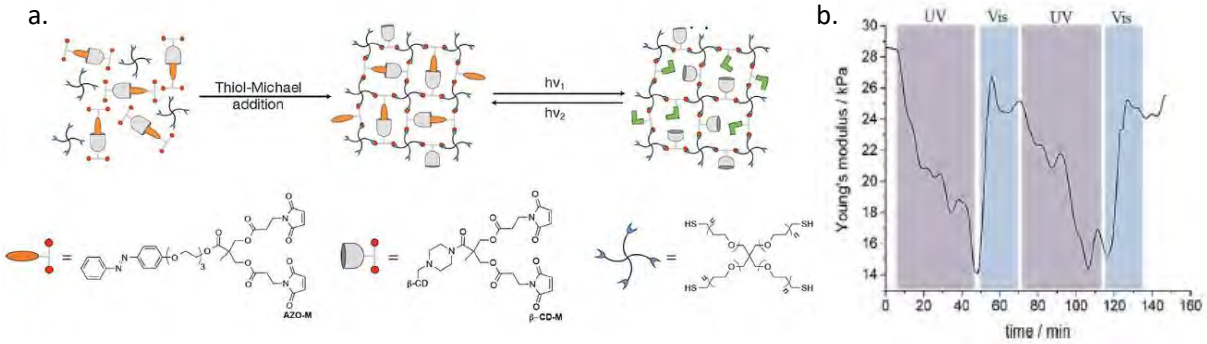


Figure 49: a. Représentation schématique des molécules utilisées dans la préparation d'hydrogels photo-stimulables. b. Evolution du module d'Young (E) d'un hydrogel répondant à la lumière au cours du temps d'irradiation. Reproduit depuis Royes-Mir *et coll.*[165].

La réponse à la lumière de ces hydrogels a été étudiée par microscope à force atomique afin de suivre le changement de propriétés mécaniques du gel au cours du temps, sous irradiation. Les résultats de l'analyse du module d'Young E, rigidité intrinsèque du matériau, au cours du temps pendant des irradiations bleues et UV successives, attestent du caractère photo-stimulable de ces hydrogels. Sur la Figure 49b., on peut voir que, dans un premier temps, E diminue fortement jusqu'à un état stationnaire sous l'influence de la lumière UV qui décomplexe AZO et β-CD, comme attendu. L'application, par la suite, d'une lumière bleue permet bien la récupération d'un matériau plus rigide. Après un cycle d'irradiation, on observe une très bonne réversibilité des propriétés mécaniques du gel avec peu de fatigue. La faible fatigue observée provient du fait que l'irradiation à 415 nm ne permet pas l'obtention d'un AZO 100% *trans* mais d'un état photo-stationnaire partiellement *cis*. De plus, l'amplitude de la diminution du module d'Young lors de l'irradiation UV est de quasi 50% du module initial, une valeur peu observée dans la littérature pour des gels rigides et réversibles. En conclusion de ce travail, un hydrogel biocompatible dont la rigidité est contrôlable de façon réversible par la lumière a été synthétisé et décrit. Les réseaux de réticulation chimique et physique permettent l'obtention d'un gel qui ne s'écoule pas mais dont la rigidité peut diminuer de 50% de sa valeur initiale avant de la retrouver en quasi-totalité. Il s'agit d'une avancée conséquente dans le domaine des hydrogels intelligents. Cependant, l'étude du vivant avec cet hydrogel est limitée par ses longues expositions à la lumière UV, néfaste.

Les systèmes hydrogels décrits dans cette partie utilisent tous la complexation supramoléculaire entre AZO et CD afin d'obtenir des matériaux dont les propriétés mécaniques, de surface ou d'autoréparation sont modulables de façon réversible par application de lumière UV et bleue.

Plusieurs de ces exemples sont destinés à des application dans le domaine de la biologie. Cependant, comme déjà mentionné, l'utilisation de lumière UV pendant de longs laps de temps, peut les rendre inadéquats pour de telles utilisations. En effet, la lumière UV risque d'endommager les échantillons biologiques. Il est donc nécessaire d'adapter ce système pour atteindre des longueurs d'onde de réponse appartenant au domaine du visible, non cytotoxique.

V.2.2.2.Réponse à la lumière visible

Peu d'hydrogels photo-contrôlables utilisent des azobenzènes modifiés, stimulables dans le domaine du visible. C'est le cas du groupe de recherche de Wu, qui utilisa un azobenzène méthoxylé aux quatre positions *ortho* (mAZO) et greffé sur un PAA pour former un hydrogel stimulable sous irradiation rouge[145]. Ce gel montre une transition de phase, d'une phase gel lorsque le mAZO est sous forme *trans*, complexée par la β-CD, à une phase sol après irradiation rouge (625 nm), qui passe le mAZO sous force *cis*, dissociant le complexe d'inclusion (Figure 50a.). Le retour à la forme *trans* est assuré par une irradiation bleue (470 nm), ou chauffage dans le noir. Cet hydrogel est plus adapté aux applications biologiques que ses homologues répondant aux UVs car la lumière rouge pénètre les tissus biologiques bien plus profondément que les UVs. Ces gels sont utilisés comme support pour contrôler le relargage de BSA (« bovine serum albumin ») marqué par une molécule fluorescente. La protéine est chargée dans le gel et son relargage est suivi par fluorescence. Lorsque le mAZO est sous forme trans, seulement 9% de protéines sont relarguées en 1h alors que 45% sont relarguées en 1h après irradiation rouge à 15 mW.cm^{-2}. Une irradiation plus puissante, 60 mW.cm^{-2}, pendant 1h permet le relargage de 83% de la quantité de BSA encapsulée dans le gel.

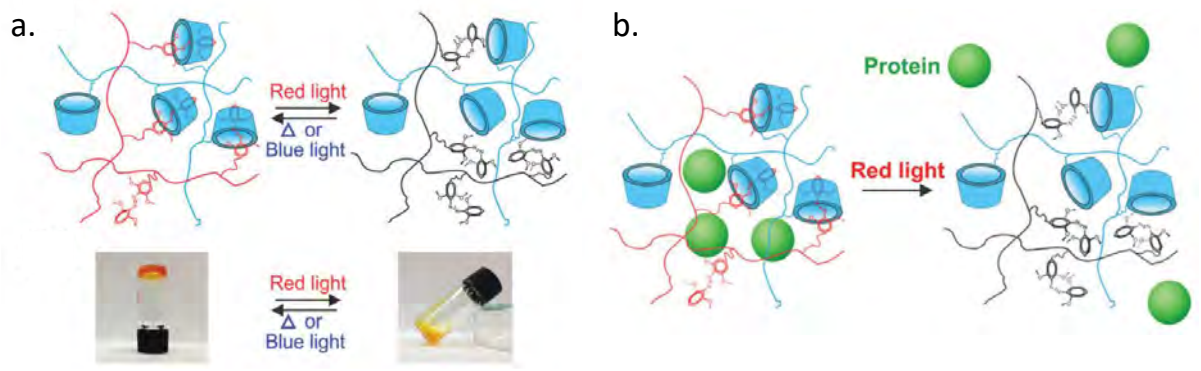


Figure 50: a. Schéma et photographies de la transition sol-gel photo-induite d'un mélange PAA-mAZO/PAA- β-CD. b. Schéma du relargage d'une protéine photo-contrôlée par un gel de PAA-mAZO/PAA- β-CD. Figures reproduites depuis[145].

Cet hydrogel possède donc une transition de phase réversible et contrôlable par lumière visible.

Cette transition peut être utilisée pour la délivrance de molécules encapsulées, à vitesse contrôlée, au travers de tissus. La quantité de lumière rouge nécessaire est assez faible pour éviter de causer des domages aux tissus traversés. Par contre, comme déjà mentionné, le mAZO est rapidement dégradable en présence de glutathion, ce qui le rend inenvisageable pour des applications en présence d'organisme vivants.

En 2020, une étude par Yan *et coll*. utilise l'auto-association de dimères d'azobenzènes tétra-méthoxy avec des dimères de β-CD pour la synthèse d'un matériau photo-stimulable par de la lumière verte et de la lumière bleue[166]. Les dimères de β-CD et de mAZO *trans* sont mélangés à chaud et leur refroidissement entraine leur auto-association en structure en ruban grâce à la présence de liaisons hydrogènes entre les CDs. L'enchevêtrement des rubans ainsi formés conduit à la formation d'un gel supramoléculaire. Une irradiation verte (550 nm) isomérise le mAZO en *cis* ce qui a pour effet de dissocier le complexe et le retour à une phase sol. L'utilisation de dimère bien définis plutôt qu'un support polymère comme dans l'étude du groupe de Wu permet un meilleur contrôle des paramètres expérimentaux. Les gels formés dans cette étude peuvent atteindre un module de stockage de l'ordre de 100 kPa pour un système composé à 90% de solvant, ce qui n'a pas été observé avec des gels physiques supportés par des polymères. Cet hydrogel a été utilisé pour étudier le relargage de rhodamine B. La molécule encapsulée dans le mélange peut être délivrée lors de la transition *trans*→*cis* du mAZO irradié à 550 nm. Une absence d'irradiation conduit à un relargage de 9% des molécules en 1h, tandis que l'irradiation à différentes puissances peut permettre de relarguer jusqu'à 80% des molécules en 1h. Le même groupe a également développé un poly(acide acrylique) greffé mAZO afin d'obtenir un hydrogel supramoléculaire répondant à la lumière visible en présence de dimères de β-CD[167].

Le mAZO en interaction avec la β-CD permet la fabrication de matériaux photo-stimulables avec de la lumière visible. Que les molécules hôtes et invités se présentent sous forme de dimères ou soient greffées à un squelette polymère connu, elles ont la capacité de former des points de réticulation physique suffisant à la formation de gels, aux plus ou moins bonnes propriétés mécaniques.

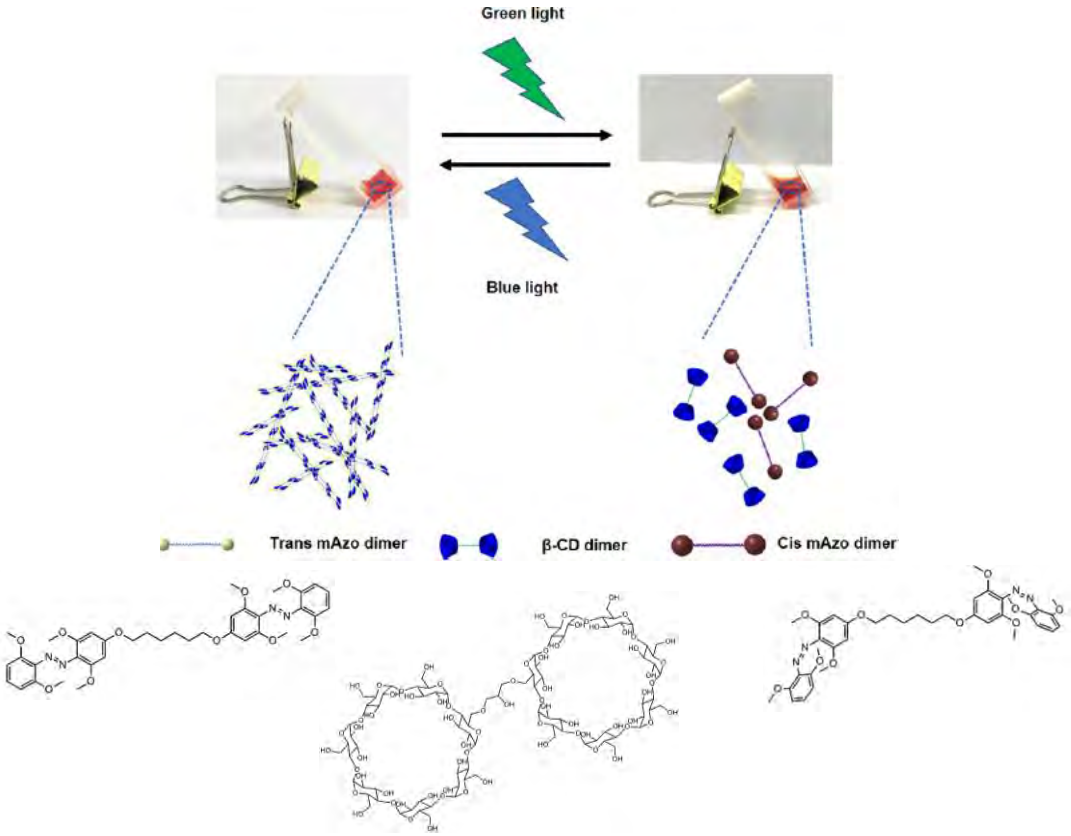


Figure 51: Illustration schématique de la formation d'un hydrogel supramoléculaire basé sur la complexation hôte/invité entre des dimères AZO méthoxylés et β-CD. Image reproduite depuis [166].

Les systèmes répondant dans le visible ont de nombreux avantages sur leurs homologues nécessitant de la lumière UV. Le stimulus est moins néfaste et pénètre mieux les tissus. Ces matériaux sont donc plus adaptés à des applications biologiques.

VI.Conclusion et objectifs de la thèse

Cette introduction nous a permis de comprendre le rôle que les hydrogels avaient à jouer dans le domaine de la biologie et leur importance afin de mieux comprendre certains phénomènes qui nous entourent et nous composent. Ce projet s'intéresse, en particulier, au développement d'un moyen d'étudier les relations entre la rigidité de la MEC et les comportements cellulaires. Pour cela différents gels sont à disposition, des gels chimiques, ou des gels physiques, naturels ou synthétiques. Les liaisons chimiques sont fortes et peuvent former des gels aux excellentes propriétés mécaniques tandis que les liaisons physiques sont stimulables et dynamiques, elles imitent mieux la nature de l'environnement cellulaire. Au cours de ce projet, nous avons voulu combiner les avantages des deux types de gels.

Nous avons choisi de développer un matériau sensible à la lumière. En effet, la lumière est non

invasive et son intensité est facilement contrôlable, elle s'impose donc comme un stimulus de choix dans l'étude d'échantillons vivants. Parmi les nombreuses molécules photo-sensibles, l'azobenzène est certainement l'une des plus utilisées pour son isomérisation facile, rapide par application de stimuli lumineux et sa stabilité thermique. L'interaction hôte/invité entre azobenzène et cyclodextrine est bien connue de la littérature et permet l'obtention de systèmes montrant une transition de phase déclenchée par la lumière. De nombreux groupes de recherche utilisent ces propriétés intéressantes pour créer des matériaux « intelligents », dont les propriétés sont contrôlables par la lumière, pour l'étude du vivant. Cependant, l'isomérisation *trans*→*cis* de l'azobenzène nécessite de la lumière UV, toxique pour des échantillons biologiques et qui ne traverse pas les tissus. Dans le cadre de la mécanobiologie, le développement de nouveaux systèmes stimulables par de la lumière visible s'impose donc peu à peu. Les multiples possibilités de fonctionnalisation de l'azobenzène pour le rendre stimulable dans le visible en font, de nouveau, une molécule idéale pour de telles applications.

Ainsi, les objectifs de ce travail de thèse ont été les suivants :

- choisir un dérivé d'azobenzène stimulable par la lumière visible, possédant des propriétés d'association intéressantes avec la β-CD,
- choisir et fonctionnaliser un polymère pertinent pour la synthèse d'hydrogel à base du dérivé d'azobenzène précédemment sélectionné et de β-CD,
- réaliser la synthèse et la caractérisation d'hydrogels aux propriétés mécaniques proches de celles de la MEC cardiaque.

L'objectif final du projet a été le développement d'hydrogels stimulables par la lumière visible, de façon réversible. Ces hydrogels devaient également être transparents et biocompatibles afin de pouvoir les utiliser pour la visualisation d'échantillons biologiques en microscopie photonique.

CHAPITRE 2

Propriétés physico-chimiques de dérivés d'azobenzène solubles dans l'eau et de leurs complexes avec les cyclodextrines

Dans la littérature, les systèmes photo-stimulables mettant en jeu des interactions azobenzène/cyclodextrines sont déjà décrits pour la conception de matériaux intelligents, de type hydrogels, pour des applications en biologie[164,165,168]. Ces interactions hôte/invités ont l'avantage de produire des matériaux aux propriétés contrôlables de manière réversible par la lumière. L'inconvénient majeur de l'azobenzène hydrogéné est que son isomérisation *trans*→*cis* ne peut avoir lieu que sous irradiation dans l'UV. Ces radiations fortement énergétiques peuvent être mortelles pour les cellules. L'intérêt de synthétiser des plateformes répondant à la lumière visible est donc évident : cela permettrait de stimuler le matériau en présence de cellules. De telles expériences seraient idéales pour étudier la réponse cellulaire à des modifications de leur environnement extérieur (MEC).

Le deuxième chapitre de cette thèse se consacre à l'étude physico-chimique de trois dérivés d'azobenzènes en solution dans l'eau et de leurs interactions avec des molécules hôtes, les cyclodextrines. Dans un premier temps, les propriétés photochimiques d'un premier dérivé d'azobenzène, précédemment synthétisé au laboratoire, ont été étudiées en solution dans l'eau. Ce dérivé d'azobenzène et son utilisation dans la synthèse d'hydrogels répondant à la lumière avait déjà fait l'objet d'un travail de post-doctorat, comme décrit précédemment dans le chapitre 1. L'objectif de ce travail complémentaire est d'examiner en détail les propriétés des complexes supramoléculaires hôte/invité en présence des α-, β- et γ-cyclodextrines. Une approche étape par étape permet de déterminer l'affinité des deux isomères du dérivé d'azobenzène avec les cyclodextrines, la stœchiométrie des complexes, et leurs propriétés spectrales et photochimiques. Dans un deuxième temps, deux dérivés d'azobenzènes stimulables sous irradiation dans le visible sont analysés. Leurs propriétés spectrales et leur capacité à former des complexes sélectifs avec la β-cyclodextrine sont étudiées, en particulier. L'objectif de cette deuxième partie est de choisir le dérivé d'azobenzène qui semble le plus adapté à la conception d'un hydrogel stimulable par la lumière visible pour la biologie.

I. Etude préliminaire d'un azobenzène soluble dans l'eau

L'AZO est beaucoup utilisé dans les synthèses d'hydrogels pour la biologie. Sa solubilité en solution aqueuse est apportée soit en le greffant sur des polymères hydrosolubles, soit en lui ajoutant une courte chaîne POE. Ce dérivé d'AZO a été utilisé précédemment pour la synthèse d'hydrogels photo-sensibles, à rigidité contrôlable. Cette partie s'intéresse à l'étude en profondeur des propriétés photochimiques de ce composé, seul et en présence de cyclodextrines en solution. Ce travail a fait l'objet d'une publication dans *The Journal of Organic Chemistry*[169].

I.1. Méthodologie globale de l'étude

L'objectif de cette étude est de faire une caractérisation la plus complète possible de la complexation d'un azobenzène soluble dans l'eau avec les α-, β- et γ-cyclodextrines. L'azobenzène hydrosoluble choisi est un azobenzène modifié par un groupement oxyéthyléné noté AZO-POE. La nature des complexes ainsi que leurs propriétés cinétiques et spectrales ont été étudiées par une approche étape par étape et déterminées à l'aide de modélisations numériques (Figure 52). La plupart des simulations multiplient les paramètres ajustables afin d'améliorer la qualité des modélisations. Procéder ainsi n'assure pas l'unicité de la solution trouvée. La procédure étape par étape utilisée ici a pour vocation de diminuer au maximum le nombre de paramètres ajustables à chaque étape de modélisation.

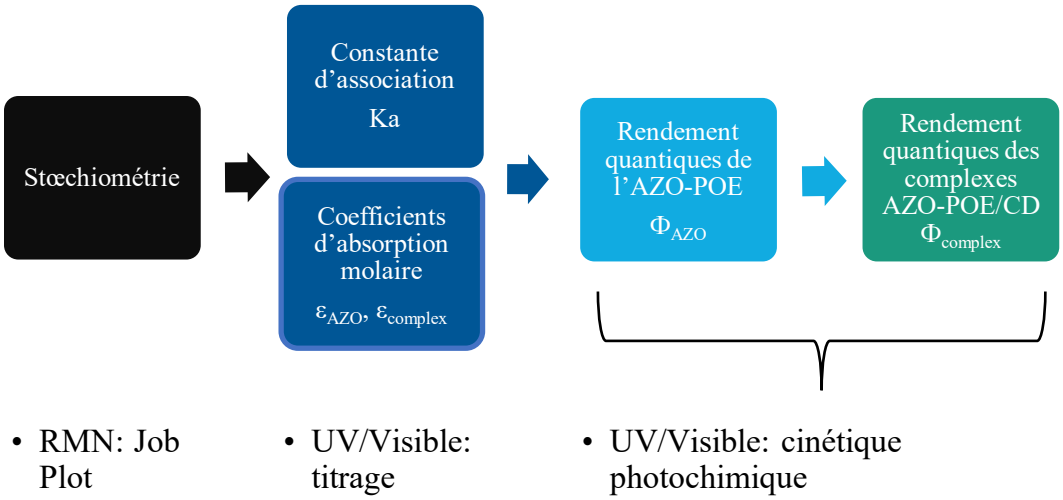


Figure 52 : Procédure étape par étape suivie pour caractériser les complexes AZO-POE/CD.

La première étape a été de déterminer quel isomère, *trans* ou *cis*, de l'azobenzène formait un complexe avec quelle cyclodextrine et selon quelle stœchiométrie. A la suite de quoi, les constantes d'association (Ka) des complexes formés ont été déterminées. Grâce à une analyse préalable de la réaction d'isomérisation photochimique de l'azobenzène libre en solution dans l'eau, il a finalement été possible de déterminer tous les paramètres photochimiques des mécanismes de complexation de cet azobenzène dans l'eau, soumis à des irradiations et en présence de cyclodextrines.

L'ordre dans lequel ces étapes ont été exécutées n'a pas été choisi au hasard. En effet, afin de modéliser les cinétiques des photo-isomérisations de ce dérivé d'azobenzène en présence des différentes cyclodextrines, il est nécessaire de connaître avec exactitude chaque constante d'association. Fixer Ka comme une constante connue permet d'avoir un minimum de

paramètres à optimiser lors de la modélisation, ce qui augmente les chances de converger vers une solution unique et correcte. C'est le même principe pour les paramètres photo-cinétiques : la détermination préalable des paramètres de l'azobenzène seul permet de les fixer comme constants et connus dans la modélisation, plus compliquée, qui implique la formation de complexes avec les cyclodextrines.

Les modélisations mises au point dans ce travail ont été réalisées avec le logiciel SA développé au sein du laboratoire. Il permet, grâce aux équations qui lui sont données pour décrire le modèle de l'expérience, de calculer la variable choisie en fonction d'un ou plusieurs paramètres à optimiser. En comparant le calcul aux valeurs expérimentales, le logiciel sélectionne la valeur du ou des paramètres à optimiser qui permet la reproduction la plus fidèle de l'expérience. Le logiciel et les méthodes utilisées pour la modélisation sont décrites dans la partie expérimentale ainsi que dans l'article que nous avons publié en 2020[169].

I.2. L'azobenzène-POE (AZO-POE)

La synthèse de l'azobenzène substitué oligo(oxyde d'éthylène) en *para* ((E)-2-(2-(2-(4-(phényldiazényl)phénoxy)éthoxy)éthoxy)éthanol), appelé AZO-POE par la suite, et son utilisation pour la synthèse d'hydrogels « intelligents » a été décrite ici et les propriétés du composé ont été étudiées en solution.

I.2.1. Synthèse de l'AZO-POE

La synthèse d' l'AZO-POE a été décrite en détail dans la littérature[165]. En quelques mots, le 4-hydroxy azobenzène A (Figure 53) est synthétisé en deux étapes à partir de l'aniline. La première étape met en jeu une réaction de diazotation de l'aniline en présence d'acide nitreux pour conduire au chlorure de benzènediazonium. Celui-ci réagit en milieu basique dans la deuxième étape, avec du phénol pour donner le composé azoïque A obtenu avec un rendement de 73% sous forme de cristaux orange.

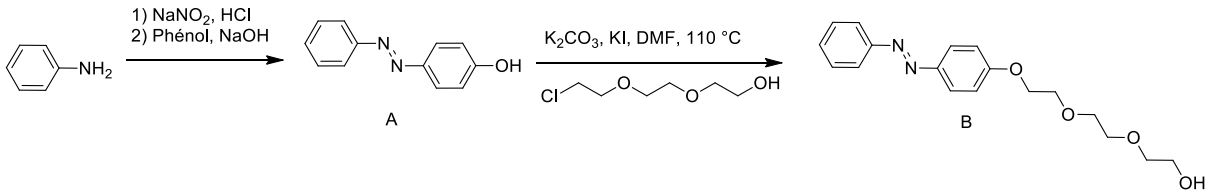


Figure 53 : Schéma de synthèse de l'AZO-POE (B)

Le composé B (Figure 2) est ensuite formé à partir du composé A et du 2-[2-(2-

chloroéthoxy)éthoxy]éthanol en présence d'une base selon une réaction de substitution nucléophile. L'AZO-POE (B) est obtenu sous sa forme *trans*, thermodynamiquement stable, avec un rendement de 81%. On notera par la suite les formes *trans* et *cis* de cet azobenzène respectivement AZO-POE-T et AZO-POE-C.

I.2.2. Teneur en eau de l'AZO-POE

La teneur en eau de l'AZO-POE qui contient une courte chaîne POE potentiellement capable de capter de l'eau a été mesuré. En effet, la connaissance exacte de la quantité d'eau présente dans ces composés est importante de façon à avoir une connaissance plus juste de toutes les concentrations utilisées. De telles mesures ont été effectuées avec un appareil Karl Fischer.
Mise au point pour la première fois en 1935 par le chimiste Karl Fischer, la méthode éponyme permet de doser chimiquement l'eau présente dans un échantillon. En présence d'eau, le diiode est réduit par le dioxyde de soufre selon la réaction (1) :

$$SO_2 + I_2 + 2\ H_2O \Leftrightarrow O_3 + 2\ HI \quad (1)$$

$$I_2 + H_2O + [BNH]^+SO_3R^- + 2\ BN \rightarrow [BNH]^+\ SO_4R^- + 2\ [BNH]^+I^- \quad (2)$$

Le réactif dit de Karl Fischer est une solution de diiode, de dioxyde de soufre et d'une amine organique, ici imidazole (BN) dans un alcool (ROH), le méthoxy-2-éthanol. L'échantillon à doser est injecté dans cette solution. En présence d'eau, le dioxyde de soufre réduit le diiode et les acides ainsi formés sont neutralisés par l'amine, donnant l'équation globale (2). La fin du dosage est détectée par potentiométrie à courant imposé et permet de déterminer très précisément le pourcentage massique d'eau dans un échantillon.
L'AZO-POE, solide, est dissout dans du DMSO séché sur tamis moléculaire activé. Un témoin de DMSO pur est préparé pour déterminer la teneur en eau du solvant. Trois injections sont réalisées et pour chacune d'elle la quantité d'eau est très sensiblement la même que celle du DMSO seul. L'AZO-POE n'est donc pas un composé hygroscopique, il ne capte pas l'eau dans les conditions de conservation utilisées, à savoir à température ambiante et sous argon.

I.2.3. Propriétés spectrales

L'AZO a fait l'objet de nombreuses études grâce à ses propriétés spectrales intéressantes. Sa capacité à passer d'une forme *trans* à une forme *cis* sous stimulation lumineuse l'a rendu pertinent pour des applications « d'interrupteur » chimique. Cependant, l'azobenzène est une molécule organique, insoluble dans l'eau. C'est pour pallier cette difficulté que l'AZO-POE a été développé. Sa courte chaîne oligo(oxyde d'éthylène) greffée en *para* lui confère une certaine solubilité dans l'eau, environ 1 $mg.mL^{-1}$ à température ambiante, au-delà de laquelle il forme

une dispersion.

Pour analyser l'AZO-POE et son isomérisation (Figure 54), une solution à environ 5.10^{-5} mol.L^{-1} dans l'eau déionisée est analysée par spectrométrie UV-Visible. Pour obtenir les isomères *cis* et *trans,* cette solution est respectivement soumise à des irradiation UV (366 nm) ou bleue (415 nm) à l'aide de LEDs. Les puissances des LEDs utilisées ont été déterminées par actinométrie. Les résultats sont donnés dans le paragraphe I.2.4.2.

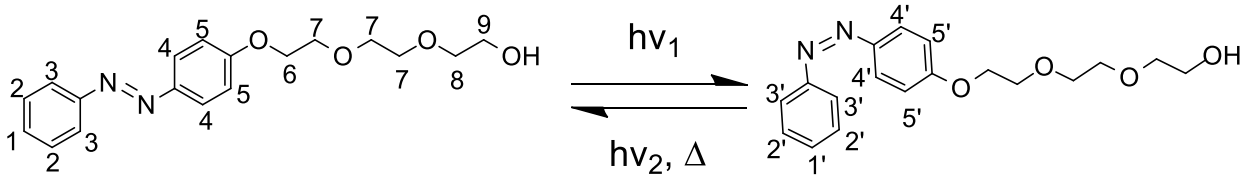


Figure 54 : Réaction d'isomérisation de l'AZO-POE-T en AZO-POE-C.

D'après la Figure 55, les bandes caractéristiques de l'azobenzène, à savoir n→π* et π→π* sont bien visibles. L'AZO-POE-T possède une bande d'absorption π→π* très intense dont la longueur d'onde d'absorbance maximale (λ_{max}) est de 344 nm. L'isomère *cis* absorbe nettement moins dans l'UV et le maximum de sa bande π→π* est déplacé à 312 nm. De plus, l'isomère *cis* possède une bande d'absorption n→π* non négligeable dont le maximum est situé à 430 nm et qui n'est pas présente sur le spectre de l'isomère *trans*. Ces caractéristiques sont tout à fait similaires à celle de l'AZO, bien connu de la littérature[111]. Les isomérisations de l'AZO-POE sont par la suite étudiées en utilisant les LEDs à 366 nm pour l'isomérisation *trans*→*cis* et 420 nm pour la réaction inverse.

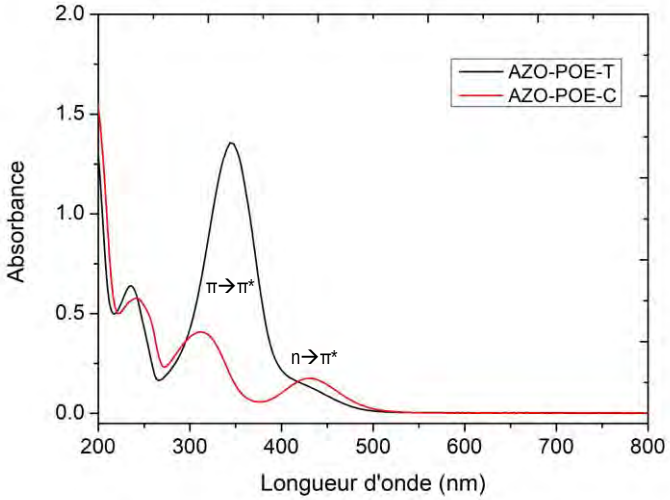


Figure 55 : Spectres d'absorbance UV-Visible de l'AZO-POE sous ses formes trans (noir) et cis (rouge). [AZO]= 7.10^{-5} mol.L^{-1}.

Les bandes n→π* des deux isomères se chevauchant partiellement, la réaction d'isomérisation

ne peut donc pas être complète. L'équilibre donne un mélange où les proportions entre les deux isomères restent constantes, appelé état photostationnaire (PSS pour « photostationnary state »). Grâce à la spectrométrie RMN (Figure 56), il est possible de déterminer la quantité de chaque isomère présent au PSS.

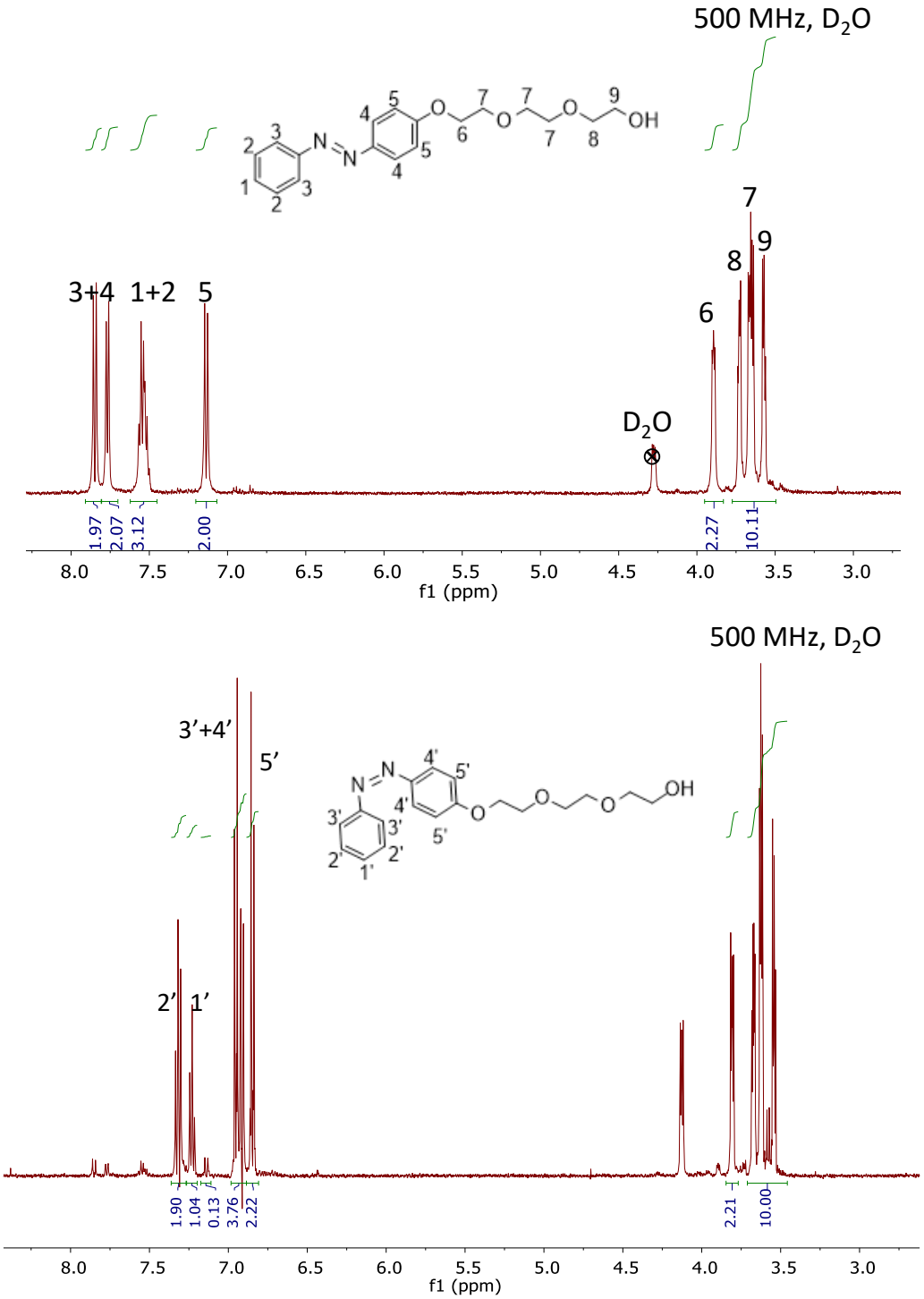


Figure 56 : Spectres RMN ^{1}H de l'AZO-POE-T de départ (haut) et du PSS AZO-POE-C après irradiation à 366 nm montrant un résidu de 5% molaire d'AZO-POE-T (bas). D_2O : 4.28 ppm.

Les signaux aromatiques sont fortement impactés par le changement de configuration de l'AZO-POE. L'équilibre photostationnaire obtenu après isomérisation à 366 nm est fortement déplacé en faveur de l'isomère *cis*. Il ne reste qu'environ 5% molaire d'isomère *trans* dans le PSS *cis* (PSS-C). Les photo-isomérisations de l'AZO-POE et leurs cinétiques ont, par la suite, été étudiées en détail. Pour cela, le système d'irradiation doit tout d'abord être calibré par actinométrie.

I.2.4. Actinométrie

L'actinométrie permet de déterminer l'intensité d'un système d'irradiation par l'étude de la cinétique d'une réaction photochimique complètement connue.

I.2.4.1. Principe de l'actinométrie et résultats

Au cours d'une expérience de photochimie, il est nécessaire de connaître avec précision l'intensité de la source lumineuse utilisée. Avant d'approfondir le comportement photochimique de l'azobenzène, il était donc primordial de caractériser les LEDs utilisées à 366 et 420nm. L'actinométrie est un moyen de parvenir à cette fin. Elle est utilisée par les photochimistes depuis les années 1920s[170] et consiste à utiliser la réaction d'un composé de référence, appelé actinomètre, dont les paramètres photochimiques sont connus afin de déterminer l'intensité I_0 du système d'irradiation. I_0 peut être déterminée en suivant au cours du temps, sous irradiation, la dégradation de l'actinomètre[171]. On choisira l'actinomètre qui absorbe de façon importante à la longueur d'onde d'irradiation et on considérera qu'il se décompose en un produit dont l'absorbance est négligeable à cette même longueur d'onde. De cette façon, l'absorbance totale (A_{tot}) de la solution est égale à l'absorbance de l'actinomètre. L'actinomètre utilisé dans ce travail est le ferrioxalate de potassium. Son équation de décomposition est la suivante :

$$2\ K_3[Fe(C_2O_4)_3] \rightarrow 2\ K_2[Fe(C_2O_4)_2] + K_2C_2O_4 + 2\ CO_2$$

La concentration en actinomètre [Act] au cours du temps dépend de l'intensité lumineuse absorbée (I_a) ainsi que du rendement quantique (Φ) :

$$\frac{-d[Act]}{dt} = I_a.\Phi$$

On peut expliciter I_α comme la différence entre l'intensité lumineuse envoyée par la lampe et celle transmise au récepteur UV-Visible (I) :

$$I_a = I_0 - I$$

Par définition on peut également exprimer l'absorbance totale de la solution comme suit.

$$A_{tot} = -\log(\frac{I}{I_0})$$

On peut déduire de ces trois équations l'équation suivante :

$$\frac{d[Act]}{dt} = -I_0.\Phi.(1 - 10^{-A_{tot}})$$

En supposant que l'on peut choisir la concentration de départ $[A]_0$ telle que l'absorbance totale de la solution à t_0 soit assez grande (> 1) on a $10^{-Atot} << 1$ et l'équation précédente devient la suivante :

$$\frac{d[Act]}{dt} = -I_0.\Phi$$

La loi de Beer-Lambert dit que l'absorbance d'une solution à une longueur d'onde donnée vaut $A = \varepsilon.l.[Act]$ dans son domaine de linéarité avec ε le coefficient d'extinction molaire à la longueur d'onde fixée et l la longueur du trajet optique (en cm). Cela permet d'écrire l'équation précédente telle que :

$$\frac{dA}{dt} = -I_0.\Phi\ \varepsilon.l$$

Cette dernière équation permet d'obtenir I_0 en connaissant Φ et ε avec la pente initiale de la courbe [A]=f(t). La première partie de ce travail a donc été de déterminer les intensités des LEDs à 366 nm et 420 nm dans les conditions des futures expériences de photochimie. Pour cela, on étudie la réaction de décomposition du ferrioxalate simplifiée par l'équation : A → B à deux longueurs d'onde, 366 nm et 420 nm.

De premières expériences d'irradiation du ferrioxalate ont montré que l'intensité maximale de la lampe était trop puissante pour suivre la cinétique de réaction du composé. En effet, la réaction avait lieu beaucoup trop vite pour être suivie par spectrophotométrie UV-Visible. Une grille métallique ne laissant passer que 4,4% de la lumière a été placée en sortie de la fibre optique, devant la cuve en quartz afin de ralentir la réaction. Ce montage est conservé par la suite, pour les expériences d'isomérisation de l'azobenzène et des complexes.

Une fois les spectres acquis au cours du temps pour chaque expérience, l'absorbance de la solution à la longueur d'onde d'irradiation en fonction du temps est tracée pour chaque longueur d'onde. La Figure 57 montre les évolutions de l'absorbance en fonction du temps à 366 nm et 420 nm. Comme attendu, l'absorbance diminue au cours du temps jusqu'à stabilisation.

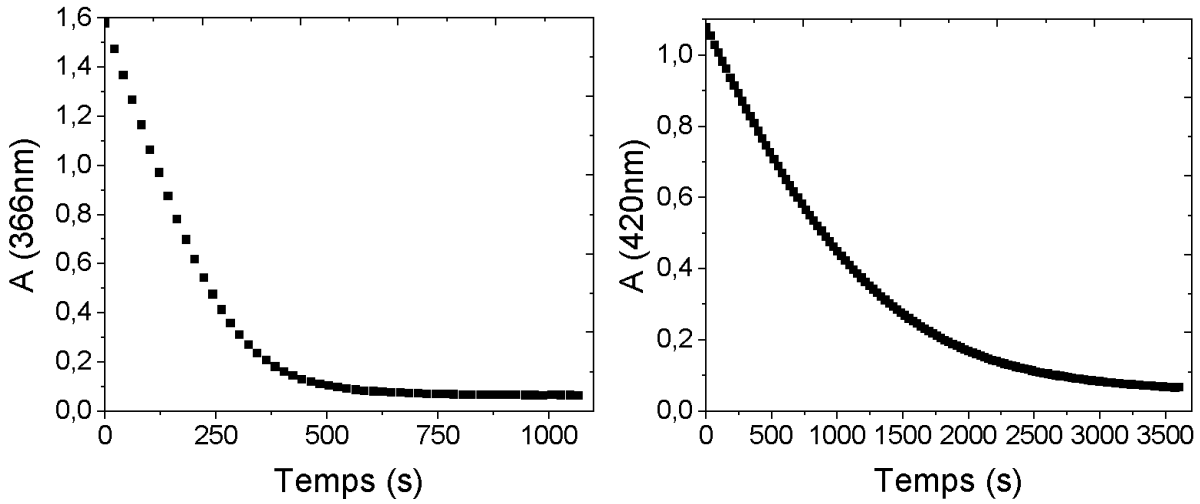


Figure 57 : Suivis cinétiques des actinométries aux deux longueurs d'onde d'irradiation.

Les rendements quantiques et coefficients d'extinction molaire reportés dans la littérature par Hatchard et Parker[172] pour le ferrioxalate pour un jeu de longueurs d'onde sont donnés dans le Tableau 1. Ils sont cependant revérifiés ici : ε_A est ajusté par le logiciel SA de façon à ce que le premier point de la modélisation coïncide exactement au premier point expérimental, avant d'être fixé. Les résultats expérimentaux sont ensuite modélisés avec ε_A et ε_B fixés afin d'accéder à l'intensité I_0 incidente des LEDs, laissée ajustable. Une fois que le logiciel a convergé pour une valeur de I_0, la modélisation est relancée avec en paramètres ajustables I_0 et ε_B afin de voir s'il est possible d'obtenir une meilleure modélisation, minimisant l'erreur, avec d'autres valeurs pour ce couple de paramètres. Si oui, ce seront les valeurs retenues pour ces paramètres. Les valeurs sont extrapolées dans un premier temps pour 420 nm, car les valeurs ne sont pas déterminées dans les tables, puis elles sont ajustées par la suite grâce au logiciel.

Longueur d'onde	**ε_A (L.mol^{-1}.cm^{-1})**	**ε_B* (L.mol^{-1}.cm^{-1})**	**Φ**
366 nm	710	75	1,21
405 nm	200	15	1,14
436 nm	47	2	1,11

Tableau 1 : Paramètres photochimiques de l'actinomètre déterminés par Hatchard et Parker[172].

Dans le Tableau 2 sont regroupés les jeux de paramètres solutions vers lesquels le logiciel a convergé pour les actinométries des LEDs 366nm et 420 nm. Lors de la précédente étude menée au laboratoire par Jorge Royes, une lampe à vapeur de mercure (400 W) équipée de filtres Newport à 365±5 nm ou 436±5 nm avait été utilisée. Cette lampe émet une lumière blanche polychromatique via une fibre optique en amont de laquelle sont placés les filtres afin d'extraire, du spectre d'émission, la radiation d'intérêt. Cette lampe n'émettait pas toujours une

lumière d'intensité stable et celle-ci était bien plus faible que la lumière délivrée par les LEDs, $1{,}3.10^{-6}$ mol.L^{-1}.s^{-1} à 366 nm par exemple.

Longueur d'onde	ε_A (L.mol^{-1}.cm-^{1})	ε_B (L.mol^{-1}.cm-^{1})	Φ	I_0 (mol.L^{-1}.s^{-1})
366 nm	810	35	1.21	$5{,}78.10^{-6}$
420 nm	110	7,5	1.12	$7{,}03.10^{-6}$

Tableau 2 : Paramètres photochimiques de l'actinomètre obtenus expérimentalement dans le cas de notre étude.

Les intensités délivrées par les LEDs sont 5 à 7 fois supérieures à celles délivrées par la lampe à vapeur de Mercure, et plus stables. De plus les intensités mesurées ici, correspondent à 4,4% des intensités totales délivrées par la lampe. Les LEDs sont donc bien plus puissantes que le système d'irradiation précédent, et permettent de travailler avec une plus grande variété de composés photochimiques. Les résultats trouvés par actinométrie sont comparés par la suite à des intensités mesurées au puissance-mètre.

I.2.4.2.Mesure de puissance lumineuse

En parallèle de l'actinométrie, la puissance maximale des LEDs a été mesurée à l'aide d'un puissance-mètre équipé d'une cellule photovoltaïque qui traduit l'intensité lumineuse reçue en puissance électrique en mW.cm^{-2}. On constate, Figure 58, que toutes les LEDs disponibles n'ont pas la même intensité lumineuse. Il est donc probable que les cinétiques d'isomérisation varient en fonction de la LED utilisée.

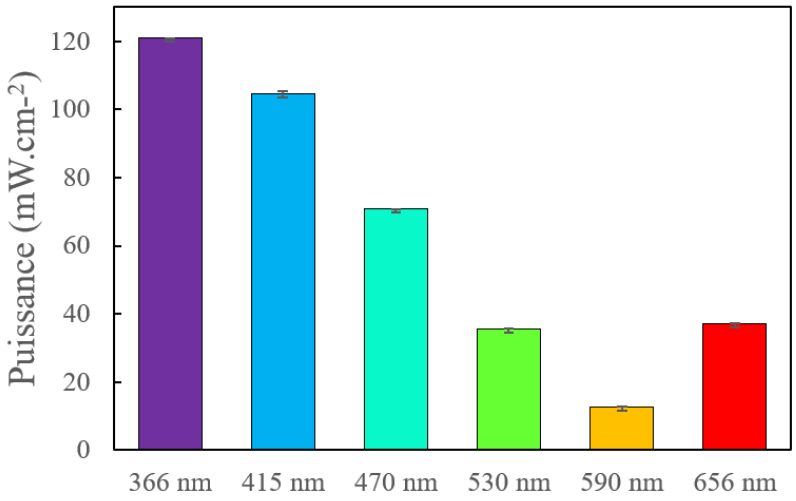


Figure 58 : Histogramme représentant les valeurs moyennes de puissance délivrées par les LEDs par cm^2. Les barres d'erreur représentent l'écart type sur 3 mesures. Une mesure correspond à la moyenne des intensités relevées par le puissance-mètre pendant 1min d'irradiation.

À partir des valeurs de I_0 trouvées par actinométrie, on peut retrouver la puissance de la LED

étudiée. La puissance correspond à un flux lumineux (F) dont la formule est la suivante[171] :

$$F = \frac{I_0 . V_0 . N_A . E_\lambda}{A_0}$$

Avec V_0 le volume de solution irradiée en litre, N_A la constante d'Avogadro, A_0 la surface de la solution directement irradiée en m^2 et E_λ l'énergie d'un photon de longueur d'onde λ d'expression :

$$E_\lambda = h . \frac{c}{\lambda}$$

Où c est la vitesse de la lumière et h la constante de Planck. En estimant la surface irradiée à l'aire de l'extrémité de la fibre optique de rayon 1 mm et en considérant le volume de la solution de 2 mL, on trouve pour la LED à 366 nm F_{366}= 1200 $W.m^{-2}$ = 120 $mW.cm^{-2}$. Cette valeur est bien cohérente avec la puissance mesurée par le puissance-mètre. Par le même raisonnement, on trouve pour la LED à 420 nm, F_{415}= 1300 $W.m^{-2}$ = 130 $mW.cm^{-2}$. Cette valeur est un peu plus éloignée de la valeur mesurée mais l'ordre de grandeur est bien le même. Les intensités trouvées par actinométrie ont bien un sens vis-à-vis des valeurs mesurées au puissance-mètre. L'actinométrie est donc un moyen pertinent de déterminer I_0 pour un système d'irradiation donné.

Les valeurs de I_0 pour les LEDs à 366 nm et 420 nm dont la puissance incidente est maximale et qui sont accompagnées d'une grille filtrante (transmittance = 4,4%) ont été mesurées par actinométrie. Ces valeurs sont considérées constantes pour tout montage identique et seront utilisées comme paramètre constant dans la modélisation des isomérisations de l'AZO-PEO en solution et de ses complexes avec les différentes CDs.

I.2.5. Isomérisation photochimique de l'AZO-POE

L'objectif de l'expérience qui suit, est de déterminer, par suivi cinétique, les paramètres photochimiques, c'est-à-dire les coefficients d'absorption molaires ε_λ et les rendements quantiques Φ, impliqués dans la réaction d'isomérisation de l'AZO-POE (Figure 59).

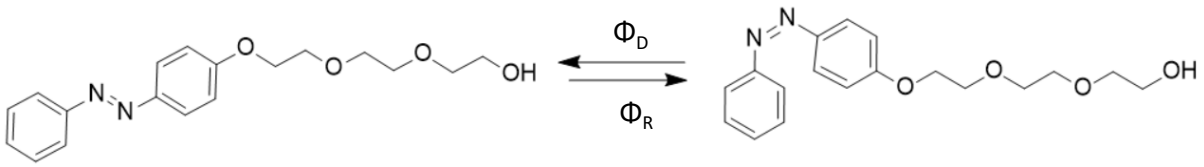


Figure 59 : Schéma de la réaction photochimique d'isomérisation de l'azobenzène.

Une solution à 5.10^{-5} $mol.L^{-1}$ est préparée et sera utilisée pour toute l'étude. L'absorbance de la solution est enregistrée entre 350 et 540 nm. Cette gamme est imposée par l'appareil : au-delà

de cette fenêtre, il n'est plus possible d'étudier une cinétique aussi rapide que celle de cette isomérisation.

I.2.5.1.Suivi de l'irradiation de l'AZO-POE

Les suivis cinétiques sont réalisés pour trois irradiations successives, une première à 366 nm, une seconde à 420 nm et une troisième à 366 nm, qui permettront de valider les paramètres déterminés par l'étude numérique qui suit. Avant de commencer le suivi, une actinométrie de contrôle est réalisée pour vérifier le bon positionnement de la fibre optique sur le montage. La cinétique de cette actinométrie de contrôle est ainsi comparée à celle de l'actinométrie de référence. A concentration identique en actinomètre, le montage est considéré comme correct si les cinétiques se superposent. La cinétique de l'actinométrie de vérification est parfaitement superposable à celle réalisée au préalable pour le calcul de I_0. Les intensités lumineuses incidentes I_0 introduites dans le logiciel SA sont donc celles indiquées dans le paragraphe précédent.

L'évolution de l'absorbance d'une solution d'AZO-POE-T sous irradiation par les LEDs est donc suivie au cours du temps. Les spectres d'absorbance entre 350 nm et 540 nm obtenus à la fin des première et deuxième isomérisations sont tracés sur la Figure 60.

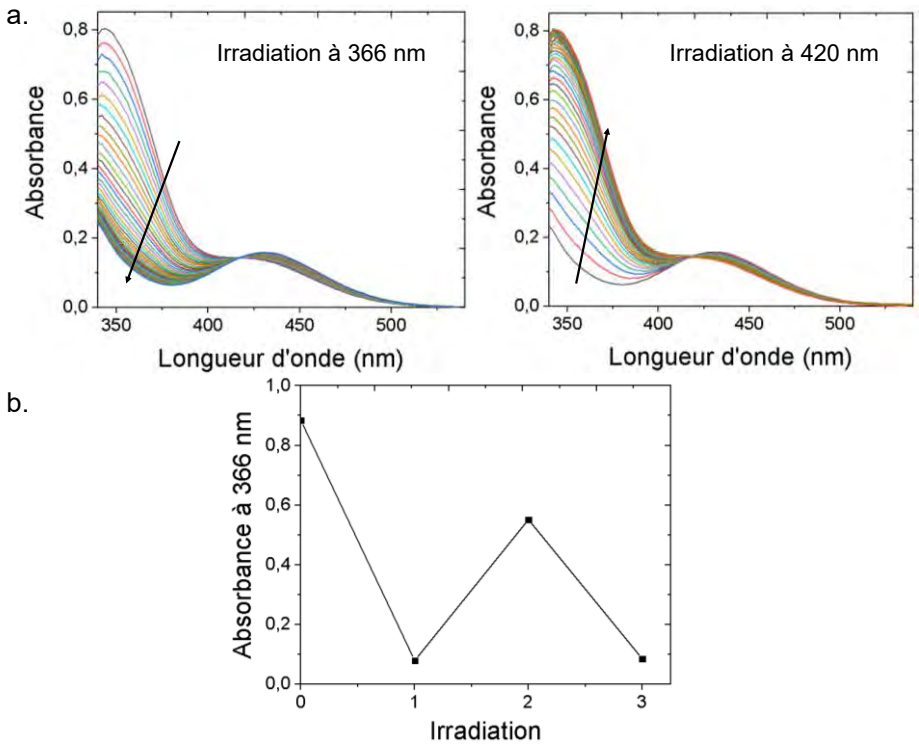


Figure 60 : a. Evolution des spectres d'absorbance UV-Visible de l'AZO-POE au cours des irradiations à 366 nm et 420 nm et b. tracé de l'absorbance à 350 nm après chaque irradiation. 0. Avant irradiation, 1. Première irradiation à 366 nm, 2. Irradiation à 420 nm et 3. Deuxième irradiation à 366 nm. [AZO]=5.10^{-5} mol.L^{-1}.

La fin de la réaction correspond à l'atteinte d'un état photostationnaire et se caractérise par une stabilisation de la courbe A=f(t). On notera l'apparition d'un point isobestique à 416 nm qui confirme la simple transformation *trans* ←→ *cis*. L'irradiation à 420 nm ne permet visiblement pas le retour à un état purement *trans* mais plutôt à un PSS où le *trans* est majoritaire (PSS-T). D'autre part, l'isomérisation *trans*→*cis* par la lumière UV est répétable, malgré le fait que la photochimie ne permette pas d'obtenir la réversibilité complète depuis la forme majoritaire *cis* à la forme quasi-exclusivement *trans* (Figure 60b).

I.2.5.2.Résultats de l'isomérisation de l'AZO-POE

L'AZO-POE en solution dans l'eau a été irradié par deux LEDs, 366 et 420 nm, afin d'étudier ses cinétiques de photoisomérisation de *trans* vers *cis* et de *cis* vers *trans* respectivement. Trois irradiations ont été réalisées à la suite et l'évolution de l'absorbance a été mesurée à la longueur d'onde d'irradiation au cours du temps. Elle a ensuite été modélisée avec le logiciel SA pour chaque irradiation.

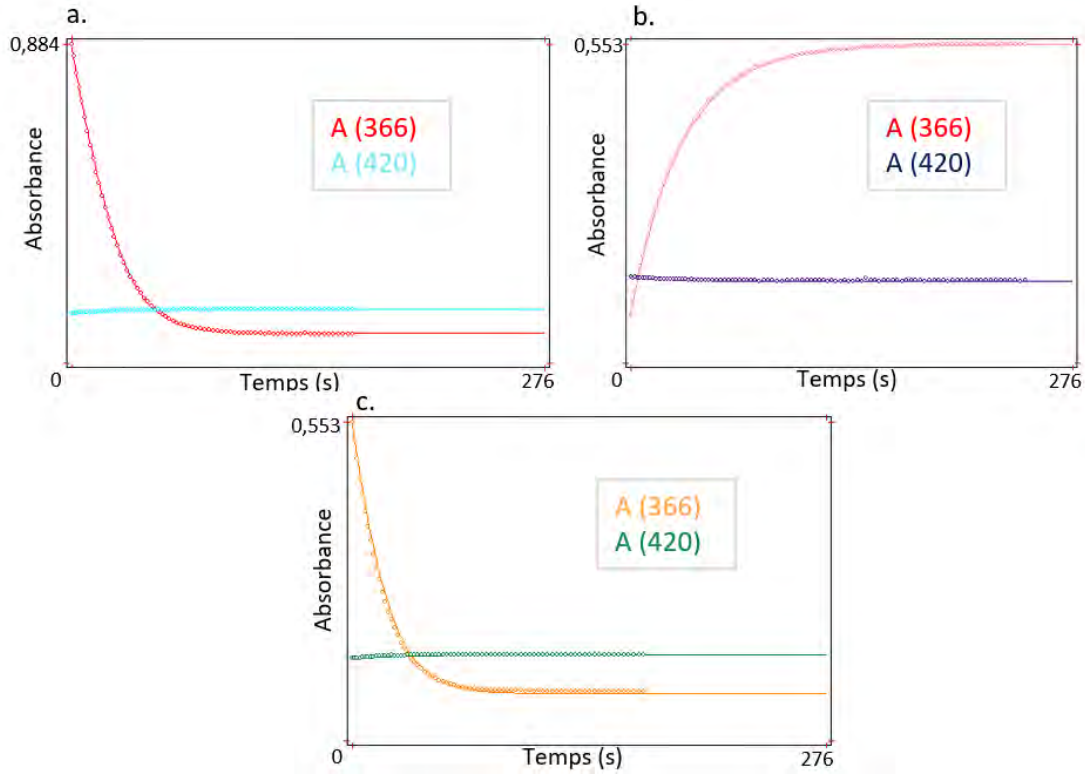


Figure 61 : Résultats graphiques des modélisations sous SA. Tracé de l'absorbance mesurée à 366 nm et 420 nm de la solution d'AZO-POE ([AZO]=5.10^{-5} mol.L^{-1} dans H_2O) en fonction du temps (cercles) et des courbes résultant des modélisations (trait plein) pour les trois irradiations consécutives : (a) première irradiation à 366 nm, (b) deuxième irradiation à 420 nm, (c) troisième irradiation à 366 nm.

La Figure 61 montre la superposition des résultats expérimentaux et de leur modélisation pour

chaque irradiation aux deux longueurs d'onde d'irradiation. L'évolution de l'absorbance à 366 nm montre une amplitude importante pour chaque série et se prête donc mieux à l'extraction de paramètres que l'évolution à 420 nm qui est minimale à cause de sa proximité avec le point isobestique. De plus, point isobestique mis à part, l'analyse de l'absorbance à n'importe quelle longueur d'onde où l'une des deux espèces absorbe doit donner la même information. Les rendements quantiques directs sont extraits de la modélisation de la pente initiale tandis que les caractéristiques de l'état photostationnaire renseignent sur les rendements quantiques indirects, d'après les équations du modèle.

Après les deux premières irradiations et leurs modélisations, la simulation converge déjà vers des solutions représentatives de l'expérience. Tous les paramètres sont alors fixés et le modèle peut prédire les résultats de la troisième expérience, ce qu'il fait avec une grande précision. Finalement tous les paramètres sont ajustés une dernière fois, de façon simultanée en tenant compte des trois irradiations afin de trouver leurs valeurs optimales. La modélisation finale des trois irradiations reproduit très bien les valeurs expérimentales. Les valeurs finales des paramètres optimisés sont données dans le Tableau 3. Les erreurs données dans le tableau proviennent de la variabilité observée sur les valeurs durant la procédure de modélisation. Les valeurs des rendements quantiques déterminées par le modèle ne varient pas à plus de 1,5%.

	AZO-POE
I_0^{366} (mol.L^{-1}.s^{-1})	5,78.10^{-6}
I_0^{420} (mol.L^{-1}.s^{-1})	7,03.10^{-6}
$\varepsilon_{TRANS}^{366}$ (L.mol^{-1}.cm^{-1})	16000±1000
$\varepsilon_{TRANS}^{420}$ (L.mol^{-1}.cm^{-1})	1700±100
ε_{CIS}^{366} (L.mol^{-1}.cm^{-1})	700±100
ε_{CIS}^{420} (L.mol^{-1}.cm^{-1})	2600±300
Φ_D^{366}	0,35±0,01
Φ_D^{420}	0,35±0,01
Φ_R^{366}	0,43±0,03
Φ_R^{420}	0,50±0,03

Tableau 3 : Paramètres photochimiques de la réaction d'isomérisation de l'AZO-POE.

Les rendements quantiques de l'isomérisation *trans*→*cis* trouvés ici dans l'eau sont presque égaux pour les deux longueurs d'onde d'étude et sont plus élevés que ceux trouvés dans la littérature[173,174]. Cependant, les valeurs de la littérature ne sont pas directement comparables aux nôtres puisqu'elles ont été obtenues dans des solvants différents et à d'autres longueurs

d'onde. En revanche, nous avons bien retrouvé des rendements quantiques indirects plus élevés que les directs. Ceci coïncide avec l'étude de Bortolus *et coll.*, où les auteurs ont par exemple trouvé des rendements quantiques à 439 nm pour les réactions directes et indirectes de 0,35 et 0,41 respectivement dans des mélanges eau/éthanol[173]. En conclusion, la modélisation de trois isomérisations successives de l'AZO-POE permet de reproduire par le calcul les courbes de cinétiques expérimentales avec précision. Les paramètres extraits de ce modèle sont cohérents et la grande justesse de prévision de la troisième irradiation par la modélisation assure leur évaluation correcte.

Les paramètres de l'AZO-POE seul maintenant connus, ils sont fixés comme constants pour la détermination des paramètres photochimiques de cette molécule complexée avec différentes CDs. Avant de pouvoir étudier les cinétiques d'isomérisations des complexes, il a été nécessaire de déterminer les propriétés de ceux-ci, mettant en jeu les deux isomères de l'AZO-POE et les α-, β-, et γ-CD. L'existence et la stœchiométrie de ces complexes ont été tout d'abord mises en évidence, puis les constantes d'associations de ces complexes ont été mesurées par spectroscopie UV-Visible.

I.3. Formation et caractérisation de complexes supramoléculaires avec les cyclodextrines

Les azobenzènes sont connus pour posséder une certaine facilité à entrer dans la cavité hydrophobe des cyclodextrines et former ainsi un complexe hôte/invité répondant à la lumière[175]. Ces assemblages sont formés par des interactions intermoléculaires faibles, notamment les interactions de Van der Waals. Dans la littérature, différentes méthodes et techniques ont été employées pour caractériser les complexes hôte/invité (Annexe 1). Certaines méthodes telles que la RMN et l'ITC (titrage par calorimétrie isotherme) par exemple sont plus précises que la spectrophotométrie UV-Visible par exemple et semblent donc être plus adaptées à la détermination de constantes d'association. Cependant dans certains cas, une analyse UV-visible suffit à apporter l'information requise et cette méthode est très facile à mettre en œuvre. Quelles que soient les méthodes choisies, l'utilisation de plusieurs d'entre elles est souvent nécessaire. En effet, les techniques reportées dans l'Annexe 1 sont complémentaires et une deuxième méthode permet souvent de vérifier les résultats d'une première. Analyser les résultats donnés par plusieurs signaux différents permet également de limiter l'erreur. Par exemple, en UV-Visible ou en RMN ^{1}H, il est possible d'analyser respectivement le comportement à plusieurs longueurs d'onde ou celui de différents protons. De même,

l'utilisation de différents modèles pour l'extraction des paramètres d'intérêt peut être envisagée. Enfin, l'étude de l'erreur résiduelle permet aussi d'estimer la validité du modèle utilisé[176]. Différentes méthodes seront utilisées ici afin de déterminer les constantes d'affinité (Ka) de l'AZO-POE avec les α-, β- et γ-cyclodextrines.

I.3.1. Teneur en eau des cyclodextrines.

De la même façon que pour l'AZO-POE, la teneur en eau des cyclodextrines a été évaluée par la méthode de Karl-Fischer avant les expériences. Le protocole réalisé est identique à celui décrit pour l'AZO-POE. Les cyclodextrines, solides, sont dissoutes dans un bon solvant, le DMSO, pour être dosées. Des témoins sont préparés pour chaque cyclodextrine. Trois injections sont réalisées pour chaque échantillon permettant de donner des résultats statistiques quant au contenu en eau de chacun des quatre composés à doser. Les résultats sont regroupés dans le Tableau 4.

	Contenu en eau (%massique)
α-CD	12,8 ± 0,3
β-CD	11,7 ± 0,3
γ-CD	7,1 ± 0,3

Tableau 4 : Teneur en eau des différentes cyclodextrines. Les incertitudes sont données sous la forme d'écarts types.

Les cyclodextrines, contiennent une grande quantité d'eau qui peut aller jusqu'à presque 13 % de leur masse pour certaines. Ces valeurs seront prises en compte lors des pesées.

I.3.2. Détermination de la stœchiométrie des complexes d'inclusion

La stœchiométrie des complexes d'inclusion entre une molécule hôte et une molécule invitée est une caractéristique importante dans la définition de l'interaction. C'est un paramètre qu'il est nécessaire de connaître afin de modéliser les propriétés de tels complexes.

I.3.2.1. Tracé de Job et recherche de stœchiométrie

En 1928, Paul Job publia un article dans lequel il étudiait l'association suivante[177] :

$$Tl(NO_3) + NH_3 \rightleftharpoons H_3N - Tl(NO_3)$$

Il propose dans son étude de tracer l'absorbance mesurée en spectrophotométrie UV de la solution en fonction de la fraction molaire de $Tl(NO_3)$ dans le mélange $Tl(NO_3)/NH_3$. Il montre de plus, que pour un complexe A_yB_z entre les molécules A et B, la courbe doit atteindre un

maximum pour [A]:[B] = y:z. Par exemple, un maximum à X ($Tl(NO_3)$) = 0.5, est signe d'une association équimolaire des composés. Un cas idéal est tracé en Figure 62.

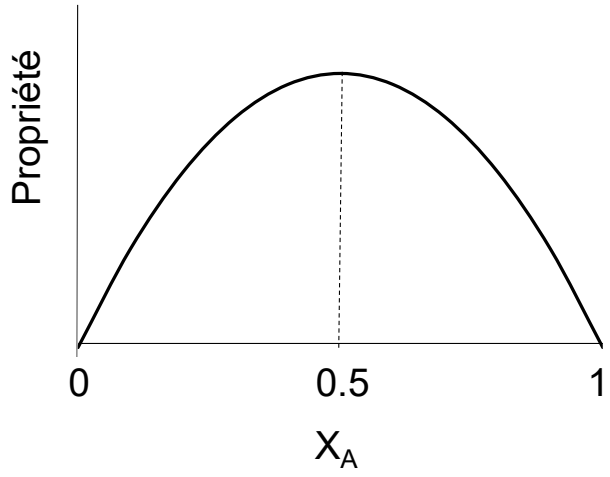


Figure 62 : Graphique de Job théorique pour un complexe 1 :1 idéal.

Le principe de cette méthode est de garder constante la concentration totale d'espèces en solution et de faire varier leurs proportions relatives[178]. L'absorbance UV-Visible est l'ordonnée la plus souvent utilisée, cependant n'importe quelle propriété variant linéairement avec la concentration de complexe peut permettre de tracer ce genre de graphique. La méthode de Job permet donc de déterminer facilement la stœchiométrie d'un complexe. Des modélisations numériques peuvent également permettre de calculer une constante d'association, à partir de données expérimentales[178,179,180]. Cependant, cette méthode considère la formation d'un seul complexe, l'un de ceux évoqués en Figure 63, le plus souvent. Or pour la formation d'un complexe 1:2 par exemple, il peut y avoir présence de complexe 1:1 qui participe également à l'évolution de la propriété étudiée. Dans ce cas, le maximum de la courbe de Job ne sera pas à X_H=0,33 comme l'indique la théorie pour un complexe 1:2 mais plus probablement entre 0,33 et 0,5[176].

$$H + G \rightleftarrows HG \quad \text{complexe 1:1}$$
$$HG + G \rightleftarrows HG_2 \quad \text{complexe 1:2}$$
$$HG + H \rightleftarrows H_2G \quad \text{complexe 2:1}$$

$$K_a^{1:1} = \frac{[HG]}{[H].[G]}$$

$$K_a^{1:2} = \frac{[HG_2]}{[HG].[G]}$$

$$K_a^{2:1} = \frac{[H_2G]}{[HG].[H]}$$

[H] : concentration en molécule hôte
[G] : concentration en molécule invitée
[H_xG_y] : concentration du complexe

Figure 63 : Equations de formation de complexes 1:1, 1:2 et 2:1 accompagnées des calculs des constantes correspondantes.

Pour étudier ce phénomène et les erreurs que les Job Plots peuvent induire, Ulatowski *et coll.* ont réalisé plusieurs modélisations en considérant un système où les complexes 1:1 et 1:2 se forment avec $K_a^{1:1} = 1000\ M^{-1}$ et en faisant varier les valeurs de $K_a^{1:2}$ tel que $K_a^{1:2} < K_a^{1:1}$ ainsi que la concentration totale des molécules hôtes et invitées appelée $[H]_0$. Ils ont observé que pour des concentrations inférieures à 0,01 $mol.L^{-1}$, la forme du Job Plot reste celle d'un complexe 1:1 alors que, lorsque la concentration dépasse 0,01 $mol.L^{-1}$, elle commence à se déformer pour les plus grandes valeurs de $K_a^{1:2}$. Les auteurs ont conclu de ces expérimentations que, pour observer sur une courbe de Job la présence de complexe 1:2, il faut que $K_a^{1:1}[H]_0 \geq 10$. Ils ont également relevé l'importance des valeurs du signal analytique étudié, appelé Y, pour chaque composé en solution. A $K_a^{1:1}$, $K_a^{1:2}$ et [H] constantes, Y_H ou Y_G, Y_{HG} et Y_{HG2} ont une grande influence sur la position du maximum de la courbe de Job mais aussi sur sa forme. Ainsi si tous ces paramètres ne sont pas pris en compte, le risque de tirer une fausse information de la courbe de Job tracée est non négligeable.

Différentes techniques d'analyses ont été choisies pour déterminer la stœchiométrie des complexes entre AZO-POE et CD, à la suite de quoi il a été possible de déduire la technique la mieux adaptée.

I.3.2.2.Détermination de la stœchiométrie de complexes AZO-POE/CD par trois méthodes analytiques

Des premières expériences de construction de graphiques de Job ont été réalisées en utilisant des mesures de spectroscopie UV-Visible. L'absorbance à une longueur d'onde bien choisie de plusieurs solutions hôte/invité a donc été tracée en fonction de la fraction molaire en hôte, ici les cyclodextrines α, β ou γ. La longueur d'onde d'étude choisie est celle où la différence

d'absorbance est la plus importante entre la molécule invitée seule et complexée. Ici on choisira 410 nm (Figure 64).

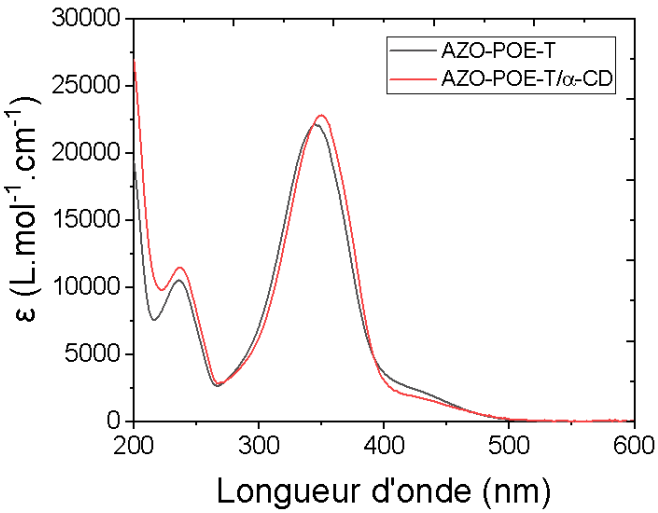


Figure 64 : Spectres d'absorption de l'AZO-POE-T seul (noir) et complexé par la α-CD (rouge). [azo]= 5.10^{-5} mol.L^{-1} et [α-CD] = 5.10^{-3} mol.L^{-1}.

Les résultats de l'expérience avec l'AZO-POE-T et la α-CD apparaissent Figure 65a. On peut voir que l'amplitude de modification du signal entre l'AZO-POE-T seul et l'AZO-POE-T complexé n'est pas très marquée, une fois les valeurs d'absorbance linéarisées, c'est-à-dire qu'elles sont corrigées par la concentration en AZO-POE afin de comparer des spectres correspondant à la même concentration. En considérant que l'α-CD n'absorbe pas à 410 nm (ε<<1), le graphique de Job pour l'absorbance à 410 nm a été tracé et on trouve bien la forme en cloche qui le caractérise (Figure 65b.).

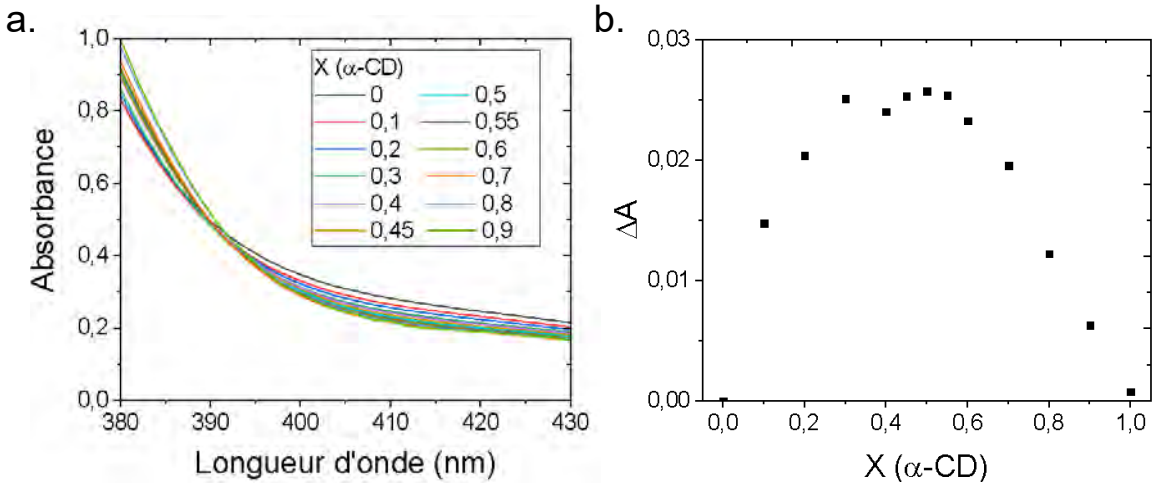


Figure 65 : Construction du graphique de Job pour le complexe AZO-POE-T/α-CD. a. Evolution de l'absorbance avec l'augmentation de la fraction molaire de α-CD dans le mélange. Les valeurs d'absorbance sont linéarisées telles que [AZO]=$9,5.10^{-5}$ mol.L^{-1}. b) Graphique de Job tracé pour l'absorbance à 410 nm. [CD] et [AZO] varient respectivement de 0 mol.L^{-1} et $9,5.10^{-5}$ mol.L^{-1} (point X(CD)=0) à $9,5.10^{-5}$ mol.L^{-1} à 0 mol.L^{-1} (point X(CD)=1).

Ce diagramme de Job ne permet pas de déduire de façon certaine la stœchiométrie du complexe. En effet, même si sa forme laisse suggérer la présence d'un maximum à 0,5, cela ne peut pas être conclu avec certitude. La déformation de la courbe en cloche a pu être due au fait que la préparation de 12 solutions différentes augmente l'incertitude sur la concentration en azobenzène de chaque solution. Les courbes étant corrigées par la concentration en azobenzène, cette incertitude se reporte donc sur le diagramme de Job. La présence d'imprécisions est notamment confirmée par l'absence de point isobestique clair lors de l'ajout d'α-CD. Il ne semble donc pas que la spectroscopie UV-Visible soit la meilleure méthode pour déterminer la stœchiométrie de complexes entre AZO et CD.

Lors de la formation d'un complexe d'inclusion avec la cyclodextrine, celle-ci émet un signal en dichroïsme circulaire qu'elle n'émet pas seule en solution. Cette technique a donc été envisagée pour la détermination de stœchiométrie. Dans la nature, de nombreuses molécules possèdent des propriétés d'activité optique, à condition qu'elles soient chirales. On peut également dire qu'elles ont un pouvoir rotatoire, ce qui se traduit par la présence de deux phénomènes : la rotation optique et le dichroïsme circulaire (DC). Ces milieux, optiquement actifs, ont la capacité de faire tourner le plan de polarisation d'une lumière polarisée qui les traverse. La théorie de Fresnel dit que toute onde plane est la superposition de deux ondes polarisées circulairement de mêmes amplitudes, l'une droite (E_d) et l'autre gauche (E_g) (Figure 66). Dans un échantillon contenant un milieu optiquement actif, ces deux ondes ne se déplacent pas à la même vitesse ce qui génère un déphasage des vecteurs $\vec{E}_d$ et $\vec{E}_g$, on dit que l'onde résultante présente de la biréfringence circulaire. La lumière en sortie d'échantillon est alors toujours polarisée dans un plan mais ce plan est différent du plan de polarisation de la lumière incidente. L'angle de rotation α exprimé en radian, dont a tourné le plan de polarisation est défini comme :

$$\alpha = \frac{\pi}{\lambda}.(n_g - n_d).l$$

avec n_g : l'indice de réfraction pour la lumière polarisée circulairement gauche,

n_d : l'indice de réfraction pour la lumière polarisée circulairement droite,

l : le trajet optique dans le milieu en cm,

λ : la longueur d'onde de la lumière incidente en nm.

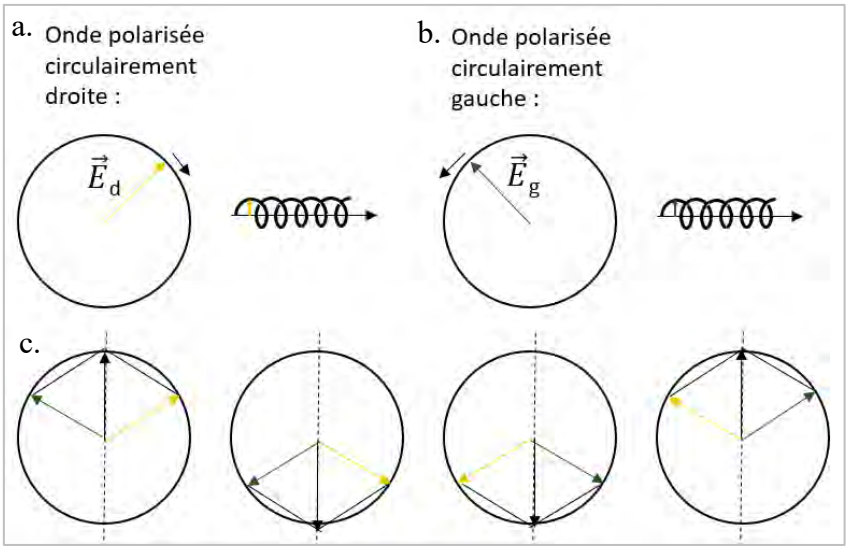


Figure 66 : Schémas représentant a. le cercle décrivant la projection de l'extrémité du champ $\vec{E}_d$ et trajectoire décrite par cette extrémité, b. le cercle décrivant la projection de l'extrémité du champ $\vec{E}_g$ et trajectoire décrite par cette extrémité et c. la construction de Fresnel montrant que la superposition de lumières polarisées droite et gauche de même amplitude (flèche noire) donne une lumière polarisée dans un plan représenté ici en pointillés.

L'angle α varie avec la longueur d'onde. La courbe α = f(λ) est appelée spectre de dispersion optique rotatoire. Dans le cas où la molécule étudiée, en plus d'être optiquement active, possède une ou plusieurs bandes d'absorption, cette courbe prend une allure particulière, « anormale », aux longueurs d'onde auxquelles la molécule absorbe la lumière. Au niveau d'une bande d'absorption, la rotation change de signe en s'annulant pour $\lambda = \lambda_a$ (Figure 67). Cet effet est appelé l'effet Cotton. Il est qualifié de positif si $\alpha > 0$ pour $\lambda > \lambda_a$ et de négatif si $\alpha < 0$ pour $\lambda > \lambda_a$. De plus, dans le domaine spectral où le milieu absorbe, les lumières polarisées circulairement droite et gauche ne sont pas absorbées avec la même intensité. Les normes des vecteurs $\vec{E}_d$ et $\vec{E}_g$ ne sont plus égales, la lumière qui sort de l'échantillon est donc polarisée elliptiquement. Ce phénomène est appelé dichroïsme circulaire.

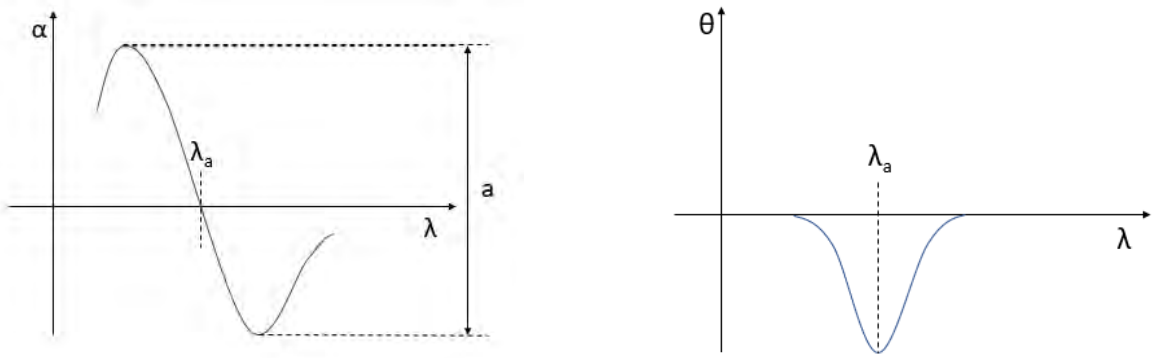


Figure 67 : Courbe de dispersion optique rotatoire (gauche) et de dichroïsme circulaire (droite) au niveau d'une bande d'absorption dans le cas d'un effet Cotton négatif dont l'intensité est caractérisée par a.

Un spectromètre à dichroïsme circulaire fonctionne sur le même principe qu'un spectromètre UV-Visible. Il possède en plus un filtre de polarisation qui polarise rectilignement la lumière incidente et un modulateur photoélastique, placé juste entre le polariseur et l'échantillon, qui module alternativement cette lumière en onde polarisée circulairement droite et gauche. Après avoir traversé la cuve de l'échantillon, le signal analysé est la différence d'absorbance ΔA entre la lumière polarisée circulairement gauche et droite (Figure 68). Pour chaque longueur d'onde, l'ellipticité moléculaire [θ] exprimée en degré.cm^2.dmol^{-1} est calculée par la relation :

$$[\theta] = 3300.\Delta\varepsilon$$

Avec $\Delta\varepsilon = \varepsilon_g - \varepsilon_d$: la différence des coefficients d'extinction molaire gauche et droit en L.$mol^{-1}.cm^{-1}$, proportionnelle à ΔA.

La courbe représentant [θ] = f(λ) est appelée spectre de dichroïsme circulaire.

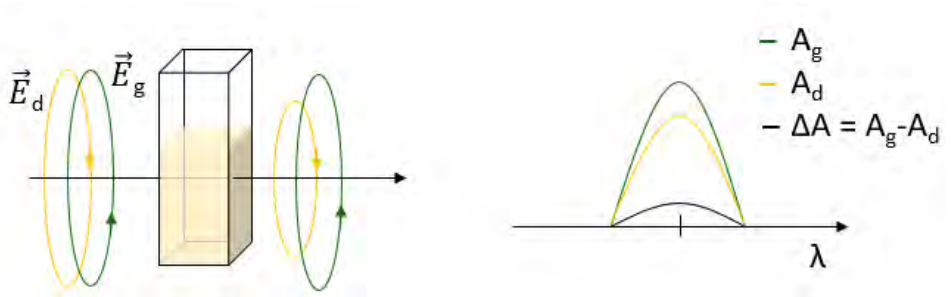


Figure 68 : Principe du dichroïsme circulaire.

Les cyclodextrines, composées d'unités D-glucose chirales ont la capacité d'induire une réponse en DC de molécules invitées. Cette réponse se traduit par l'apparition des bandes d'absorption des molécules invitées[181,182,183]. Cette technique permet donc d'observer la formation de complexes et de déterminer leurs géométries. Pour des complexes de cyclodextrine, les transitions électroniques de la molécule invitée qui sont polarisées le long de l'axe long de la cyclodextrine induisent un effet Cotton positif en DC. A l'inverse, les transitions électroniques polarisées le long de l'axe court induisent un effet Cotton négatif[184]. L'AZO-POE et les différentes CDs ont été mis en solution dans l'eau et observés en DC. Il apparaît que ces composés seuls n'émettent pas de signal, ou un signal faible, dans les conditions de l'expérience[169]. A *contrario*, lorsque l'AZO-POE-T est mélangé à l'α-CD, un effet Cotton centré sur les bandes π→π* et n→π* de l'azobenzène apparaît très nettement, confirmant ainsi un transfert de chiralité de la cyclodextrine à l'azobenzène et donc la formation d'un complexe (Figure 69a.). Le spectre du mélange AZO-POE-C avec la α-CD n'est quant à lui pas différent de celui de l'AZO-POE-C seul, ce qui suggère que cette cyclodextrine n'a pas

la capacité de complexer l'AZO-POE-C. Cela pourrait être lié à la taille de la cavité de l'α-CD qui aurait la place d'accueillir l'AZO-POE-T plan mais pas sa forme *cis* plus volumineuse.

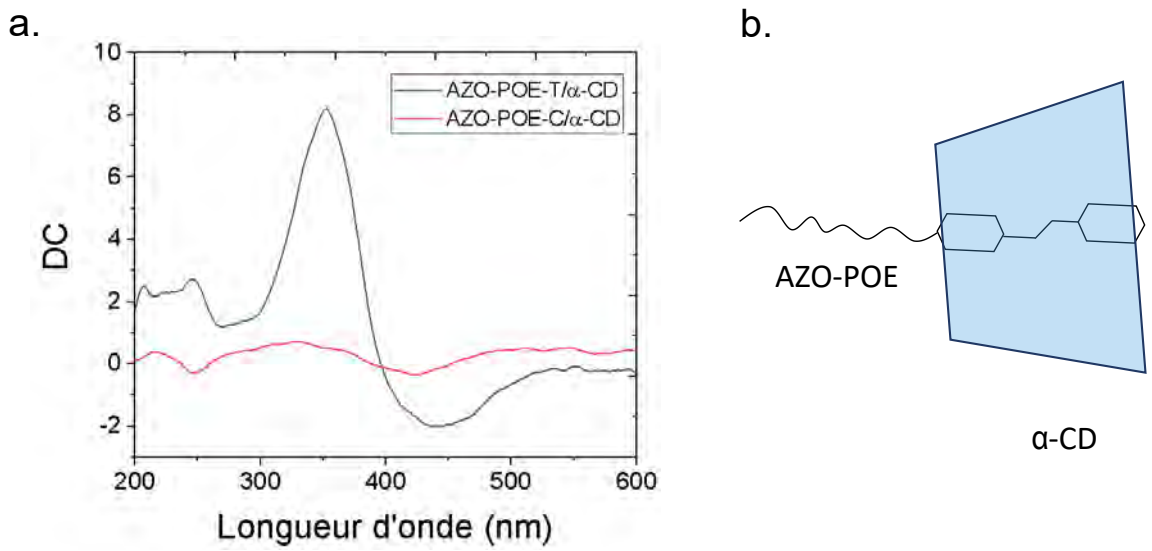


Figure 69 : a. Spectre de dichroïsme circulaire des AZO-POE-T et AZO-POE-C dans l'α-CD soulignant l'activité optique de l'association AZO-POE-T/α-CD. b. Schéma de l'association de l'AZO-POE-T avec l'α-CD. [azo] = 5.10^{-5} mol.L^{-1} et [α-CD] = 5.10^{-3} mol.L^{-1}.

D'autres solutions d'AZO-POE avec les β- et γ-CD ont été préparées et observées en DC (résultats non présentés, disponibles dans l'article et les informations supplémentaires de Royes *et coll.*[169]). En présence de β-CD, le mélange donne un signal pour les deux isomères. Ces deux complexes génèrent des signaux différents en DC car la géométrie est différente d'un isomère à l'autre et donc la géométrie des complexes diffère. De plus, à concentration d'AZO-POE et de CD identiques, égales à 5.10^{-5}mol.L^{-1}, l'intensité du signal généré par la complexation de l'isomère *trans* par la β-CD est moins intense que celle induite par la formation du complexe AZO-POE-T/α-CD. Cela signifie que l'α-CD établit des interactions plus fortes avec l'AZO-POE-T que la β-CD. Cependant, il apparaît que la β-CD contrairement à l'α-CD, a la capacité de complexer l'isomère *cis*.

La γ-CD, de même que l'α-CD, semble ne complexer que l'isomère *trans*. Une hypothèse sur la raison pour laquelle l'isomère *cis* ne forme pas de complexe dans ce cas est que la γ-CD doit avoir une cavité trop grande. Cette différence de taille par rapport à la β-CD est peut-être la source d'interactions trop faibles entre les molécules hôte et invité dans sa géométrie *cis*, ce qui ne permet pas la formation d'un complexe stable dans le cas de la γ-CD avec l'AZO-POE-C.

Le DC donne également des informations sur la géométrie de la molécule invitée à l'intérieur de la CD. Le spectre du complexe AZO-POE-T/α-CD possède une bande positive vers 350 nm

de grande intensité et une deuxième bande d'intensité plus faible vers 440 nm qui correspondent respectivement aux absorbances π→π* et n→π*. Il en va de même pour les complexes AZO-POE-T/β-CD et AZO-POE-T/γ-CD. Ces résultats suggèrent que les trois cyclodextrines formeraient des complexes de géométries similaires, accueillant les azobenzènes hôtes en position axiale dans leur cavité (Figure 69b.)[140].

Le DC permet de mettre en évidence la formation ou non de complexes entre AZO-POE et CD. Des expériences ont été menées pour essayer de déterminer, par la méthode de Job, la stœchiométrie de ces complexes. Il existe dans la littérature quelques exemples de graphiques de Job réalisés en DC[184,185]. Par exemple, Shimizu *et coll.* ont étudié la complexation de plusieurs dérivés de benzène dans la β-CD par dichroïsme circulaire[184]. Sur la Figure 70, les spectres d'absorption, de dichroïsme circulaire ainsi que le diagramme de Job pour le complexe entre acide benzoïque et β-CD sont représentés. Ce diagramme de Job est construit en traçant l'ellipticité observée à 282 nm en fonction de la fraction de molécule invitée. Il permet de conclure sur une stœchiométrie 1:1 car il montre un maximum pour $X_{invité}$= $X_{hôte}$= 0,5.

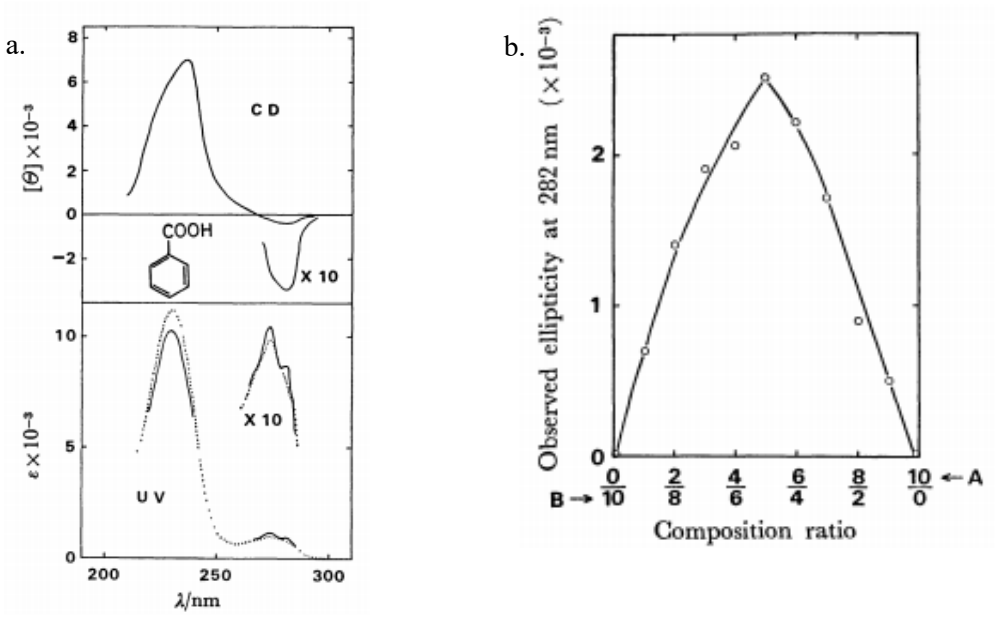


Figure 70 : a. Spectres de dichroïsme circulaire (haut) et d'absorption (bas) du complexe acide benzoïque/β-CD. Pointillé : molécule invitée en l'absence de β-CD. b. Diagramme de Job pour le complexe acide benzoïque(B)/β-CD(A) avec la concentration totale constante de 32,92.10^{-3} mol.L^{-1}. Schémas reproduits depuis Shimizu *et coll.*[184].

La Figure 71 montre un exemple de graphique de Job déterminé à partir de résultats de DC pour le complexe AZO-POE-T/α-CD. Dans l'exemple précédent, l'ellipticité variait avec une amplitude d'environ 2 mdeg au cours du diagramme de Job. Or ici, le signal ne semble pas varier d'une amplitude supérieure à l'intensité du bruit de fond. L'appareil n'est probablement

pas assez sensible pour détecter de trop faibles variations d'ellipticité. En effet, pour réaliser un diagramme de Job, on se place à des rapports molaires AZO/CD allant de 1 à 0,1 avec une concentration totale de 2.10^{-4} mol.L^{-1} (environ 160 fois moins concentrée que dans l'exemple précédent). Dans cette gamme de concentration et de rapports molaires, la variation de réponse en DC n'est pas aussi importante que lorsque l'on ajoute la cyclodextrine en large excès, ou que les espèces sont plus concentrées. Il est de ce fait difficile d'extraire des données d'une précision nécessaire à la réalisation d'un diagramme de Job. On conclura de ces expériences que le dichroïsme circulaire n'est pas une méthode adaptée à la réalisation de diagramme de Job, ni à la détermination de la stœchiométrie des complexes entre l'AZO-POE et les CDs. En revanche, c'est une méthode qui révèle la formation de ces complexes et donne des informations sur leur arrangement dans l'espace.

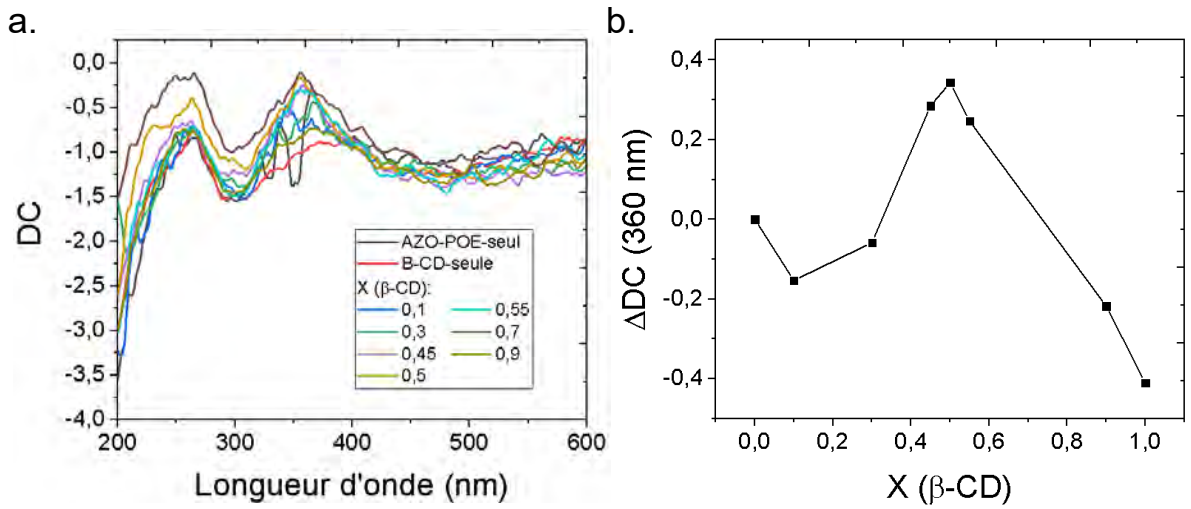


Figure 71 : Construction du graphique de Job pour le complexe AZO-POE-T/β-CD. a. Evolution du signal en dichroïsme circulaire avec l'augmentation de la fraction de β-CD. Il s'agit des spectres bruts lissés. b. Graphique de Job tracé pour le DC à 360 nm. La valeur de ΔDC est pondérée par la fraction d'azobenzène en solution et tracée en fonction de la fraction en β-CD dans la solution.

La troisième technique utilisée pour réaliser un graphique de Job a été la RMN du proton. Lorsqu'une molécule invitée s'insère dans la cavité d'une molécule hôte, l'environnement des protons de la molécule invitée comme celui des protons situés à l'intérieur de la cavité est modifié. Cette modification entraîne un déplacement des signaux correspondants en RMN du proton (Figure 72). Il est possible de suivre ce déplacement pour tracer le diagramme de Job de ces complexes[186, 187].

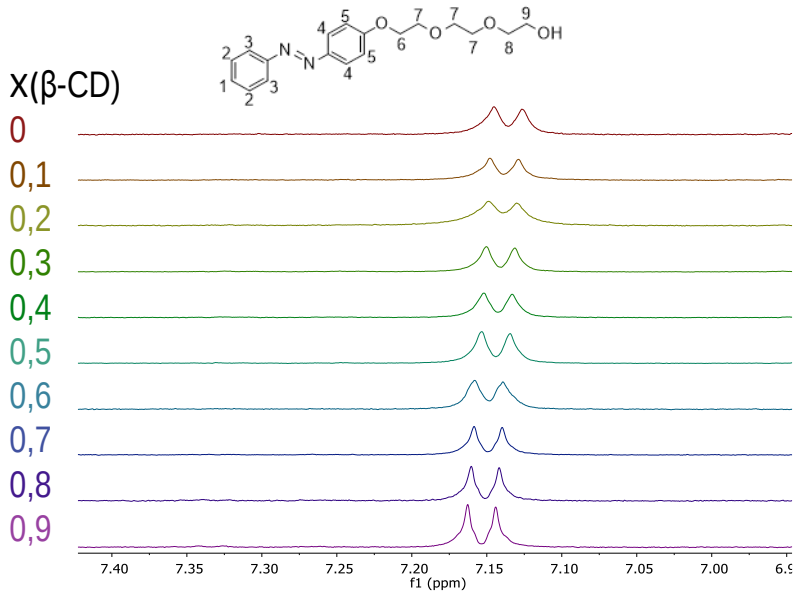


Figure 72 : Superposition de spectres RMN du proton montrant le déplacement du signal des protons 5 de l'AZO-POE-T avec l'accroissement de la fraction de β-cyclodextrine en solution dans D_2O.

De telles expériences ont été réalisées pour les quatre complexes suivants d'AZO-POE-T avec les trois CDs et AZO-POE-C avec la β-CD. Pour les complexes avec l'AZO-POE-T, le signal des hydrogènes aromatiques H5 (5 Figure 54) a été suivi tandis que pour le complexe AZO-POE-C/β-CD, le signal de l'hydrogène H1' a été suivi (1' Figure 54). Les graphiques de Job ont été tracés en Figure 73 pour des solutions dont les concentrations en AZO-POE et CD varient entre 0 $mol.L^{-1}$ et 3.10^{-4} $mol.L^{-1}$ tel que la concentration totale en espèce en solution soit toujours égale à 3.10^{-4} $mol.L^{-1}$. Ces tracés apportent des informations sur la stœchiométrie des complexes étudiés. Pour les trois complexes dans l'α- et la β-CD, les diagrammes de Job possèdent un maximum au point où la fraction de CD est de 0,5. Ceci suggère la formation de complexes 1:1. D'après Ulatowski *et al.,* cependant, une courbe aussi arrondie, voire aplatie au sommet, ne permet pas de conclure avec certitude sur une stœchiométrie 1:1, surtout pour des analyses avec d'aussi faibles concentrations[176]. Il se pourrait que des complexes 1:2 ou 2:1 se forment et ne soient pas visibles sur un tracé de Job. Des stœchiométries 1:1 ont, pourtant, déjà été observées dans la littérature pour de nombreuses molécules dans l'α- et la β-CD[188,189]. De nombreux travaux s'appuient également sur cette stœchiométrie pour la conception de matériaux photo-sensibles grâce aux interactions AZO/CD[145,190]. Ces derniers éléments suggèrent qu'il est raisonnable de penser que les complexes formés ici sont bien de stœchiométrie 1:1.

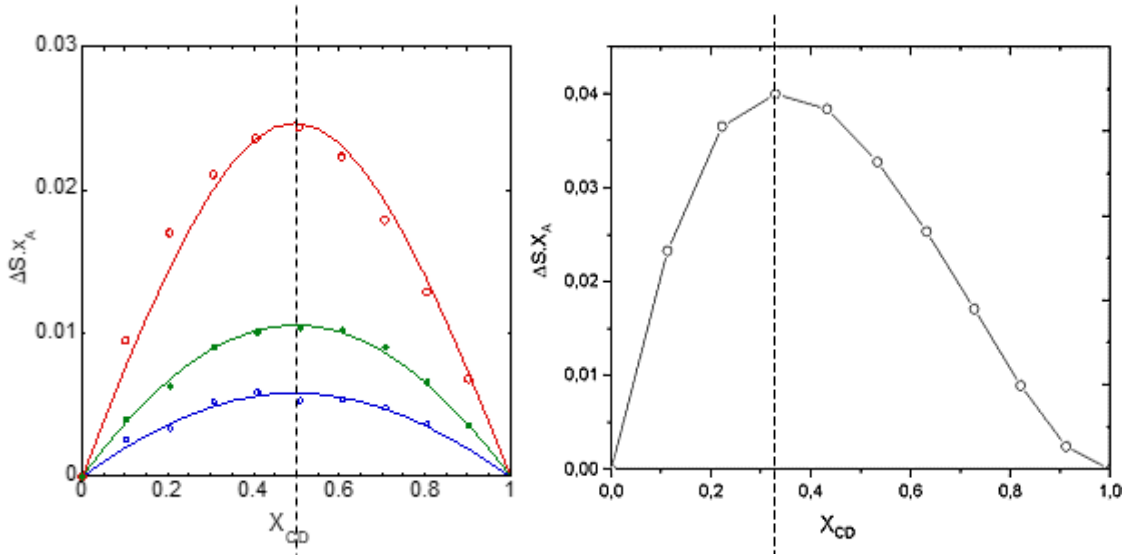


Figure 73 : Diagrammes de Job tracés à partir des données RMN du proton pour les complexes AZO-POE-T/α-CD (rouge), AZO-PEOE-T/β-CD (bleu), AZO-POE-C/β-CD (vert) et AZO-POE-T/γ-CD (gris).

Dans le cas de la γ-CD, la courbe de Job montre un maximum à 0,33, ce qui, selon la théorie de Job, est le signe d'un complexe 1:2, c'est-à-dire que deux azobenzènes entrent dans une γ-CD. La possibilité que la γ-CD puisse complexer deux molécules invitées a déjà été émise dans la littérature[140,191]. Ce phénomène serait dû à la large cavité de cette cyclodextrine (9,5 Å de diamètre intérieur contre 7,8 pour la β-CD) qui peut, dans certains cas, accueillir plusieurs molécules (Figure 74).

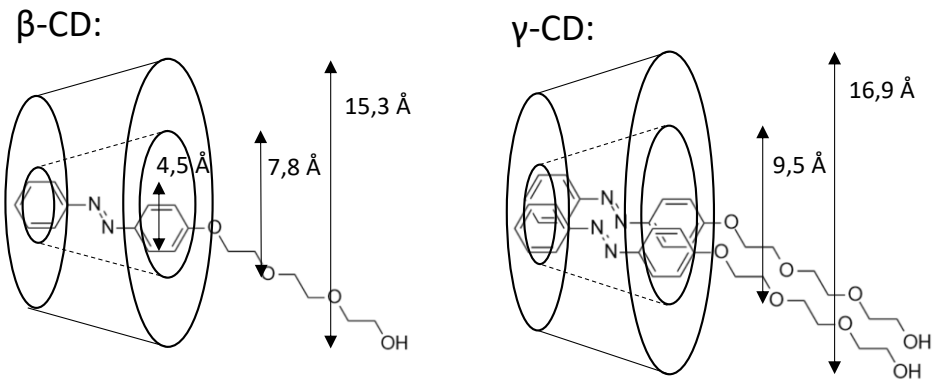


Figure 74 : Représentation schématique des dimensions de l'AZO-POE et des β et γ-cyclodextrines.

Dans leur étude, Ulatowski *et coll.* avaient obtenu un résultat de modélisation dont l'allure ressemblait tout à fait à celle-ci[176]. Pour obtenir une telle courbe, les auteurs avaient supposé que : 1) l'existence de deux complexes, H:G 1:1 et 1:2 avec $K^{1:1} = 4K^{1:2}$ et 2) le signal suivi pour l'étude n'était pas influencé par la formation du complexe 1:1. Cela signifierait, ici, que le complexe 1:1 entre l'AZO-POE-T et la γ-CD serait présent dans le mélange en plus du 1:2 et ne déplacerait pas le signal des protons H5 par rapport au signal de l'AZO-POE-T libre.

De plus, les spectres RMN au cours du titrage évoluent de manière non triviale (Figure 75) ce qui laisse penser que plusieurs phénomènes ont lieu : un premier qui fait tendre le signal du H5 vers de plus petits déplacements chimiques et un second qui le fait varier en sens opposé. La présence d'un système à deux complexes en équilibre pourrait expliquer cette observation : un premier où une molécule d'AZO-POE-T entre dans une cavité de γ-CD et un second où deux molécules d'AZO-POE-T entrent dans une même γ-CD.

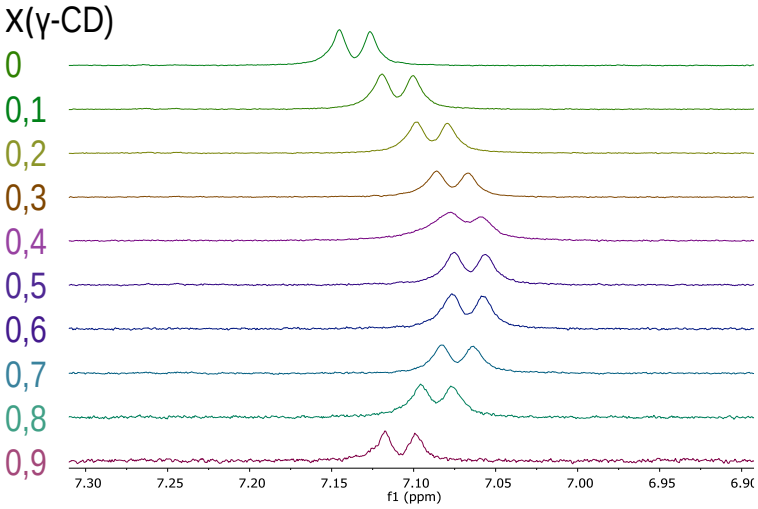


Figure 75 : Evolution des spectres RMN du proton montrant le déplacement du signal des H5 de l'AZO-POE-T avec l'accroissement de la fraction de γ-cyclodextrine en solution dans D_2O.

Pour étudier cette hypothèse, les évolutions des signaux de deux autres protons de l'AZO-POE-T (H3 et H4) sont suivies de la même façon que pour H5 et deux autres diagrammes de Job sont tracés. D'après la Figure 76, le suivi de trois protons différents donne exactement la même courbe de Job. Il semble peu probable que la formation d'un complexe 1:1 ne modifie l'environnement d'aucun de ces trois noyaux. La complexation entre AZO-POE-T et γ-CD n'est donc peut-être pas similaire à celle de l'exemple décrit par Ulatowski *et coll.* Le cas le plus probable est que la γ-CD forme un complexe unique 1:2 avec l'AZO-POE-T dans l'eau.

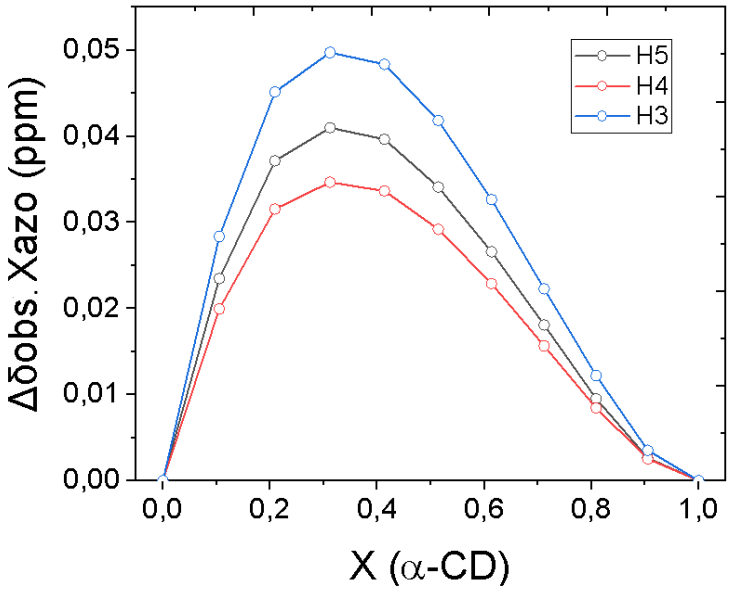


Figure 76 : Diagrammes de Job tracés à partir des variations des déplacements chimiques des protons H3, H4 et H5 de l'AZO-POE-T en RMN du proton pour le complexe AZO-POE-T/γ-CD. Les tracés noir, bleu et rouge sont des guides pour les yeux.

La spectroscopie RMN du proton s'est donc avérée être l'outil le plus pertinent pour évaluer la stœchiométrie des complexes entre AZO-POE et CDs grâce à la méthode de Job. Cependant, en règle générale, la cinétique de formation du complexe peut influencer le choix de la méthode à utiliser. Plusieurs études ont été menées au sujet de l'étude de la cinétique de complexation entre hôte et invité. Les cucurbiturils sont des molécules hôtes beaucoup étudiées. La cinétique de formation de complexes à base de cucurbituril est très rapide, proche des phénomènes de diffusion. Dans ce cas, la constante d'association des complexes contrôle la cinétique des échanges. Des complexations très stables ($Ka>10^5$ $L.mol^{-1}$) entre des amino-alcanes invités et la molécule hôte cucurbit[6]uril ont été étudiées et leur cinétique de formation et d'échange est assez lente pour être observée au cours d'analyses RMN[192]. Les auteurs ont ainsi pu suivre la cinétique des échanges entre hôtes et invités à différentes températures, en observant les signaux de protons des molécules libres et complexées. Dans le cas des CDs, les constantes cinétiques liées à la formation de complexes sont loin d'être aussi élevées que pour les CB[n], la constante d'association ne contrôle donc pas la cinétique des échanges. De plus, les échanges entre hôte et invité dans les complexes de CDs sont plus rapides que ceux des CB[n] et que les délais d'analyse de la RMN. Pour étudier la dynamique des interactions hôte/invité dans les cyclodextrines, Lucarini *et coll.* ont proposé de travailler avec des nitroxydes dialkyles radicalaires comme molécules invitées et d'analyser leurs complexes dans les différentes cyclodextrines par spectroscopie à résonnance paramagnétique électronique (RPE)[193]. La RPE

possède des délais d'analyse plus courts que la RMN et permet donc de détecter des signaux distincts pour les nitroxydes libres et complexés par les cyclodextrines. Beaucoup de travaux s'en tiennent cependant à l'étude des propriétés des complexes sans avoir recours à leur dynamique. Dans le cas d'échanges rapides, la complexation induit simplement un décalage de signaux caractéristiques des molécules hôte et invitées visible en RMN. Le suivi de ce décalage au cours de l'ajout d'un composé du complexe permet de déterminer la stœchiométrie, la stabilité du complexe et donne des indications sur sa géométrie[194].

Les résultats finaux obtenus pour les stœchiométries des différents complexes étudiés sont résumés dans le Tableau 5.

	α-CD	β-CD	γ-CD
AZO-POE-T	complexe 1:1	complexe 1:1	complexe 1:2
AZO-POE-C	pas de complexe	complexe 1:1	pas de complexe

Tableau 5 : Récapitulatif des cas de présence et d'absence de complexation entre les isomères de l'AZO-POE et les α-, β- et γ-cyclodextrines. En cas de complexation, la stœchiométrie du complexe est donnée sous la forme H:G.

Les stœchiométries ainsi déterminées sont utilisées dans la suite du travail, pour la modélisation des équilibres lors de l'étude cinétique de l'isomérisation de l'AZO-POE en présence des différentes cyclodextrines. Pour des molécules invitées absorbant dans l'UV ou le visible, comme c'est le cas des AZOs, la spectroscopie UV-Visible a beaucoup été utilisée afin de déterminer des constantes d'association dans les cyclodextrines[164,195]. Il est nécessaire, pour cela, que la molécule invitée complexée ait des propriétés spectrales différentes de la molécule libre.

I.3.3. Détermination de constantes d'associations (Ka)

En plus de la stœchiométrie, les complexes hôte/invité sont définis par une constante d'association (Ka). Il s'agit d'une grandeur qui traduit la stabilité du complexe. Plus elle est grande, plus le complexe est stable et plus les échanges en solution entre la forme complexée et décomplexée sont lents. Au contraire, plus cette constante est faible, moins le complexe est favorisé et plus les échanges entre la forme complexée et la forme décomplexée sont rapides[196]. Il s'agit également d'un paramètre important dans la modélisation du comportement photochimique des complexes entre AZO-POE et CDs. Ainsi les constantes des complexes déterminés précédemment ont été déterminées par titrage de la molécule invitée par la molécule

hôte dans l'eau, en spectroscopie UV-Visible.

La méthode de titrage, ou dosage, est très employée pour la détermination de constantes d'associations lors de la formation de complexes entre un composé 1 et un composé 2[197]. Son principe est le suivant : on ajoute le composé 2 à une solution de composé 1. On suit l'évolution d'un signal analytique en fonction de la quantité de composé 2 ajoutée. Ce signal analytique peut être l'absorbance UV-Visible, l'intensité de l'émission en fluorescence, le déplacement chimique d'un proton d'une des deux molécules en RMN ou la chaleur dégagée ou absorbée par la complexation en calorimétrie. Une fois les expériences réalisées, les résultats sont modélisés de la façon suivante : grâce à des équations du modèle, les valeurs du signal sont calculées en faisant varier la valeur de Ka et les coefficients analytiques dépendant du complexe afin que le modèle se rapproche au maximum des points expérimentaux. La stœchiométrie du complexe est fixée, dans ce type d'optimisation, et doit être connue sans erreur, sans quoi on ne peut avoir confiance dans les résultats de la modélisation.

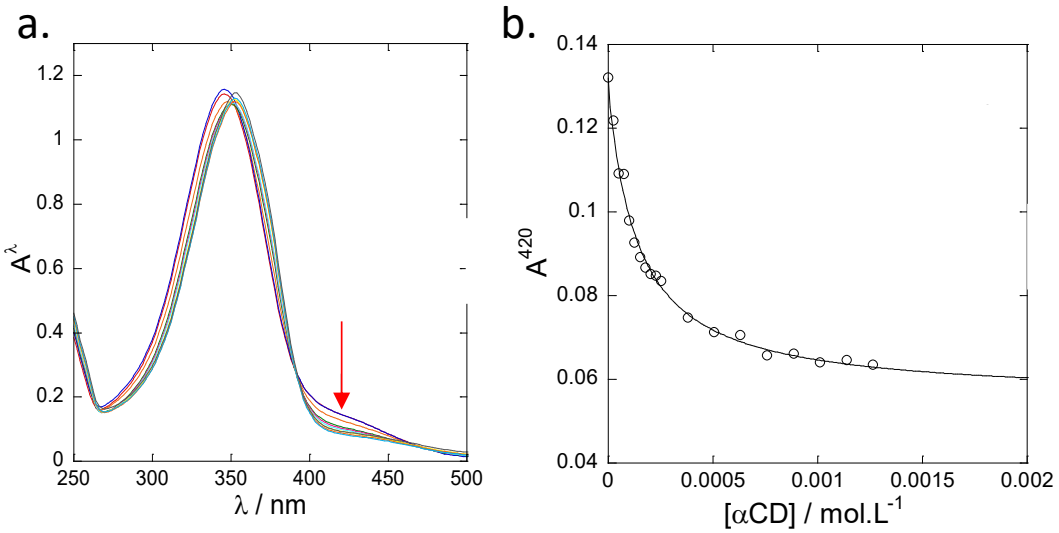


Figure 77 : a. Spectres de l'évolution de l'AZO-POE-T avec l'augmentation de α-CD. La flèche désigne la longueur d'onde où la différence entre le spectre de l'AZO-POE-T libre et celui du complexe est la plus importante. b. Evolution de l'absorbance à la longueur d'onde choisie de l'AZO-POE-T en fonction de la concentration en a-CD de la solution (cercles : données expérimentales, ligne continue : modélisation). [AZO-POE-T] = 5,5.10^{-5} mol.L^{-1} et [α-CD] varie entre [AZO-POE-T]/2 et 100.[AZO-POE-T].

Plusieurs expériences de dosages par spectrométrie UV-Visible ont été effectuées au cours de précédents travaux pour caractériser l'interaction de cet azobenzène avec les différentes cyclodextrines[169]. Les données expérimentales ont été obtenues en enregistrant le spectre d'absorbance de plusieurs solutions contenant toutes la même concentration d'azobenzène et des concentrations de cyclodextrine croissantes. Cette méthode permet, après une modélisation

numérique, d'accéder aux constantes d'associations tout en relevant les coefficients d'extinction molaires des spectres (ε) des complexes ainsi formés. La Figure 77 montre l'exemple d'un résultat de titrage (a.) et de sa modélisation (b.) obtenus dans le cas de la complexation de l'AZO-POE-T par l'α-CD.

La comparaison des spectres pour les différents complexes[169] a souligné que chaque cyclodextrine modifie différemment l'absorbance de la solution d'AZO-POE. Dans chaque cas, λ_{max} est déplacée par rapport à l'AZO-POE libre. Dans le cas de la Figure 77, λ_{max} passe de 346 nm pour l'AZO-POE-T libre à 354 nm pour le complexe. La longueur d'onde où la différence est la plus grande entre le spectre de l'AZO-POE libre et le spectre du complexe est relevée dans chaque cas. La modélisation consiste à calculer l'évolution de l'absorbance à cette longueur d'onde en fonction de la concentration en cyclodextrine pour différentes valeurs de Ka. La valeur de Ka retenue est celle qui minimise l'erreur entre la modélisation et les mesures expérimentales.

En observant les spectres des dosages en présence d'AZO-POE-T, il est possible de détecter un ou plusieurs points isobestiques. La présence de tels points, où l'absorbance totale reste identique au cours de la transformation, indique un échange entre uniquement deux espèces. Ces deux espèces sont de fait, l'AZO-POE-T libre et sa forme complexée la plus probable, déterminée par les diagrammes de Job. Cette observation permet notamment de valider la formation d'un unique complexe 1:1 dans le cas où l'AZO-POE-T interagit avec les α- et β-CD. Pour le cas de la γ-CD, même si l'on considère que la formation d'un complexe 1:1 avant le complexe 1:2 est probable, la présence de points isobestiques indique que, pour les gammes de concentration du titrage, la forme complexée 1:1 est non détectable. Par la suite, seul l'équilibre direct entre l'AZO-POE-T libre et le complexe 1:2 sera donc considéré.

La complexation de l'AZO-POE-C avec la β-CD ne semble pas montrer de points isobestique[169]. Cependant, en considérant les éléments bibliographiques discutés précédemment, le fait que pour des raisons de dimension, la β-CD ne peut probablement pas complexer deux azobenzènes et que l'isomère *trans* forme un complexe 1:1 avec la β-CD, on peut affirmer avec quasi-certitude que l'AZO-POE-C forme bien un complexe de stœchiométrie 1:1 avec la β-CD.

Lors de la modélisation, les paramètres connus sont fixés et seuls la constante d'association Ka et le coefficient d'extinction molaire du complexe $\varepsilon_{AZO.CD}$ à la longueur d'onde étudiée sont laissés libres et optimisés. On considèrera les stœchiométries trouvées précédemment ainsi que la présence de 5% d'isomère *trans* dans la solution initiale d'isomère *cis* (Figure 56).

Les écarts types donnés pour les valeurs de Ka et de $\varepsilon_{AZO.CD}$ sont calculés grâce à la variabilité des résultats obtenus pour le traitement d'au moins trois expériences.

Processus	λ (nm)	Ka ($L.mol^{-1}$)	$\varepsilon_{AZO.CD}$ ($L.mol^{-1}.cm^{-1}$)
AZO-T + α–CD ⇌ AZO-*T*/α–CD	420	7000 ± 400	1160 ± 100
AZO-T + β–CD ⇌ AZO-*T*/β–CD	410	3000 ± 200	2370 ± 200
AZO-C + β–CD ⇌ AZO-*C*/β–CD	430	4000 ± 400	2200 ± 200
2 AZO-*T* + γ–CD ⇌ AZO-T_2/γ–CD	346	470000 ± 20000*	37300± 300

Tableau 6 : Tableau donnant les constantes d'affinité pour les complexes AZO-POE/CD et les coefficients d'absorption à la longueur d'onde d'étude pour chaque processus de complexation étudié. Les valeurs sont données à partir de 3 valeurs ou plus. * en $(L.mol^{-1})^2$.

Les données obtenues par titrage sont cohérentes avec les résultats de dichroïsme circulaire. La constante d'affinité du complexe AZO-POE-T/α-CD est plus grande que celle du complexe AZO-POE-T/β-CD. Dû à la complexation de deux AZO-POE par la γ-CD, la constante d'association n'est pas exprimée dans la même unité que les trois autres et ne peut donc pas être comparée directement. Pour les valeurs de Ka dans la β-CD, le Tableau 6 donne des valeurs plus grandes que celles généralement trouvées dans la littérature. Par exemple, le groupe de Liu a trouvé des Ka de 840 M^{-1} pour la β-CD avec le 4-hydroxyazobenzène et de 2130 M^{-1} avec le 4-aminoazobenzène (Figure 78) en solution aqueuse[198]. Les auteurs rapportent également que l'ajout d'éthanol à la solution semble déstabiliser un peu les complexes. Rosales *et coll.* examinèrent les Ka entre un azobenzène greffé sur de l'acide hyaluronique (Figure 78) et la β-CD en solution dans l'eau[164]. Les valeurs trouvées sont de 760 M^{-1} pour la forme *trans* de cet azobenzène et de 277 M^{-1} pour son isomère *cis*.

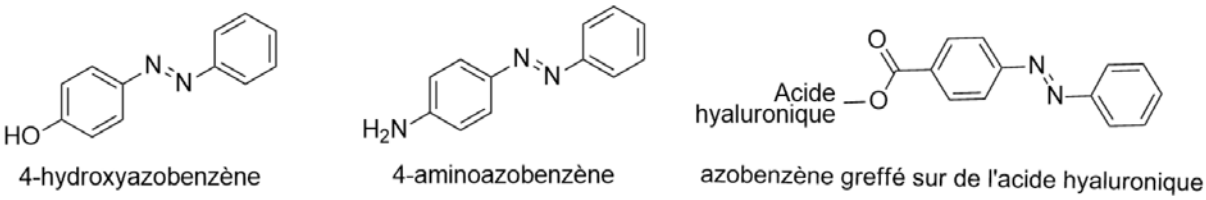


Figure 78 : Exemples d'azobenzènes de la littérature pour lesquels les Ka avec la β-CD ont été déterminées.

Les différences observées avec la littérature peuvent provenir de la nature des substituants, qui jouent un grand rôle sur la stabilité des complexes formés, en fonction de leurs interactions électrostatiques ou de leur encombrement stérique. En tenant compte des incertitudes sur les

valeurs calculées, les résultats sont d'un ordre de grandeur cohérent avec ce qui est généralement décrit[145,164,198,199]. Il peut être noté que, bien que souvent négligée dans la littérature, l'association AZO-POE-C/β-CD n'en est pas pour le moins absente. En effet, sa constante d'affinité est du même ordre de grandeur que celle de son isomère *trans*, ici même très similaire.

A partir des expériences de titrage en UV-Visible, il a été possible de calculer les valeurs des $\varepsilon_{AZO.CD}$ pour toutes les longueurs d'onde[169]. Dans la suite de ce travail, les valeurs des coefficients d'extinction molaire d'intérêt seront donc considérées comme connues et fixées telles que données dans le Tableau 6. Pour le complexe avec la γ-CD, il n'est pas surprenant de trouver des valeurs de ε environ deux fois plus grandes que celles obtenues pour les autres complexes puisque dans ce cas, un complexe comporte deux molécules photochromiques. Toutes les données nécessaires à l'étude de l'isomérisation des complexes entre AZO-POE et CDs ayant été déterminées, il a donc été possible d'exécuter puis de modéliser les irradiations successives de l'AZO-POE en présence des différents oligosaccharides.

I.3.4. Isomérisations photochimiques des complexes supramoléculaires

L'AZO-POE peut, comme montré précédemment, former des complexes avec les différentes cyclodextrines en s'insérant dans leur cavité hydrophobe. Selon sa configuration, il a été montré que la stœchiométrie du complexe, comme sa géométrie dans l'espace, pouvait varier. Les propriétés du complexe sont donc également susceptibles de changer par rapport à celles de l'azobenzène libre en solution.

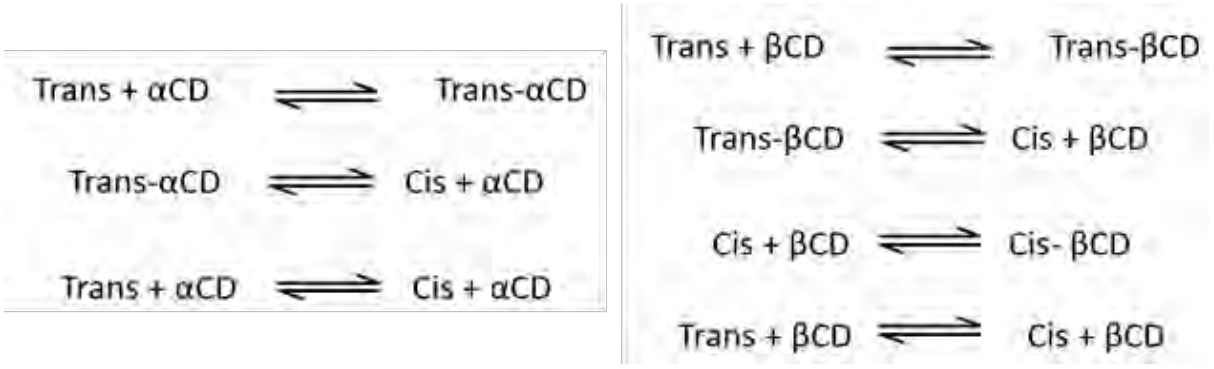


Figure 79 : Équations des cinétiques d'isomérisation de l'azobenzène et de son inclusion dans la cyclodextrine.

La cinétique d'isomérisation de l'AZO-POE en présence des trois différentes cyclodextrines α, β, et γ a été étudiée à 366 nm pour la transition *trans*→*cis* et à 420 nm pour la transition *cis*→*trans*. La Figure 79 montre les équilibres considérés dans les différents cas. Il a été précédemment montré que l'α-CD et la γ-CD ne pouvaient se complexer qu'avec l'isomère

trans contrairement à la β-CD qui complexe les deux formes.

Les paramètres photochimiques de l'AZO-POE sont conservés et fixés tels que trouvés dans la partie I.2.5.2 dans le modèle sans complexation. Les coefficients d'extinction molaire des complexes sont connus et fixés comme trouvés dans la partie I.3.3. Les expériences réalisées en DC (I.3.2.2) affirment que seule la β-CD peut complexer la forme *cis* de l'AZO-POE. Le modèle calculatoire utilisé pour modéliser ces expériences ne considère donc que l'association avec la forme *trans* pour les deux autres cyclodextrines. Les complexes formés sont de stœchiométries connues et les constantes d'affinités utilisées pour modéliser l'équilibre sont celles précédemment déterminées. La modélisation converge en accord avec l'expérience pour les paramètres renseignés dans les Tableau 7 et Tableau 8.

	$\Phi_{AZOt}(366)$	$\Phi_{AZOt}(420)$	$\Phi_{AZOc}(366)$	$\Phi_{AZOc}(420)$
AZO-T ⇄ azo-C	0,35 ± 0,01	0,35 ± 0,01	0,43± 0,03	0,50 ± 0,03
AZO-T/α-CD ⇄ azo-C + α-CD	0,25± 0,02	0,26± 0,02	-	-
AZO-T$_2$/γ-CD ⇄ 2 azo-C + γ-CD	0,10± 0,01	0,10± 0,01	-	-
AZO-T/β-CD ⇄ azo-C + β-CD	0,29 ± 0,02	0,30± 0,02	-	-
AZO-C/β-CD ⇄ azo-T + β-CD	-	-	0,62± 0,1	0,42± 0,05

Tableau 7 : Rendements quantiques des réactions d'isomérisation des complexes AZO-POE/CD aux longueurs d'onde d'irradiation 366 nm et 420 nm. L'erreur indique la variabilité observée sur le rendement quantique au cours du calcul par le logiciel.

	AZO-POE-T		AZO-POE-C	
	ε_{366} L.mol^{-1}L^{-1}	ε_{420} L.mol^{-1}L^{-1}	ε_{366} L.mol^{-1}L^{-1}	ε_{420} L.mol^{-1}L^{-1}
AZO libre	16000±1000	1710±100	700±100	2600±300
α-CD/AZO	20000±1500	1150±100		
γ-CD/AZO	25000±1000	3700±200		
β-CD/AZO	16500±2000	1800±100	1900±100	3700±200

Tableau 8 : Coefficients d'absorption molaire de l'AZO-POE libre et des complexes AZO-POE/CD aux longueurs d'onde d'irradiation 366 nm et 420 nm. L'erreur indique la variabilité observée sur le coefficient d'absorption molaire au cours du calcul par le logiciel.

Les valeurs trouvées pour l'absorbance à 366 nm coïncident bien avec celles trouvées au cours du travail précédent avec un autre système d'irradiation (lampe à vapeur de mercure). Cela corrobore la validité de ces expériences car les coefficients d'extinction molaire et les rendements quantiques sont indépendants de la lampe utilisée. La superposition précise du modèle avec l'expérience permet de valider les paramètres obtenus[169]. La cohérence de la

modélisation ainsi que la ressemblance observée aves les résultats obtenus lors d'un précédent travail de post-doctorat semblent valider l'absence effective d'association entre l'isomère *cis* et les α-CD et γ-CD.

On a donc montré que l'on retrouvait, avec un système d'irradiation LED, les paramètres photochimiques obtenus avec un autre système d'irradiation moins performant. De plus, les temps de réactions sont plus courts dans le cas des LEDs car leur intensité lumineuse est plus grande. Il y a donc beaucoup à gagner à utiliser des LEDs dans le domaine de la photochimie aujourd'hui. Les résultats sont également plus reproductibles avec ce nouveau système car les intensités des lampes sont beaucoup moins variables que ne l'était la lampe à vapeur de mercure.

L'étude poussée des propriétés de l'AZO-POE a été possible par une méthodologie étape par étape adaptable à tous les systèmes de complexes hôtes/invités et même plus largement. Dans cette méthode, chaque expérience permet d'obtenir de nouveaux paramètres nécessaires à la modélisation de paramètres supplémentaires. A la fin du processus, le comportement de chaque complexe est complètement caractérisé en solution et peut permettre la conception de matériaux à l'échelle macroscopique à partir d'objets connus. Appliquons maintenant certaines étapes de ce processus à la caractérisation de deux dérivés d'azobenzènes, un AZO tétrafluoré et un AZO dichloro-difluoré. Ces deux molécules peuvent être isomérisées par irradiation avec de la lumière visible et sont donc de bonnes candidates pour des applications de matériaux intelligents, stimulables et biocompatibles. La caractérisation de leur complexation avec la β-CD a pour objectif de nous permettre de choisir la plus adaptée de ces deux molécules pour la synthèse d'hydrogels photo-stimulables dans le visible.

II. Caractérisation physico-chimique des azobenzènes tétra-fluoré et dichloro-difluoré.

Dans cette deuxième partie, notre étude se portera sur la comparaison des propriétés physico-chimiques de deux dérivés d'azobenzènes candidats pour le développement d'hydrogels photo-stimulables par la lumière visible. Le premier dérivé est un azobenzène substitué par quatre atomes de fluor en position *ortho,* qui a été développé par le groupe de Hecht. Il a été sélectionné pour sa capacité à être isomérisé sous irradiation visible, sélectivement et avec de bons rendements de photo-conversion (86-91 %)[111]. Le deuxième azobenzène étudié porte en *ortho* deux atomes de fluor et deux de chlore. Le groupe d'Isacoff a récemment montré que

l'isomérisation d'azobenzènes tétra substitués en *ortho* par des atomes de chlores pouvait être menée par irradiation avec de la lumière jaune/rouge. Ces composés sont également insensibles à la réduction et seraient de bons candidats pour contrôler l'activité des récepteurs au glutamate grâce à la lumière visible[200].

Pour ce travail, une chaîne de polyoxyde d'éthylène (POE) de 6 à 7 unités est ajoutée en position *para* de ces deux composés afin d'augmenter leur solubilité dans l'eau. La partie qui suit porte sur l'étude de la photochimie de ces azobenzènes, de leurs propriétés en solution dans l'eau et de leurs propriétés de complexation avec la β-CD.

II.1.Synthèses

Les synthèses des AZO tétrafluoré et dichloré-difluoré ont été réalisés par A. Compte (ICBMS, Université Claude Bernard Lyon 1) et S. Pearson (INM, Leibniz-Institut für Neue Materialien gGmbH, Saarbrücke) par respectivement.

II.1.1.Azobenzène tétra-fluoré (4F-AZO-POE)

L'azobenzène tétra-fluoré (4F-AZO-POE) utilisé dans ce travail a été obtenu selon la synthèse suivante (Figure 80). La synthèse aboutit à environ 11,6 g de produit très majoritairement sous forme *trans* (4F-AZO-POE-T).

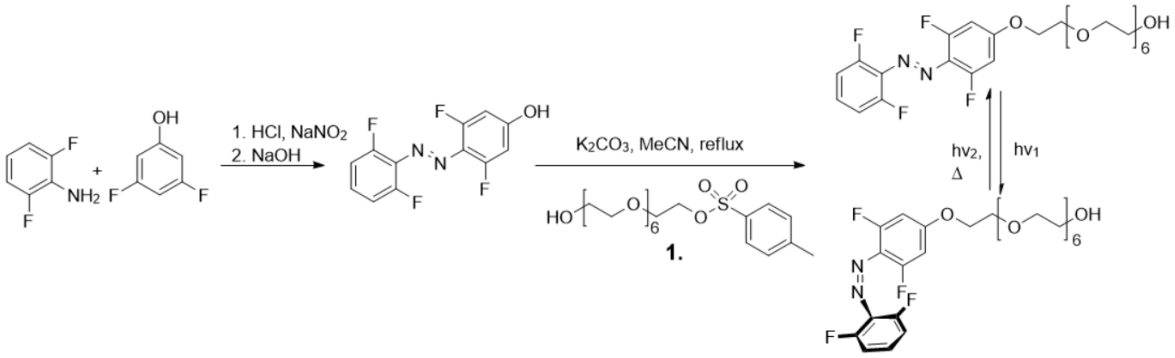


Figure 80 : Schéma de synthèse du l'4F-AZO-POE.

Lors de cette synthèse, le composé tosylé **1**, appelé POE-OTs par la suite, est utilisé pour greffer la chaîne POE au diazobenzène. Ce produit ne peut pas être complètement séparé du 4F-AZO-POE (Figure 81). Le produit final n'est donc pas pur et l'impureté, par son groupe tosyl, risque de posséder une affinité avec la β-CD, comme suggéré par Law *et coll.*[201].

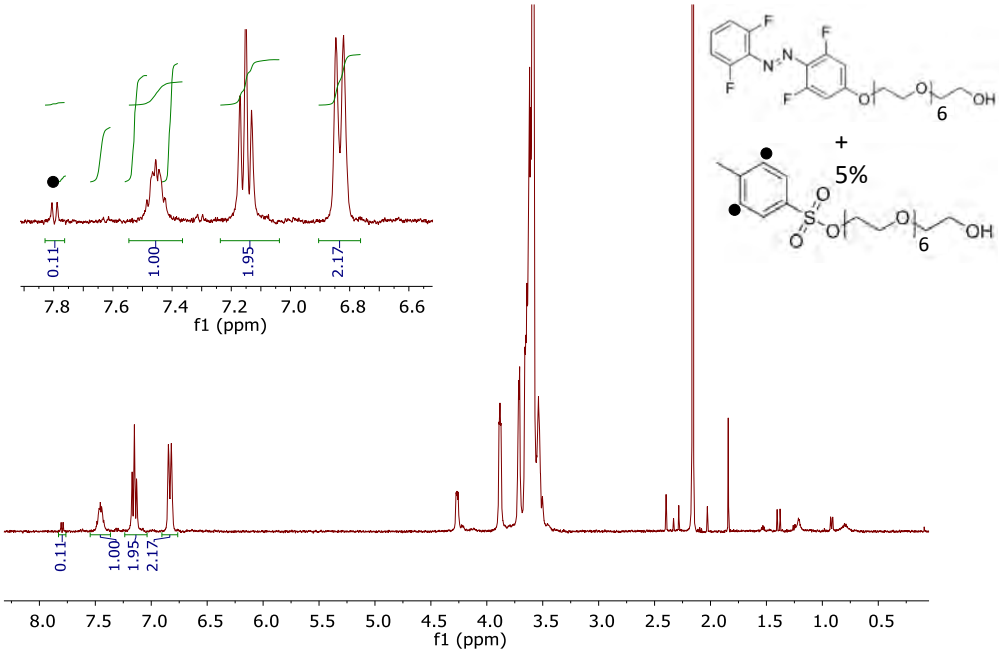


Figure 81 : Spectre RMN ^{1}H dans D_2O du 4F-AZO-POE contenant environ 5% molaire d'impureté dont un des signaux apparaît à 7,79 ppm.

Un dosage de l'impureté seule par la β-CD a donc été réalisé par RMN ^{1}H pour déterminer son affinité avec la cavité hydrophobe[147]. La Figure 82 montre les spectres collectés du POE-OTs en présence de différentes concentrations de β-CD. Lorsque la concentration de cyclodextrine augmente, le signal des protons aromatiques du tosyl se blinde. Ceci traduit la présence d'une interaction entre le cycle aromatique de l'impureté et la cavité de la β-CD.

Afin de déterminer la constante d'affinité entre le POE-OTs et la β-CD, les données expérimentales sont traitées par la méthode de Benesi-Hildebrandt. Il s'agit d'une linéarisation qui prend la forme de l'équation modifiée suivante dans le cas d'un dosage par RMN :

$$\frac{1}{\Delta\delta_{obs}} = \frac{1}{Ka.\Delta\delta_{max}.[CD]} + \frac{1}{\Delta\delta_{max}}$$

Où $\Delta\delta_{obs}$ est le déplacement mesuré entre le pic en l'absence de β-CD et le pic avec ajout de β-CD, $\Delta\delta_{max}$ est le déplacement mesuré entre le pic en l'absence de β-CD et le pic du complexe. Le tracé de l'inverse du déplacement du signal à 7,45 ppm en fonction de l'inverse de la concentration en CD donne un bon alignement des points (Figure 82). Grâce à la pente et à l'ordonnée à l'origine, il est possible de déterminer Ka.

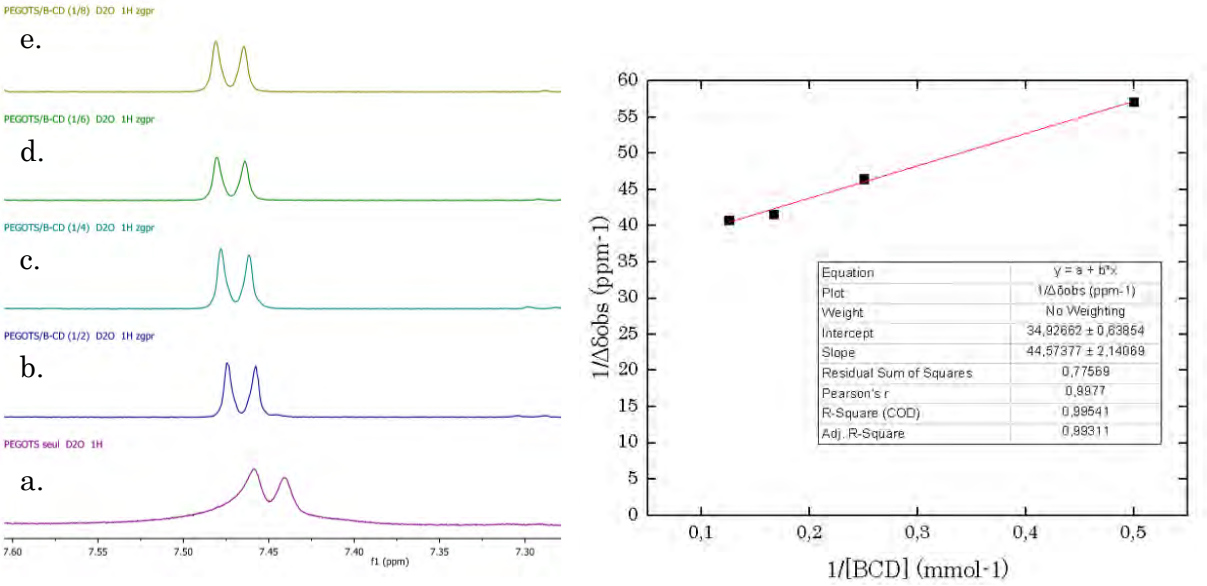


Figure 82 : Spectre ^{1}H RMN (gauche) de POE-O-Ts à 2.10^{-3} mol.L^{-1} dans D_2O en présence de différentes concentrations de β-CD. [β-CD] : a. 0, b. 2, c. 4, d. 6, e. 8 $.10^{-3}$ mol.L^{-1}. Tracé de Benesi-Hildebrandt (droite).

La constante d'affinité entre le POE-O-Ts et la β-CD vaut alors K = 784 L.mol^{-1}. Il s'agit d'une constante faible qui traduit une association peu stable entre les deux composés.

II.1.2.Azobenzène dichloro-difluoré (2Cl2F-AZO-POE)

L'azobenzène dichloro-difluoré (2Cl2F-AZO-POE) a été synthétisé selon la synthèse présentée dans la Figure 83. Un demi-gramme de produit final a pu être obtenu environ. Il s'agit de l'état photostationnaire enrichi en isomère *trans*.

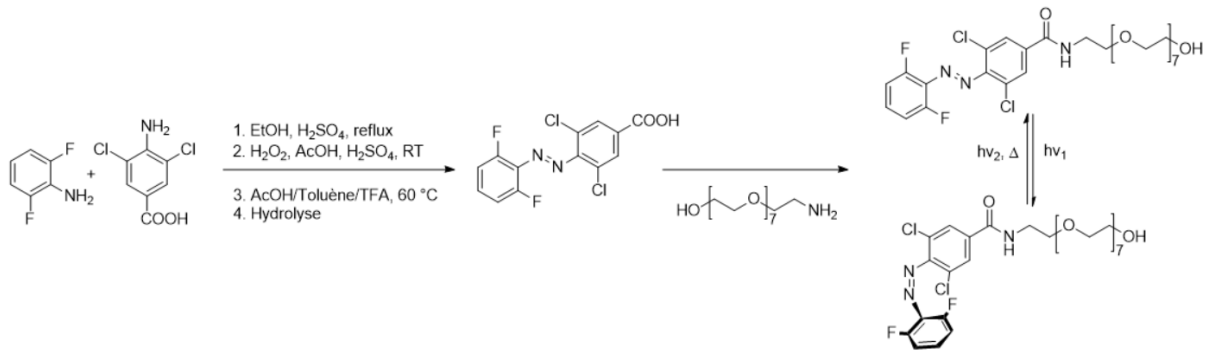


Figure 83 : Schéma de la voie de synthèse de le 2Cl2F-AZO-POE.

II.2.Thermosensibilité du POE et mise en évidence de LCST

Classiquement, la solubilité des polymères dans un solvant augmente avec la température. Ceci

s'explique dans le cas où une plus grande agitation thermique facilite les interactions polymère/solvant. Cependant, il peut arriver que l'apport de l'énergie perturbe des interactions qui assuraient la bonne solubilisation du polymère. C'est ce qui arrive pour certains polymères en solution aqueuse. En effet, certains polymères comme le poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM) et le poly(oxyde d'éthylène) exhibent un comportement inverse : au-dessus d'une certaine concentration, l'augmentation de la température conduit à une baisse de solubilité[202].
La bonne solubilité de courtes chaînes POE dans l'eau est due à leur hydratation, autour de l'oxygène des fonctions éthers[203]. Les interactions attractives entre les chaines de POE et l'eau permettent ainsi la bonne solubilisation du polymère à température ambiante. A l'inverse, au-delà d'une concentration critique, l'augmentation de la température conduit à la rupture des liaisons hydrogène qui favorisaient la solubilisation, conduisant à une séparation de phase (Figure 84)[204]. Ce phénomène participe à la diminution de solubilité du POE, qui s'agrège dans l'eau[205]. La température minimale pour laquelle la solution se trouble est appelée LCST pour « lower critical solution temperature »). Les polymères à LCST sont couramment employés pour la création de matériaux ou architectures thermo-contrôlables.

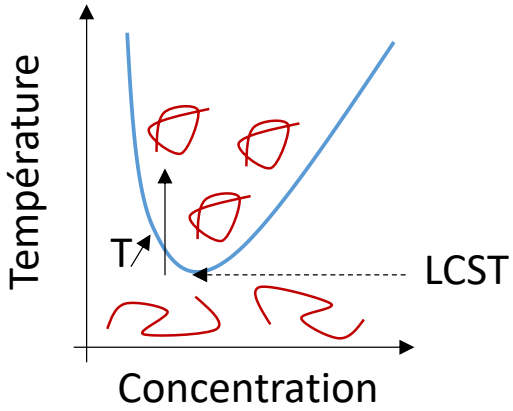


Figure 84 : Représentation schématique montrant la transition de phase associée à une solution possédant une LCST. La ligne bleue représente la frontière de séparation de phase qui se manifeste par un point de trouble en solution.

Han *et coll.* ont utilisé la LCST du POE pour créer des micelles thermosensibles utiles pour la relargage de pesticides[206]. Une augmentation de température des micelles chargées conduit à l'effondrement des chaines POE de la coquille qui se désorganisent et s'agrègent, délivrant ainsi la molécule encapsulée. La température critique peut être contrôlée par le pourcentage de POE dans les micelles. Elle peut varier entre 27 °C et 40 °C lorsque la proportion de POE varie de 30% à 60%. Lutz *et coll.* ont montré en 2006 que les LCSTs d'un copolymère éthylène glycol greffé polyméthacrylates P(MEO_2MA-co-OEGMA) pouvaient varier significativement, de 20

°C à 90 °C, en fonction de la composition en comonomère[84]. Ainsi, à cause de la chaîne POE qui les compose, les 4F-AZO-POE et 2Cl2F-AZO-POE possèdent des LCSTs et celles-ci dépendent fortement du solvant.

Plusieurs mesures ont été réalisées avec le 4F-AZO-POE-T pour déterminer sa LCST dans l'eau, l'eau deutérée et le tampon phosphate PBS. Ces trois solvants sont choisis pour les raisons suivantes : les analyses RMN demandent l'utilisation de D_2O et les analyses ne sont pas exploitables lorsque l'4F-AZO-POE est agrégé. Ensuite l'eau est le solvant modèle que nous avons choisi pour notre étude et le PBS nous rapproche des conditions biologiques. Des solutions à 1.10^{-2} mol.L^{-1} sont préparées dans chacun de ces solvants. La solution est soumise à 4 cycles montée puis descente en température, avec des vitesses de rampes de température différentes. L'observation est faite à une longueur d'onde où le composé n'absorbe pas de sorte que, lorsque la solution est limpide la transmittance soit de 100% alors qu'elle diminue fortement lorsque la solution se trouble. La température de trouble correspond au point d'inflexion de la courbe transmittance en fonction de température. Elle est obtenue graphiquement, comme la température pour laquelle la dérivée seconde de la transmittance s'annule. En traçant, le point où la solution se trouble en fonction de la vitesse de rampe en température (°C/min), température de trouble est déterminée comme l'ordonnée à l'origine de cette droite.

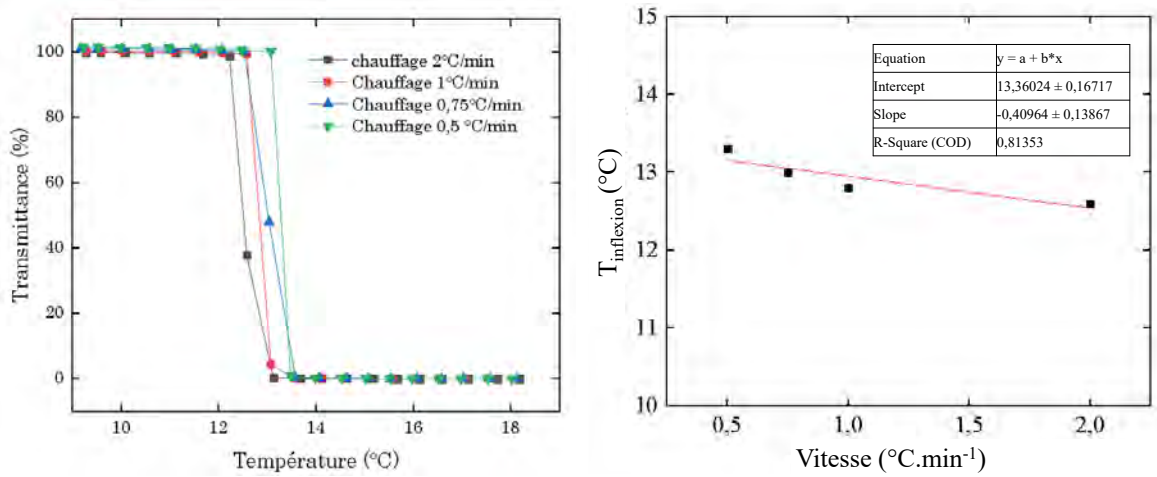


Figure 85 : Essai de turbidimétrie de le 4F-AZO-POE dans D_2O. Tracé du pourcentage de transmittance à 650 nm de la solution en fonction de la température pour quatre rampes de température, au cours du chauffage (gauche) et tracé de la température de trouble en fonction de la rampe de température pour l'expérience dans D_2O en chauffant (droite).

La Figure 85 montre les données expérimentales obtenues dans D_2O. On trouve grâce à la régression linéaire un point de trouble en chauffage à 13,4 °C environ. De la même façon, on

la solution redevient claire à 13,0 °C en refroidissement. Il est donc impératif d'être vigilant à la concentration utilisée lors d'analyses RMN, qui se font dans l'eau deutérée. Le même protocole est appliqué pour les analyses dans l'eau et dans le PBS. Les résultats sont regroupés dans le Tableau 9.

	Point de trouble déterminé en montée de température (°C)	Point de trouble déterminé en descente de température (°C)
D_2O	13,4	13,0
H_2O	25,8	26,3
PBS	21,8	21,7

Tableau 9 : Points de trouble du 4F-AZO-POE déterminés en turbidimétrie pour chaque solvant à 1.10^{-2} mol.L^{-1}.

Dans l'eau, les températures de trouble sont supérieures à celles obtenues dans le PBS. Ce phénomène a déjà été décrit comme l'effet de sels (« salting-out effect ») ou relargage[74]. Les sels présents dans le PBS déshydratent partiellement la molécule de 4F-AZO-POE, la rendant un peu moins soluble en solution. Ainsi les températures de LCST en solution saline sont systématiquement abaissées de 3 ou 4 °C par rapport à celles dans l'eau pure.

Les expériences réalisées montrent aussi des LCSTs beaucoup plus basses dans l'eau deutérée par rapport à celles obtenues dans l'eau. Ce résultat peut être dû à la modification du réseau de liaisons hydrogène entre l'eau et l'eau lourde. En effet, il a déjà été soulevé que D_2O et H_2O pouvaient montrer des disparités en termes de formation de liaisons hydrogène[207]. Sheu *et coll.* ont étudié l'effet de D_2O sur les liaisons hydrogène d'une protéine et ont montré que le solvant deutéré affectait grandement la force de ces liaisons[208]. Notamment, D_2O inhibe la dynamique des liaisons hydrogène intraprotéiques qui sont pourtant très présentes dans H_2O. Les protéines sont donc plus compactes dans D_2O que dans H_2O. De même, une étude de Cho *et coll.* sur la LCST de polypeptides de type élastine (ELP) a montré que D_2O stabilise l'état agrégé de ces polypeptides ce qui résulte en une LCST inférieure, jusqu'à 5,6 °C, à celle trouvée dans H_2O[209]. Comme pour les ELPs, la présence de liaisons hydrogène participe à la solubilisation des courtes chaînes POE. Par analogie, il peut être envisagé que le solvant deutéré limite la formation de liaisons hydrogène entre la chaine POE du 4F-AZO et l'eau, favorisant ainsi l'agrégation des molécules. Ceci entraînerait effectivement la précipitation du polymère à température inférieure à celle trouvée pour l'eau.

L'étude des différentes propriétés du 4F-AZO-POE devra être réalisée dans des conditions de

solvant, température et concentration telles que le point de trouble ne risque pas de perturber l'analyse. Pour les études RMN, on choisira de se placer à de faibles concentrations entre 5 et 10.10^{-5} mol.L^{-1} dans l'eau deutérée.

II.3.Isomérisation photochimique des 4F-AZO et 2Cl2F-AZO

Tout comme leur parent l'azobenzène, le 4F-AZO et le 2Cl2F-AZO possèdent des propriétés spectrales intéressantes. Ces deux composés ont, en plus de l'azobenzène, la capacité de subir une isomérisation *trans*→*cis* sous irradiation avec une lumière ayant une longueur d'onde visible. La partie suivante étudie les propriétés photochimiques et caractérise les états photo-stationnaires de chacun de ces composés.

Afin de déterminer les conversions photochimiques du 4F-AZO-POE, une solution à $8{,}8.10^{-5}$ mol.L^{-1} dans D_2O est irradiée à 530 nm puis 415 nm.

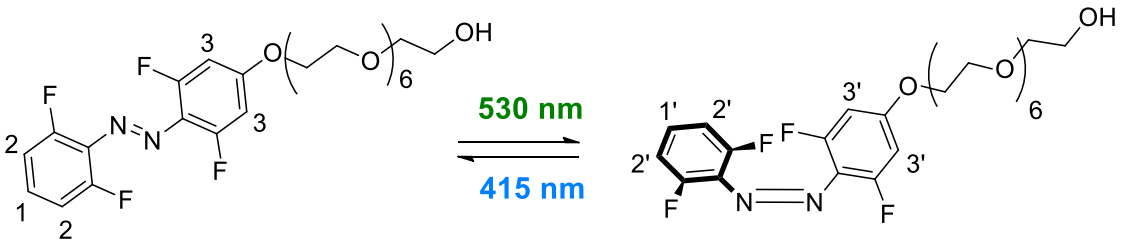


Figure 86 : Schéma de la réaction photochimique du 4F-AZO-POE

L'isomérisation est suivie qualitativement par spectrophotométrie UV-Visible. La composition à l'équilibre photostationnaire est déterminée par RMN ^{1}H avant et après chaque irradiation.

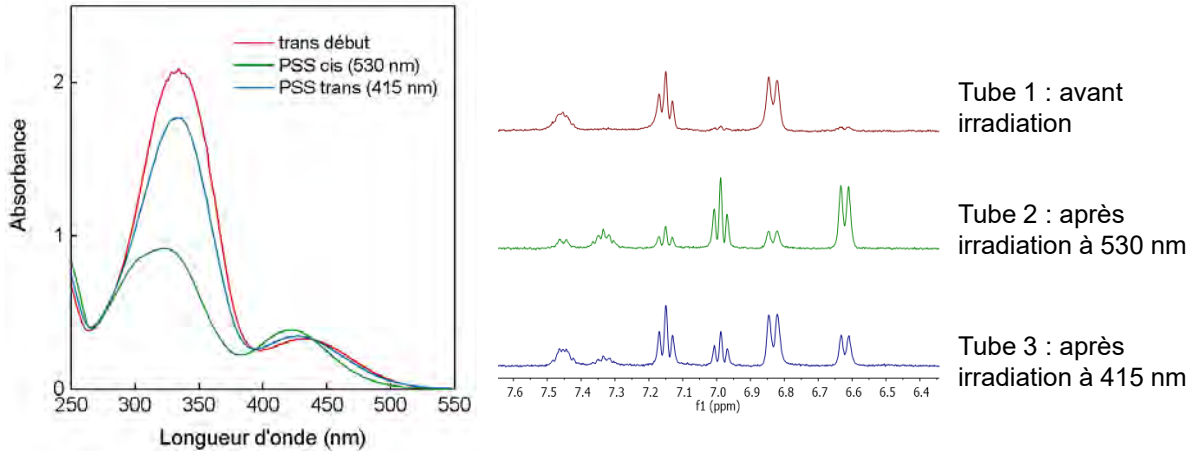


Figure 87 : Suivi de l'isomérisation *trans*→*cis* puis *cis*→*trans* du 4F-AZO-POE par spectrométrie UV-Visible (gauche) et par RMN ^{1}H (droite). La numérotation des protons sur les spectres RMN correspond à celle indiquée Figure 86.

La Figure 87 montre les spectres UV-Visible des deux formes, *cis* et *trans* qui sont bien distincts. Notamment, lorsque l'on passe de l'azobenzène *trans* au *cis,* l'absorbance vers 340

nm baisse considérablement et la bande d'absorption vers 450 nm est décalée vers les basses longueurs d'onde. C'est d'ailleurs le décalage de cette bande d'absorption plus faible qui permet une isomérisation partiellement sélective à 530 nm puisque le composé *cis* n'absorbe presque pas à cette longueur d'onde.

Tube	7,15 ppm	6,99 ppm	6,83 ppm	6,62 ppm	%*cis* moyen	%*trans* moyen
1	2,00	0,18	2,12	0,20	9	91
2	0,85	2,00	0,80	2,33	72	28
3	2,00	0,96	2,20	1,17	33,5	66,5

Tableau 10 : Tableau recensant les pics caractéristiques de chaque proton du 4F-AZO-POE ainsi que leurs intégrations qui permettent de calculer le ratio trans:cis après chaque irradiation.

La spectrophotométrie UV-Visible est donc une technique pertinente pour suivre l'isomérisation photochimique. Cependant, pour quantifier la proportion des deux isomères, la RMN est nécessaire. La Figure 87 montre les agrandissements des signaux des protons aromatiques 2, 3, 2' et 3' des tubes 1, 2 et 3. Les résultats des intégrations (Tableau 10) montrent comme attendu, un produit initialement très enrichi à 91% en isomère *trans*, qui se transforme majoritairement en isomère *cis* au cours d'une irradiation à 530 nm. Irradier le mélange à 415 nm le fait bien revenir à un état enrichi à 67% en isomère *trans*. Ce PSS n'est cependant pas l'état initial. Il ne sera pas possible de récupérer un composé *trans* pur via la photochimie, à cause du recouvrement des bandes n→π* des deux isomères.

Une étude similaire a été effectuée sur le 2Cl2F-AZO dans D_2O. Le composé initial dissout dans l'eau deutérée a été irradié à 530 nm puis à 415 nm (Figure 88) afin d'estimer les compositions des PSS.

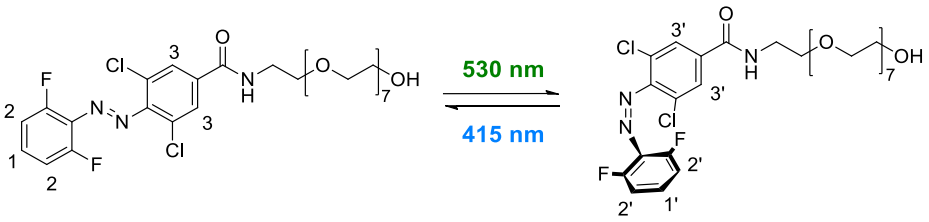


Figure 88 : Schéma de la réaction photochimique du 2Cl2F-AZO-POE.

La spectrophotométrie a permis de mettre en évidence l'isomérisation du 2Cl2F-AZO-POE (Figure 89). Le 2Cl2F-AZO-POE *cis* (2Cl2F-AZO-POE-C) absorbe moins que son isomère *trans* (2Cl2F-AZO-POE-T) à 290 nm. De plus, comme attendu en substituant des groupes donneurs en *ortho* du groupe azo, la bande n→π* du 2Cl2F-AZO-POE-C subit un décalage

hypsochrome d'environ 20 nm par rapport à son isomère. Cela permet l'isomérisation sélective du composé à 530 nm.

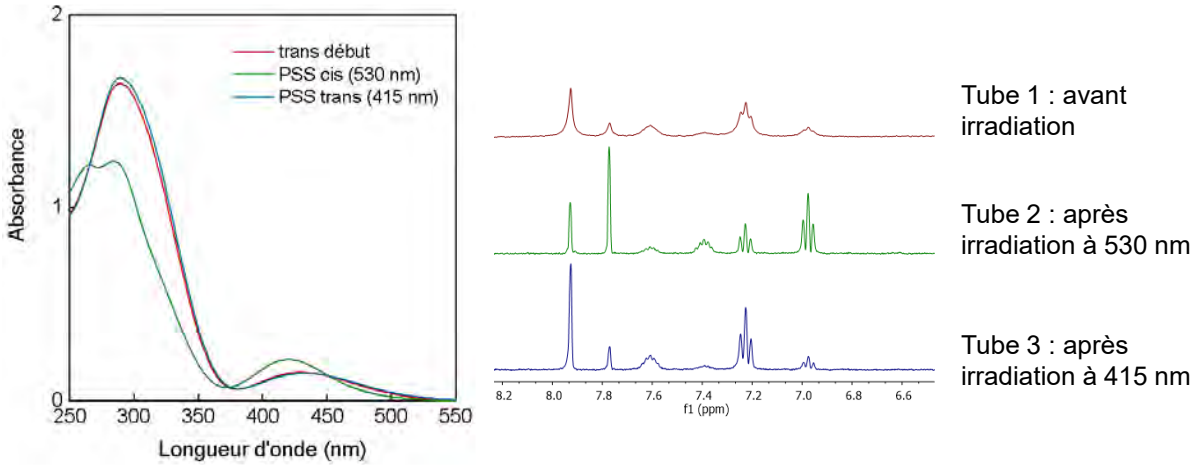


Figure 89 : Suivi de l'isomérisation *trans*→*cis* puis *cis*→*trans* du 2Cl2F-AZO-POE par RMN ^{1}H (gauche) et spectrométrie UV-Visible (droite). La numérotation de protons sur les spectres RMN correspond à celle indiquée en Figure 88.

L'analyse RMN permet, comme précédemment, de déterminer les compositions aux PSS-C et PSS-T (Tableau 11). Pour ce composé, l'état initial est déjà un mélange 18:82 des isomères *cis*:*trans*. Irradier ce mélange à 530 nm l'enrichit en isomère *cis* jusqu'à atteindre un équilibre *cis*:*trans* de rapport 67:33. L'irradiation à 415 nm ramène cet équilibre à son point initial ce qui confirme que le produit était déjà sous forme PSS-T à la suite de la synthèse.

Tube	7,93 ppm	7,77 ppm	7,23 ppm	6,98 ppm	%*cis* moyen	%*trans* moyen
4	2,00	0,48	2,26	0,53	18	82
5	0,95	2,00	1,24	2,50	67	33
6	2,00	0,42	2,57	0,50	17	83

Tableau 11 : Tableau recensant les pics caractéristiques de chaque proton du 2Cl2F-AZO-POE ainsi que leurs intégrations qui permettent de calculer le rapport *trans*:*cis* après chaque irradiation.

Après avoir étudié les propriétés de photo-isomérisation de deux dérivés d'AZO face à la lumière visible, les propriétés de stabilité thermique de ces composés ont également été déterminées.

II.4.Isomérisation thermique des 4F-AZO-POE et 2Cl2F-AZO-POE

En plus de leur capacité à s'isomériser par un processus photochimique, les azobenzènes peuvent subir une isomérisation par retour thermique, qui forme le composé le plus stable. Pour un grand nombre de systèmes azobenzènes, le composé le plus stable est l'isomère *trans*[112]. Il

est donc possible d'obtenir le composé *cis* par irradiation puis d'étudier sa cinétique de retour thermique dans le noir à différentes températures.

De telles expériences ont été réalisées pour le 4F-AZO-POE à différentes températures, 37, 60, 70 et 80 °C. Plusieurs groupes se sont intéressés à la cinétique d'isomérisation thermique de l'azobenzène et de ses dérivés depuis sa forme *cis* vers sa forme *trans*. Cette réaction dont les paramètres dépendent fortement du solvant et de la température ainsi que des substituants de l'AZO, admet dans l'immense majorité des cas une cinétique d'ordre 1[210–212]. Il est ainsi possible de modéliser les résultats expérimentaux par une telle cinétique. L'étude et l'extraction des paramètres clés de ces cinétiques permettent d'accéder aux paramètres thermodynamiques de la réaction d'isomérisation thermique. Bléger *et coll.* ont décrit l'4F-AZO dont la forme *cis* est extrêmement stable dans le temps (700 jours à 25 °C)[111]. On s'attend donc à une cinétique de retour thermique lente à 37 °C puis à des cinétiques de plus en plus rapides avec l'augmentation de la température.

Sur la Figure 90a., sont représentés les spectres d'absorption au cours du temps de la solution de 4F-AZO depuis le PSS-C puis conservée à 37 °C dans un bain sec pendant environ 58 jours, pour suivre la cinétique d'isomérisation dans les conditions biologiques de température. L'absorbance à 350 nm, tracée en Figure 90b., évolue de façon notable vers un enrichissement en forme *trans* (courbe en tirets). En traçant l'évolution du pourcentage en isomère *cis* au cours du temps, il apparait nettement que la cinétique n'est pas terminée dans ce cas, mais elle semble s'approcher d'un palier. L'isomère le plus stable thermiquement est bien le *trans* mais la cinétique de retour thermique à 37 °C est lente.

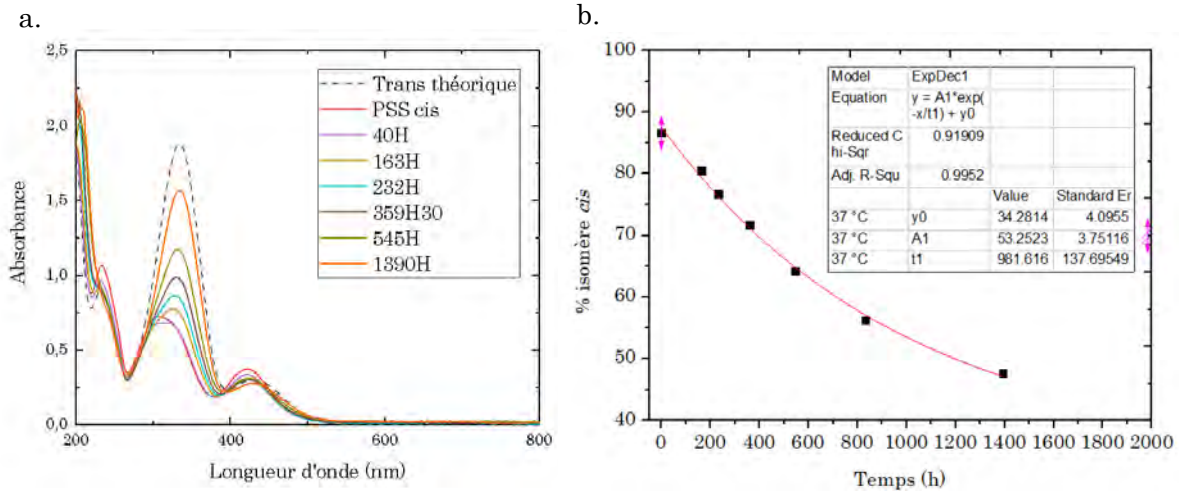


Figure 90 : Cinétique de l'isomérisation du 4F-AZO-POE-C en 4F-AZO-POE-T à 37 °C. a. Evolution du spectre d'absorbance du 4F-AZO-POE au cours du temps à 37 ° C. b. Suivi du pourcentage en isomère cis au cours de la réaction et sa modélisation par une cinétique d'ordre 1. [AZO]= $1{,}0.10^{-4}$ mol.L-1.

Pour le retour thermique à 60 °C, est suivie l'absorbance à 350 nm au cours du temps. La Figure 91 donne ce suivi réalisé sur 2,5 jours ainsi que l'évolution du contenu en isomère *cis* au cours du temps. La cinétique semble plus proche de l'atteinte d'un plateau que dans le cas précédent, elle reste quand même peu rapide.

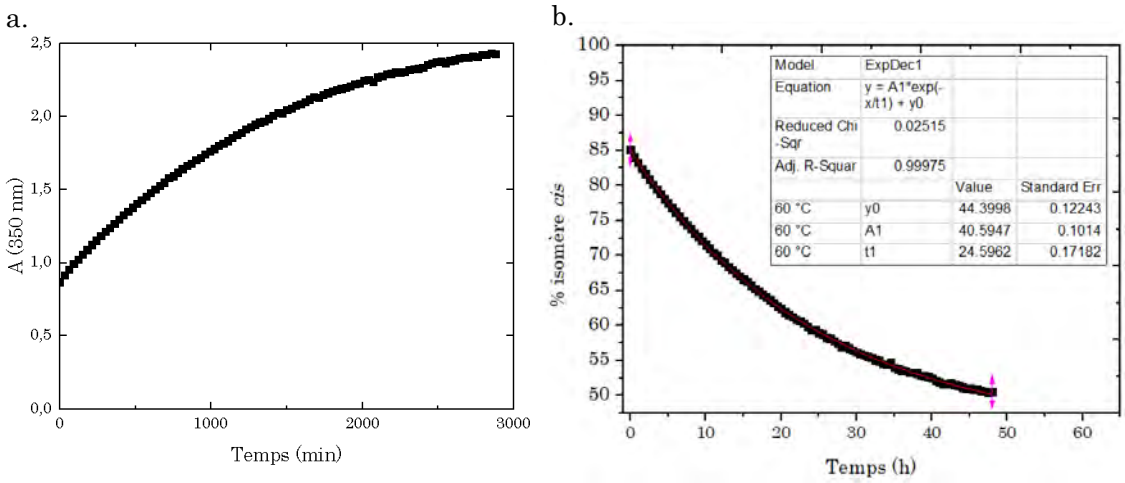


Figure 91 : Cinétique de l'isomérisation du 4F-AZO-POE-C en 4F-AZO-POE-T à 60 °C. a. Evolution de l'absorbance à 350 nm. b. Suivi du pourcentage en isomère cis au cours de la réaction et sa modélisation par une cinétique d'ordre 1 [AZO]= $1,0.10^{-4}$ mol.L^{-1}.

Pour les expériences de retour thermique à 70 °C et 80 °C, plusieurs solutions contenant l'isomère *cis* ont été analysés à différents temps. Dans ces deux cas, le retour thermique observé est bien plus rapide que pour les températures précédentes. En effet, au bout de 24 h à 70°C, il ne reste plus que 30% d'isomère *cis* pour un mélange initial à 85% (Figure 92). Il faut seulement 7 heures à 80 °C pour arriver à la même conversion (Figure 93). Le suivi du contenu en isomère *cis* dans le mélange au cours du temps confirme qu'à 80 °C un plateau est atteint au bout de deux jours environ.

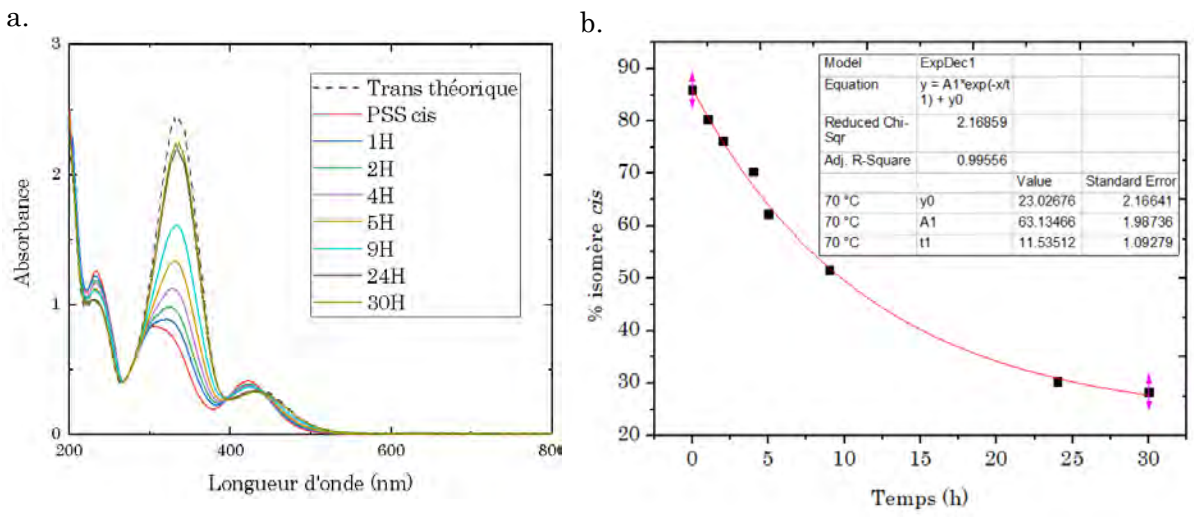


Figure 92 : Cinétique de l'isomérisation du 4F-AZO-POE-C en 4F-AZO-POE-T à 70 °C. a. Evolution du spectre d'absorbance du 4F-AZO-POE au cours du temps à 70 ° C. b. Suivi du pourcentage en isomère cis au cours de la réaction et sa modélisation par une cinétique d'ordre 1. [AZO]= 1,0.10^{-4} mol.L-1.

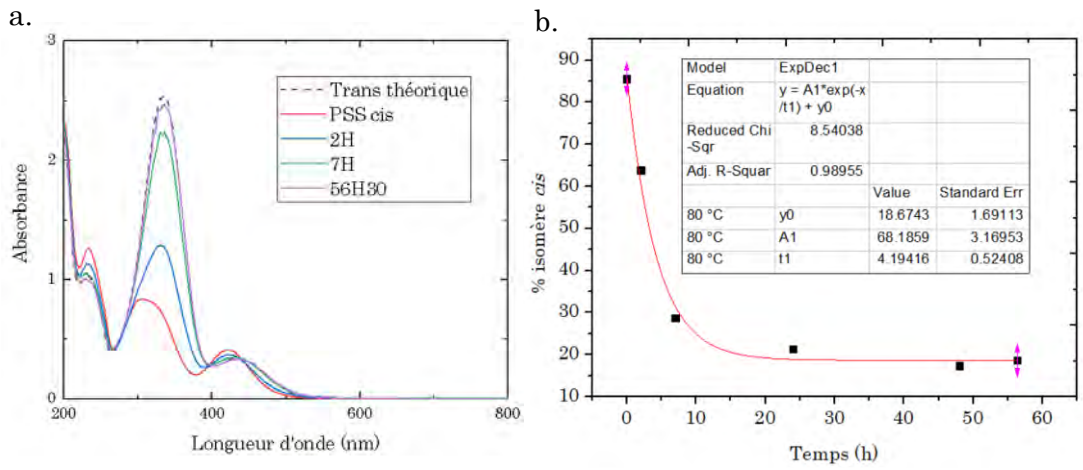


Figure 93 : Cinétique de l'isomérisation du 4F-AZO-POE-C en 4F-AZO-POE-T à 80 °C. a. Evolution du spectre d'absorbance du 4F-AZO-POE au cours du temps à 80 ° C. b. Suivi du pourcentage en isomère cis au cours de la réaction et sa modélisation par une cinétique d'ordre 1. [AZO]= 1,0.10^{-4} mol.L^{-1}.

En modélisant pour chaque température l'évolution du pourcentage en isomère *cis* dans le mélange en fonction du temps, on accède aux paramètres cinétiques de l'isomérisation thermique. Ces cinétiques peuvent toutes être modélisées par une loi d'ordre 1.

T(°C)	T(K)	k(s-1)	1/T	ln(k/T)	$t_{1/2}$(s)
37	310	2,83.10^{-7}	3,23.10^{-3}	-20.81	2,45.10^{6}
60	333	1,13.10^{-5}	3,00.10^{-3}	-17.20	6,14.10^{4}
70	343	2,41.10^{-5}	2,92.10^{-3}	-16.47	2,88.10^{4}
80	353	6,62.10^{-5}	2,83.10^{-3}	-15.49	1,04.10^{4}

Tableau 12 : Tableau regroupant les paramètres cinétiques du retour thermique du 4F-AZO-POE.

Les constantes de vitesse k et temps de demi-vie $t_{1/2}$ de l'isomère *cis* sont extraits de la modélisation pour chaque température (Tableau 12) ; k est ajustée par le modèle et participe à la minimisation de l'erreur quadratique moyenne tandis que $t_{1/2}$ est calculé *a posteriori.* La relation d'Eyring permet de déduire de ces cinétiques les paramètres d'activation de l'isomérisation thermique *cis* →*trans*, telle que :

$$\underline{\text{Equation d'Eyring}} : \; k = \frac{k_B T}{h} \exp\left(-\frac{\Delta G^{\ddagger}}{RT}\right)$$

Où k désigne la constante de vitesse,

k_B la constante de Boltzmann,

T la température,

h la constante de Planck,

R la constante des gaz parfaits,

$\Delta G^{\ddagger}$ l'enthalpie libre d'activation.

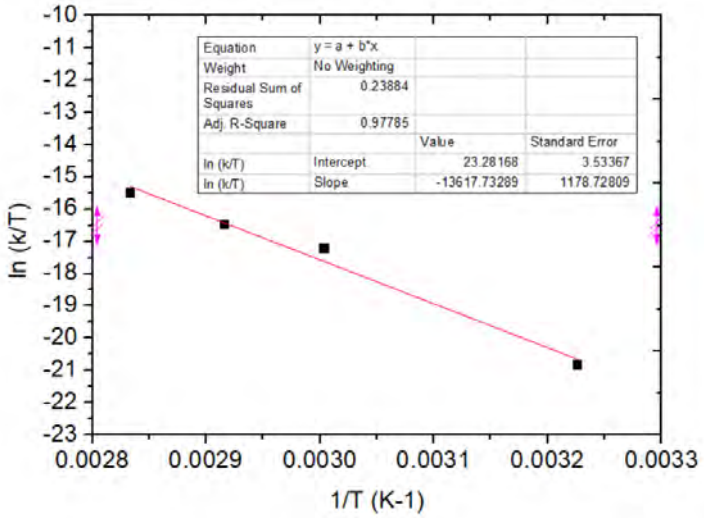


Figure 94 : Tracé de la loi d'Eyring pour le 4F-AZO-POE, ln(k/T) est tracé en fonction de l'inverse de la température.

$\Delta G^{\ddagger}$ peut ainsi être calculé pour chaque température avec la formule d'Eyring. D'autre part, le tracé de ln(k/T) en fonction de 1/T issu de la loi d'Eyring (Figure 94) montre une très bonne linéarité. Une régression linéaire permet de déduire de la pente et de l'ordonnée à l'origine de la droite les paramètres $\Delta H^{\ddagger}$ et $\Delta S^{\ddagger}$ tels que :

$$\Delta H^{\ddagger} = -pente.R$$

$$\Delta S^{\ddagger} = R.(ordonnée\ \text{à}\ l'origine - \ln\left(\frac{k_B}{h}\right))$$

avec $\Delta G^{\ddagger} = \Delta H^{\ddagger} - T\Delta S^{\ddagger}$

L'enthalpie libre d'activation est calculée pour les quatre températures (37 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C), d'un côté, par la relation d'Eyring directement appliquée aux valeurs expérimentales de k et T et d'un autre côté par les valeurs de $\Delta H^{\ddagger}$ et $\Delta S^{\ddagger}$ extraites du tracé de la Figure 94. Pour les deux méthodes, la moyenne des quatre valeurs est calculée ($\Delta G^{\ddagger}_{MOY}$).

$\Delta H^{\ddagger}$ (kJ.mol^{-1})	$\Delta S^{\ddagger}$ (J.mol^{-1}.K^{-1})	$\Delta G^{\ddagger}_{MOY}$ (kJ.mol^{-1}) Eyring	$\Delta G^{\ddagger}_{MOY}$ (kJ.mol^{-1}) $\Delta G^{\ddagger} = \Delta H^{\ddagger} - T\Delta S^{\ddagger}$
113	-4	114,5	114,5

Tableau 13 : Paramètres d'activation calculés pour l'isomérisation thermique de le 4F-AZO-POE.

L'énergie de la barrière d'activation (E_a) pour cette réaction a également été calculée par la loi d'Arrhénius :

$$k = A.e^{\frac{-E_a}{RT}}$$

E_a peut être calculée sans connaître le facteur préexponentiel A en utilisant des valeurs de k à deux températures T_1 et T_2 différentes telles que :

$$E_a = \frac{\ln\left(\frac{k_1}{k_2}\right)}{\left(\frac{1}{RT_2} - \frac{1}{RT_1}\right)}$$

En calculant E_a pour chacune des quatre températures deux à deux, on trouve une énergie d'activation de E_a= 105 ± 24 kJ.mol^{-1}. Cette valeur est de l'ordre de grandeur de l'énergie d'activation calculée par Bléger *et coll.* à 25 °C dans le DMSO pour le 4F-AZO[213], de 112 kJ.mol^{-1}. Le résultat de l'enthalpie libre d'activation $\Delta G^{\ddagger}$ donnée ici par deux méthodes est bien cohérente et donne une valeur de 114,5 kJ.mol^{-1} (Tableau 13). La barrière d'activation de l'isomérisation thermique de la molécule d'azobenzène est connue et égale à 95 kJ.mol^{-1} environ en solution[214]. De plus, Yin *et coll.* ont récemment calculé *ab initio,* par DFT, les paramètres thermodynamiques de plusieurs azobenzènes substitués en *ortho* par 4 atomes de fluor à 333K dans l'acétonitrile[215]. Pour leurs molécules F_4-azo-1 et F_4-azo-3 (Figure 95) notamment, ils obtiennent respectivement des valeurs de $\Delta G^{\ddagger}$ de 111 et 114 kJ.mol^{-1}, très proches de la valeur trouvée ici.

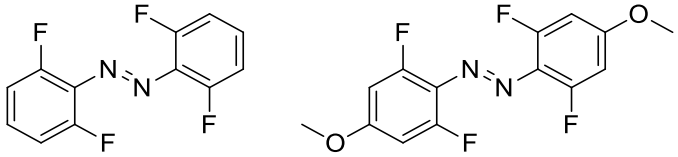


Figure 95 : Molécules F_4-azo-1(gauche) et F_4-azo-3 (droite) étudiées par Yin et al. à 333K dans l'acétonitrile[215].

La valeur de l'entropie d'activation de -4 $J.mol^{-1}.K^{-1}$ est faible mais son ordre de grandeur correspond à ceux trouvés par Yin *et al.* Une telle valeur indique qu'il n'y a pas de grosse modification de l'ordre du système entre l'état initial et l'état de transition. Il n'y a donc quasiment pas de réarrangements entre le 4F-AZO-POE et les molécules d'eau au cours de la formation de l'état de transition. Les paramètres thermodynamiques trouvés ici sont relativement similaire à ceux calculés dans l'étude de Bléger *et coll*. Ils ont déterminé les paramètres thermodynamiques de l'isomérisation thermique de l'AZO tétrafluoré dans le DMSO à 25 °C et trouvèrent $\Delta G^{\ddagger}$ de 117 $kJ.mol^{-1}$, $\Delta H^{\ddagger}$ = 109 $kJ.mol^{-1}$ et $\Delta S^{\ddagger}$ = -28 $J.mol^{-1}.K^{-1}$. En plus des variations expérimentales, il n'est pas étonnant de ne pas retrouver exactement les mêmes valeurs car le greffage d'une chaîne POE doit modifier l'arrangement du 4F-AZO-POE dans l'eau par rapport à la molécule non greffée.

Plusieurs expériences de retour thermique ont également été réalisées pour le 2Cl2F-AZO-POE dans l'eau. Après avoir isomérisé le produit initial jusqu'à l'état photostationnaire *cis* avec une irradiation à 530 nm, on se place dans des conditions où le 2Cl2F-AZO-POE se trouve correctement solubilisé.

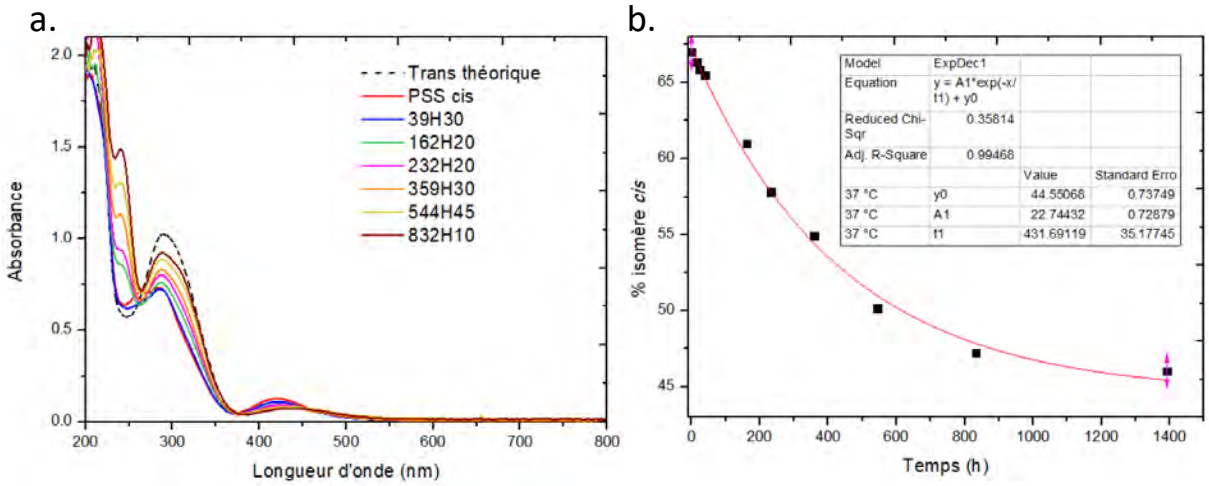


Figure 96 : Cinétique de l'isomérisation du 2Cl2F-AZO-POE-C en 2Cl2F-AZO-POE-T à 37 °C dans H_2O. a. Evolution du spectre d'absorbance du 2Cl2F-AZO-POE au cours du temps à 37 °C. b. Suivi du pourcentage en isomère cis au cours de la réaction et sa modélisation par une cinétique d'ordre 1 (k = 1/t1 =6,43.10^{-7} s^{-1}). [AZO]= 5,5.10^{-5} $mol.L^{-1}$.

Une expérience de retour thermique du 2Cl2F-AZO-POE dans l'eau à 37 °C est réalisée, comme pour le 4F-AZO-POE, dans un bain sec qui assure la stabilité de la température (Figure 96a.). La longueur d'onde où la différence entre les spectres des deux isomères est la plus importante est 308 nm, c'est donc à cette longueur d'onde que les paramètres cinétiques k et $t_{1/2}$ seront déterminés (Figure 96b.). La modélisation donne une constante de vitesse de $6{,}4.10^{-7}$ s^{-1} et un temps de demi-réaction de 303 heures. Ces valeurs témoignent d'une isomérisation thermique plus rapide que celle de 4F-AZO-POE à la même température. Un peu moins stable dans le temps que le 4F-AZO-POE-C (680 heures de temps de demi-vie), le 2Cl2F-AZO-POE-C est quand même très stable à 37 °C et subit peu de modification à l'échelle de temps d'expériences d'imagerie biologique (24-48h).

Une expérience similaire a été menée à 60 °C pour ce composé. L'absorbance d'une solution riche en isomère *cis* est suivie directement au sein du spectromètre à deux longueurs d'onde, 300 et 350 nm. La Figure 97 montre le suivi expérimental de l'absorbance à 300 nm ainsi que la modélisation par une cinétique d'ordre 1. Ici, l'absorbance à 300 nm dépasse la valeur de 2 au cours de l'isomérisation. Au-delà de cette valeur, les limites de détection de l'appareil sont atteintes. Pour obtenir une valeur de k plus fiable, la cinétique à 350 nm a également été modélisée. Les deux valeurs de k obtenues sont identiques et la constante finale extraite est $k=1{,}4.10^{-5}$ s^{-1}. Cette constante est très proche de celle trouvée pour le retour thermique du 4F-AZO-POE à la même température $k_{4F}= 1{,}1.10^{-5}$ s^{-1}. Ces deux constantes correspondent respectivement à des temps de demi-vie d'environ 14 h et 17 h. Les deux composés ont donc des cinétiques de retour thermiques similaires à 60 °C et le 4F-AZO-POE-C est un peu plus stable que le 2Cl2F-AZO-POE-C.

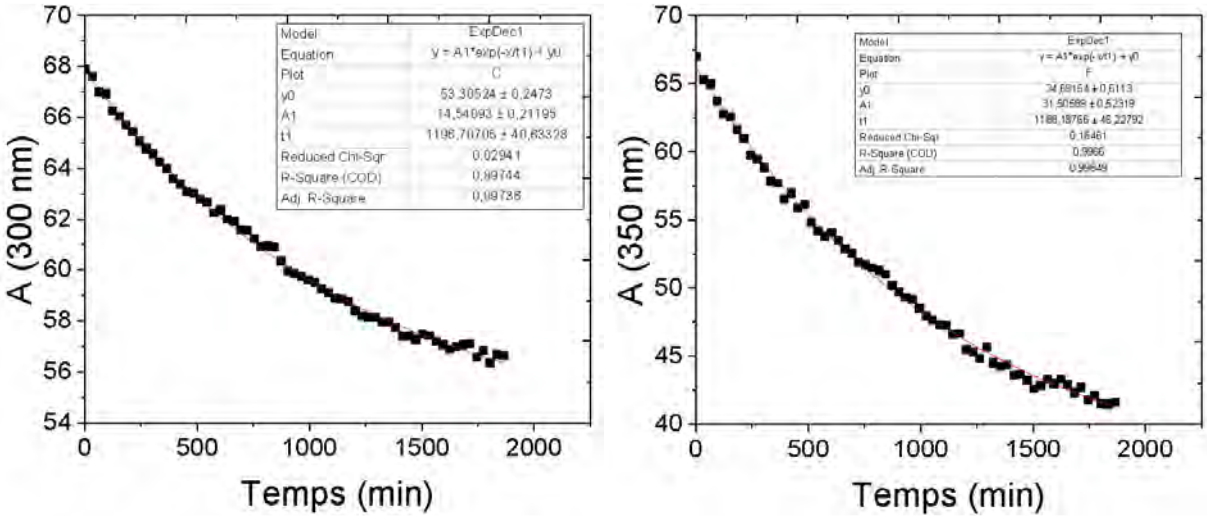


Figure 97 : Cinétique de l'isomérisation du 2Cl2-FAZO-POE-C en 2Cl2F-AZO-POE-T à 60 °C dans D_2O suivie par l'évolution de l'absorbance à 300 nm (ronds ouverts : données expérimentales, ligne continue : modélisation avec une loi du premier ordre ($k = 1{,}4.10^{-5}\ s^{-1}$). [AZO]= 2.10^{-4} mol.L^{-1}.

En conclusion, les formes *cis* des 4F-AZO-POE et 2Cl2F-AZO-POE sont toutes les deux très stables à la température du corps humain et en-dessous. Les deux composés sont donc adaptés à une application en biologie puisque sur les temps d'analyses de la biologie, 24 à 48h à 37 °C, les propriétés spectrales de la forme *cis* restent quasiment inchangées. On notera tout de même la meilleure stabilité du 4F-AZO-POE à 37 °C. Après avoir étudié et comparé les propriétés de ces deux dérivés d'AZOs en solution, soumis à des stimuli lumineux et thermiques, leur association avec la molécule hôte β-CD a été étudiée.

II.5.Complexation des 4F-AZO-POE et 2Cl2F-AZO-POE avec la β-CD.

Il est important d'étudier les inclusions des 4F-AZO-POE et 2Cl2F-AZO-POE en fonction de leur isomérisation dans la cavité de la β-CD, afin de déterminer s'ils peuvent former des complexes photo-stimulables. En effet, pour obtenir un matériau photo-stimulable efficace, il faut trouver un AZO dont l'un des isomères possède une forte affinité avec la β-CD alors que l'autre non. Ainsi, la formation et déformation des complexes hôte/invité pourrait être totalement contrôlée par des stimuli lumineux. Comme pour l'AZO-POE la première étape de cette étude est l'observation des complexes et la détermination de leur stœchiométrie. Ensuite, les constantes d'affinité peuvent être calculées pour chaque isomère des deux composés.

II.5.1.Détermination de la stœchiométrie des complexes de dérivés d'AZO avec la β-CD : graphique de Job

En suivant le protocole précédemment établi, des graphiques de Job ont été tracés, à partir de

données de RMN du proton, afin de déterminer la stœchiométrie des complexes entre les différents isomères des 4F-AZO-POE et 2Cl2F-AZO-POE avec la β-CD. Les analyses sont regroupées en Figure 98. Les graphiques de Job sont modélisés par un polynôme du second degré dont la valeur à 0,5 représente le maximum de la courbe.[178] Ces modélisations, qui supposent la présence d'un complexes 1:1 représentent bien les données expérimentales pour trois des quatre composés étudiés. Comme pour l'AZO-POE, les graphes des deux isomères du 4F-AZO-POE, ont en effet un maximum à 0,5, de même que l'isomère *trans* du 2Cl2F-AZO-POE. Ces trois composés forment des complexes de stœchiométrie 1:1 avec la β-CD. La stœchiométrie 1:1 est la plus classiquement retrouvée dans les complexes supramoléculaires entre AZO et β-CD. Plus précisément, Zhang *et coll*. ainsi que Huang *et coll*. ont montré que les azobenzènes porteurs de 4 atomes de fluor en position *ortho* avaient tendance à se complexer en 1:1 avec la β-CD[147]. Il n'est donc pas surprenant de retrouver des stœchiométries 1:1 pour ces dérivés d'azobenzène.

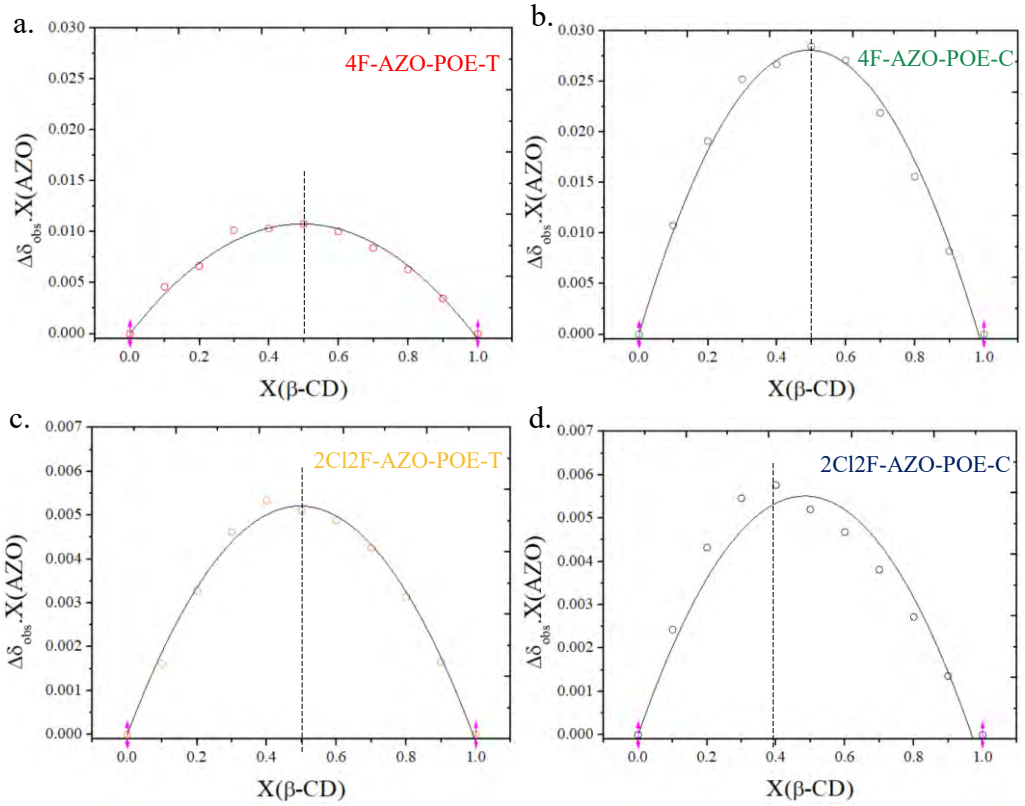


Figure 98 : Graphiques de Job des complexes a. 4F-AZO-POE-T/β-CD, b. 4F-AZO-POE-C/β-CD, c. 2Cl2F-AZO-POE-T/β-CD, d. 2Cl2F-AZO-POE-C/β-CD tracés à partir des données RMN ^{1}H à 500 MHz dans D_2O.

En revanche, le diagramme de l'isomère *cis* du 2Cl2F-AZO-POE ne semble pas être bien modélisé par la courbe en cloche classique d'un complexe 1:1 et son maximum semble tendre vers 0,4. Les erreurs résiduelles ont été tracées pour ces quatre modélisations (Figure 99). Selon

Thordarson[197], si les points expérimentaux sont modélisés avec un modèle correct, alors les erreurs résiduelles seront distribuées aléatoirement. A l'inverse, lorsqu'un modèle non convenable est choisi, la distribution des erreurs résiduelles est régulière et sinusoïdale. La distribution des erreurs obtenue avec le 2Cl2F-AZO-POE-C ressemble beaucoup à une sinusoïde. Ces tracés semblent donc confirmer que ce composé ne forme pas, ou pas seulement, un complexe 1:1 avec la β-CD. Un maximum à 0,4 peut représenter, en théorie, la présence de deux molécules hôtes complexées avec trois molécules invitées. Les complexes hôte/invité 2:3 sont peu décrits dans la littérature et n'ont jamais été observés pour des complexes entre azobenzènes et β-CD. Il peut également s'agir, comme théorisé par Ulatowski *et coll.*[176], d'un mélange entre une complexation 1:1 et une complexation 1:2, plus probable dans le cas de dérivés d'azobenzènes. A ce stade, il n'a pas été possible de conclure sur la stœchiométrie exacte du 2Cl2F-AZO-POE complexé par la β-CD ; la présence d'un mélange de plusieurs complexes n'étant pas exclue.

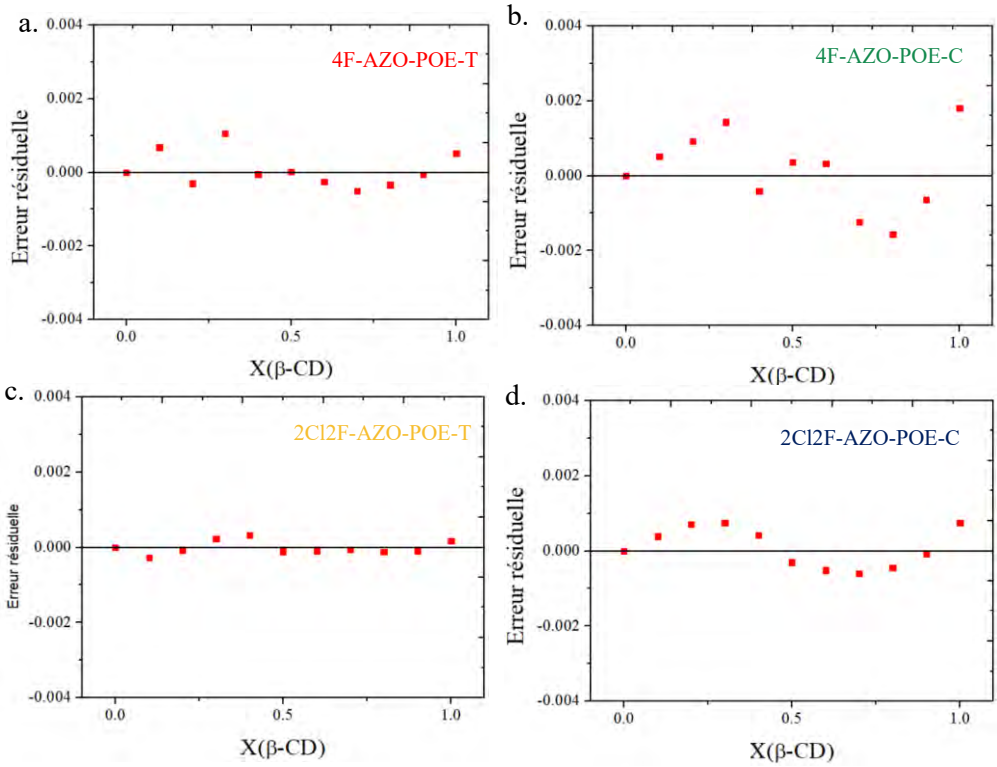


Figure 99 : Distributions des erreurs résiduelles obtenues en modélisant les diagrammes de Job de a. 4F-AZO-POE-T/β-CD, b. 4F-AZO-POE-C/β-CD, c. 2Cl2F-AZO-POE-T/β-CD, d. 2Cl2F-AZO-POE-C/β-CD avec un polynôme du second degré.

Pour ces composés porteurs de deux ou quatre atomes de fluor, la même expérience peut être réalisée en RMN du fluor. C'est ce qui a été réalisé avec le 4F-AZO-POE, disponible en plus grande quantité, afin de confirmer les résultats trouvés en RMN ^{1}H. On retrouve bien des

stichométries 1:1 pour les 4F-AZO-POE *cis* et *trans* (Figure 100).

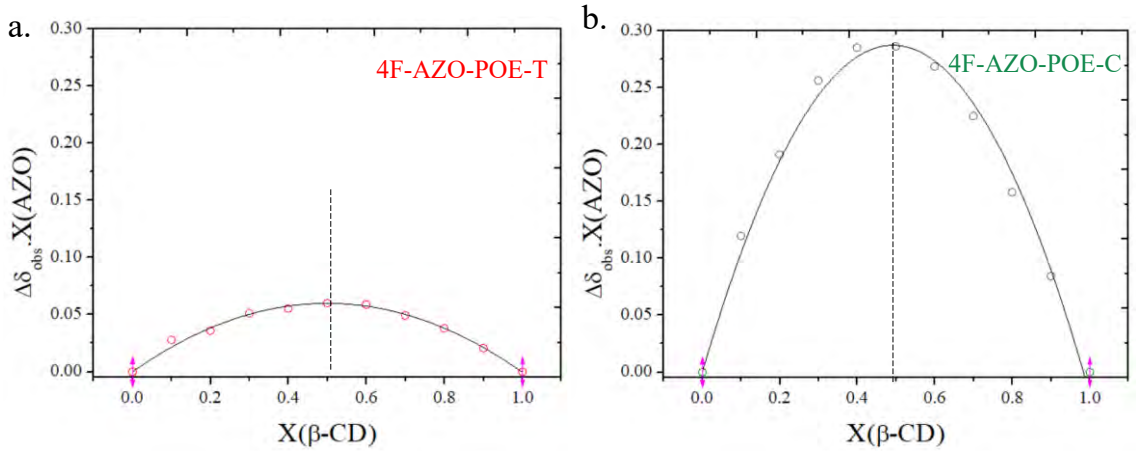


Figure 100 : Graphiques de Job des complexes a. 4F-AZO-POE-T/β-CD, b. 4F-AZO-POE-C/β-CD, obtenus à partir de données collectées en RMN ^{19}F à 400 MHz dans D_2O.

Il peut être noté que l'amplitude de la réponse mesurée en RMN pour le 4F-AZO-POE-C est dans les deux cas, environ trois fois plus importante que la réponse mesurée pour l'isomère trans. Ce phénomène pourrait signifier que le 4F-AZO-POE-C a une meilleure affinité avec la β-CD, ce qui confirmerait l'étude de Huang *et al.,* mentionnée plus tôt. Cette étude a en effet soulevé que l'AZO tétrafluoré possédant une chaine POE de 20 unités EO en *para* se complexait avec une plus grande affinité sous forme *cis* que sous forme *trans*[144].

La stœchiométrie des complexes entre les AZOs porteurs d'atomes électronégatifs en positions *ortho* et la β-CD a été déterminée avec succès pour trois des quatre composés étudiés, dans D_2O. Par la suite, les constantes d'associations de ces complexes ont été déterminées par la méthode de titrage par spectroscopie UV-Visible ou par RMN.

II.5.2.Constantes d'affinité des complexes entre dérivés d'AZOs et β-CD

Une fois la stœchiométrie des différents complexes déterminée pour trois des quatre composés étudiés, les Ka sont mesurées par la méthode de titrage en UV-Visible ainsi qu'en RMN pour le 4F-AZO-POE.

Pour titrer les dérivés d'AZO par la β-CD en UV-Visible, onze solutions sont préparées. Dans chacune d'elle, la concentration en photochrome est identique, égale à $4{,}3.10^{-5}$ mol.L^{-1} pour le 4F-AZO-POE et à $6{,}15.10^{-5}$ mol.L^{-1} pour le 2Cl2F-AZO-POE, tandis que des quantités croissantes de β-CD sont ajoutées. La Figure 101 montre l'évolution du spectre d'absorbance des différents composés en fonction de la quantité de β-CD dans le mélange. La détermination a été réalisée à partir des données d'absorbance à une longueur d'onde bien choisie. On a choisi,

pour cela, la longueur d'onde où la variation d'amplitude entre le spectre des dérivés d'AZO seuls et le spectre du complexe est significative : $\lambda_{obs,T}$ = 404 nm pour le 4F-AZO-POE *trans*, $\lambda_{obs,C}$ = 410 nm pour le *cis* et $\lambda_{obs,T}$ = 290 nm pour le 2Cl2F-AZO-POE *trans*. La stœchiométrie incertaine de l'isomère *cis* du 2Cl2F-AZO-POE avec la β-CD, empêche la détermination de la constante d'association du complexe.

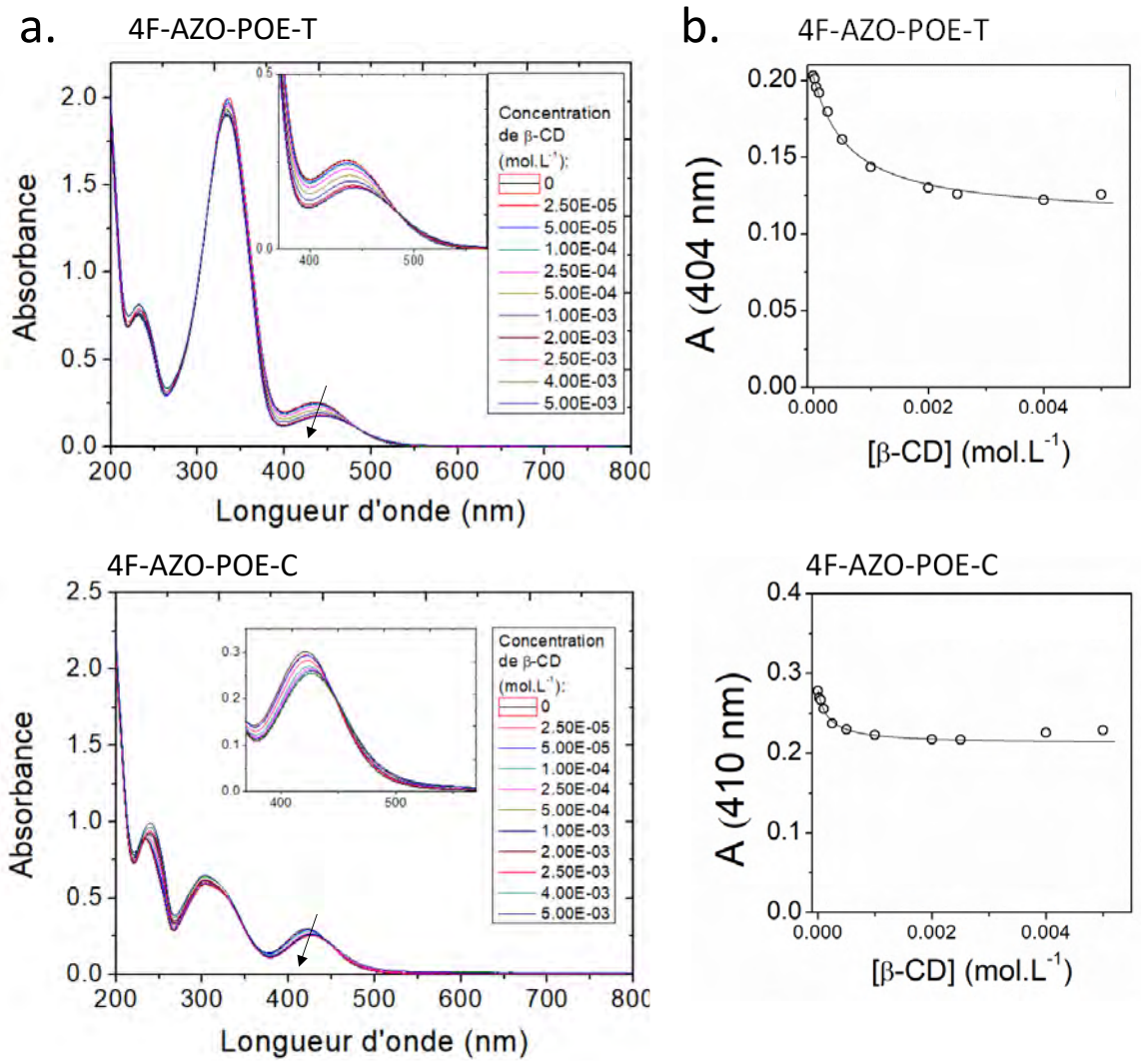


Figure 101 : Evolution a. des spectres UV-Visible du 4F-AZO-POE trans (haut) et cis (bas) en solution lors de l'ajout de β-CD et b. de l'absorbances à λ_{obs} en fonction de la concentration de β-CD des azobenzène trans (gauche) et cis (droite). [AZO]= 4,3.10^{-5} mol.L^{-1}

La modélisation grâce au logiciel SA de l'évolution de l'absorbance en fonction de la quantité de β-CD ajoutée permet de déterminer les constantes d'association pour les complexes précédents, de stœchiométrie 1:1. Les valeurs des Ka sont ainsi déterminées pour le 4F-AZO-POE : Ka_T = 1620 L.mol^{-1} pour l'isomère *trans* et Ka_C = 7120 L.mol^{-1} pour le *cis,* et pour le 2Cl2F-AZO-POE : Ka_T = 330 L.mol^{-1} pour l'isomère *trans*.

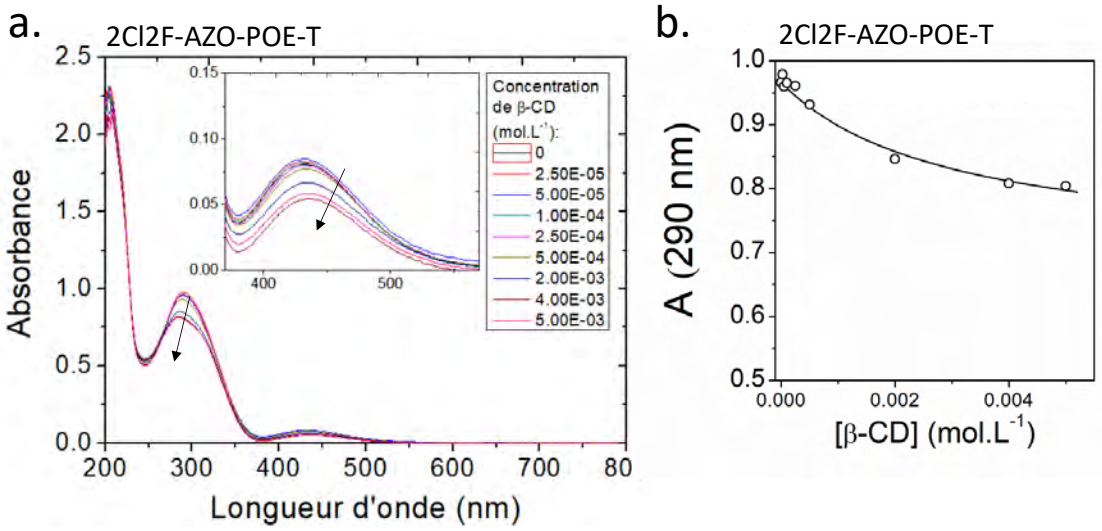


Figure 102 : Evolution a. des spectres UV-Visible du 2Cl2F-AZO-POE trans en solution lors de l'ajout de β-CD et b. de l'absorbances à λ_{obs} en fonction de la concentration de β-CD des azobenzènes trans. [AZO]= 5.10^{-5} mol.L^{-1}

Ces valeurs sont cohérentes avec les Job Plots, en effet, l'isomère *cis* semble avoir une affinité bien plus importante pour la β-CD que le *trans*. Cet azobenzène fluoré se comporte à l'inverse de l'azobenzène hydrogéné connu de la littérature[175]. Cependant, de telles valeurs ont déjà été rapportées par Huang *et al.*[144]. Dans cette étude, un azobenzène tétrafluoré possédant en *para* un greffon POE (900 g.mol^{-1}) est étudié. Les auteurs décrivent les constantes d'affinité suivantes pour la β-CD : 2300M^{-1} pour le *trans* et 4800M^{-1} pour le *cis*.

On notera également que les Ka trouvées pour le 4F-AZO-POE sont bien supérieures à $Ka_{POE-O-Ts}$= 784 L.mol^{-1} de l'impureté. De plus, étant présente à moins de 5%, le résidu de la synthèse ne devrait pas gêner la formation des interactions hôte/invité entre le dérivé d'azobenzène *cis* et la β-CD.

La spectroscopie par RMN peut également être utilisée pour déterminer la constante d'association entre molécules hôte et invitée. Comme pour déterminer la constante d'affinité de l'impureté avec la β-CD, un dosage suivi par RMN ^{1}H a également été réalisé pour trouver les constantes d'association des formes *trans* et *cis* du 4F-AZO-POE avec la β-CD. Le suivi du déplacement chimique d'un signal de la molécule hôte au cours du dosage est très couramment utilisé pour déterminer des Ka grâce à la linéarisation de Benesi-Hildebrandt. De même que pour l'observation en UV-visible, plusieurs solutions (huit ici) de même concentration en 4F-AZO-POE ($5{,}07.10^{-5}$ mol.L^{-1}) mais dont la quantité de β-CD varie ont été préparées. Une solution est préparée avec un large excès de β-CD ([β-CD] = 100x[AZO]) afin de déterminer le déplacement chimique maximum, causé par l'accroissement de la quantité de molécule hôte.

Pour les deux isomères, les signaux des protons aromatiques se déplacent (ANNEXE 2), il y a donc interaction hôte/invité. Deux méthodes ont été utilisées pour déterminer les constantes d'association des isomères du 4F-AZO-POE avec la β-CD : la méthode de Benesi-Hildebrandt et une modélisation par le logiciel SA (Figure 103).

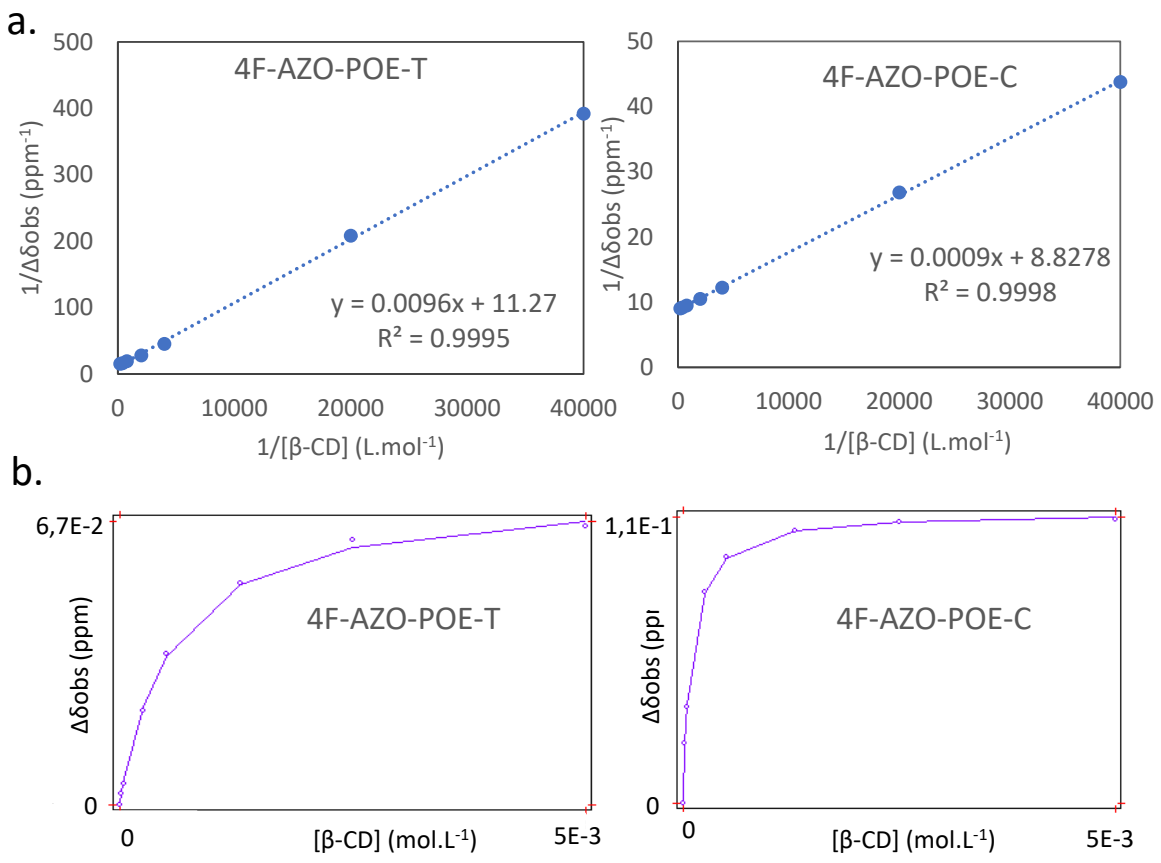


Figure 103 : Graphiques modélisant par a. linéarisation de Benesi-Hildebrandt et b. par le logiciel SA, les expériences de titrages par RMN ^{1}H du 4F-AZO-POE sous forme cis et trans par la β-CD.

Les constantes déterminées par ces deux méthodes sont regroupées dans le Tableau 14.

	RMN		UV-Visible
	Benesi-Hildebrandt	SA	SA
AF-AZO-POE-T/β-CD (L.mol^{-1})	1173	1776	1620
4F-AZO-POE-C/β-CD (L.mol^{-1})	9808	10170	7120

Tableau 14 : Valeurs des constantes d'association entre le 4F-AZO-POE-T et la β-CD et entre le 4F-AZO-POE-C et la β-CD trouvées par des différentes méthodes.

Les valeurs regroupées dans ce tableau sont plutôt cohérentes. Dans les trois cas, l'isomère *cis* forme un complexe plus stable avec la β-CD que le *trans*, ce qui a déjà été montré dans la littérature pour un azobenzène porteur de quatre atomes de fluor en *ortho*. De plus les ordres de grandeur des constantes entre un même isomère et la β-CD sont similaires dans les trois cas étudiés. On peut noter que la façon d'interpréter les résultats d'une même expérience apporte une certaine variabilité dans le résultat final, tout comme le choix de la technique d'analyse en apporte également. L'utilisation de plusieurs méthodologies de déterminations des Ka permet d'avoir un regard critique sur les résultats obtenus. Ici, ils sont relativement similaires. En conclusion, la forme *cis* du 4F-AZO-POE forme un complexe plus stable avec la β-CD que son isomère *trans*. En termes de matériau photo-sensible, cela signifie qu'un gel incorporant des interactions 4F-AZO-POE-C/β-CD devrait avoir une meilleure tenue mécanique que le même gel avec les 4F-AZO-POE en forme *trans*, à composition identique.

III. Conclusion

En conclusion, cette partie décrit une méthode par étapes pour la détermination des paramètres photochimiques d'un dérivé d'azobenzène porteur d'une chaine POE et de ses complexes avec les α, β, γ-CD. Cette méthode étape par étape couplée avec une modélisation numérique des expériences permet d'assurer la pertinence des valeurs extraites du modèle.

Deux dérivés d'azobenzènes sensibles à la lumière visible, 4F-AZO-POE et 2Cl2F-AZO-POE, ont été étudiés par la suite afin de déterminer la stœchiométrie et les valeurs des constantes d'association des complexes qu'ils forment avec la β-CD. Les isomères *trans* et *cis* de ces deux composés peuvent former des complexes hôte/invité avec cette cyclodextrine. Seule la forme *cis* du 2Cl2F-AZO-POE ne forme pas clairement un complexe 1:1 alors que c'est le cas des trois autres. Les Ka des complexes 1:1 ont donc pu être déterminées et la forme *cis* du 4F-AZO-POE a montré une complexation bien plus stable que l'isomère *trans*. La stabilité de l'isomère *cis* en solution a été également analysé et l'AZO-tétrafluoré est le plus stable des deux composés. Les propriétés de ces deux dérivés d'AZO sont comparées dans le Tableau 15 ci-dessous :

	4F-AZO-POE	2Cl2F-AZO-POE
PSS(530 nm) *trans:cis*	27:73	34 :66
PSS(415 nm) *trans:cis*	66:34	82:18
λ_{max} (n→π*) *trans*	434	440
λ_{max} (n→π*) *cis*	420	418
Ka (*trans* AZO/β-CD)	1620 $L.mol^{-1}$	330 $L.mol^{-1}$
Ka (*cis* AZO/β-CD)	7120 $L.mol^{-1}$	ND
Cis isomer $t_{1/2}$ at 37°C (h)	680	308

Tableau 15 : Tableau comparatif des principales propriétés des 4F-AZO-POE et 2Cl2F-AZO-POE.

Cette partie a ainsi permis d'étudier en profondeur les propriétés des complexes entre dérivés d'AZO solubles dans l'eau et cyclodextrines, pour choisir lequel de deux dérivés d'AZO sensibles à la lumière visible est le meilleur candidat pour la suite. Le 4F-AZO-POE a ainsi été sélectionné pour la stabilité de son isomère *cis* et car ses deux isomères forment des complexes de stabilité bien différentes avec la β-CD. Il a été par la suite greffé à un polymère multifonctionnel afin de l'utiliser dans la synthèse de matériaux stimulables par la lumière visible.

CHAPITRE 3

Synthèse et caractérisation d'hydrogels photo-stimulables

Après avoir étudié et caractérisé avec précision les interactions hôte-invité entre différents systèmes azobenzène/cyclodextrine, un candidat, le 4F-AZO-POE, a été sélectionné pour la suite de ce travail. Ce chapitre décrit les méthodes de synthèse et caractérisation de gels photo-sensibles à base de cet azobenzène et de β-CD. Dans un premier temps, les choix des composantes des hydrogels et leurs synthèses sont détaillés. Un gel composé d'un double réseau : gel chimique/gel physique a été choisi afin d'obtenir un matériau réticulé de façon covalente, par addition thiols-maléimides, et dont la rigidité peut être modulée grâce aux interactions physiques hôte/invité entre la cyclodextrine et les fonctions 4F-AZO photoisomérisables. La formation des gels a été envisagée à partir de 3 briques, un terpolymère pegylé de squelette méthacrylate portant des fonctions maléimides et des fonctions 4F-AZO, une β-CD fonctionnalisée par des groupements maléimides et deux poly(oxyde d'éthylène) fonctionnalisés di- ou tétra-thiols. La méthode des plans d'expériences a été utilisée pour choisir les formulations à mettre au point dans le cadre du cahier des charges des hydrogels. Ensuite, les méthodes utilisées pour la caractérisation des propriétés des hydrogels et leurs résultats ont été présentés discutés. Enfin, les différents challenges rencontrés au cours de ce travail ont été abordés. Plus précisément, le comportement du terpolymère dans l'eau a été étudié seul et face à différentes β-cyclodextrines car il s'agit d'un composant essentiel des gels photo-sensibles.
Le travail décrit dans cette partie est basé sur le travail préliminaire réalisé par le Dr. Jorge Royes-Mir, qui a fait l'objet d'une publication en 2017[165], et a été discutée précédemment dans ce manuscrit. Il a été utilisé pour comparer et discuter les résultats obtenus au cours de ce travail.

I. Synthèse d'hydrogels photo-stimulables

Dans cette partie, le travail réalisé autour des hydrogels photo-stimulables est décrit en détail, des choix de synthèse aux défis rencontrés. Tout d'abord, les briques élémentaires choisies seront décrites. Puis, la méthode des plans d'expériences sélectionnée pour le choix des formulations des hydrogels sera explicitée. La méthode ne sera pas expliquée en totalité mais ses fondements seront présentés afin de mettre en évidence son intérêt et son fonctionnement tel qu'utilisée dans ce travail. La synthèse des gels et ses optimisations dans l'optique de l'obtention de gels aux propriétés contrôlées sera ensuite présentée et discutée.

I.1. Choix des briques utilisées pour la synthèse de gels

Le choix de molécules blocs pour la synthèse d'hydrogels photo-stimulables a été motivé par plusieurs facteurs. Premièrement, ces matériaux sont destinés à des applications biologiques,

ils doivent donc être cytocompatibles. Le poly(oxyde d'éthylène) (POE) est l'un des polymères les plus utilisés dans le domaine de l'ingénierie tissulaire car il est hydrophile, adsorbe peu les protéines et est bien connu pour ses nombreuses utilisations *in vivo*[65]. Nous avons ainsi choisi d'incorporer du POE à notre système afin de travailler dans l'eau à moindre contrainte. Ensuite, le choix de matériaux photo-stimulables a été motivé par le fait que la lumière est un stimulus non invasif, facilement et rapidement contrôlable. Le caractère photo-stimulable sera apporté par le duo hôte/invité entre l'4F-AZO-POE et la β-CD déjà sélectionnée, qui répond à la lumière visible par complexation ou décomplexation. Enfin, la plupart des hydrogels physiques sont connus pour avoir une transition sol-gel et posséder de moins bonnes propriétés mécaniques que les gels chimiques. Dans l'optique de travailler avec des matériaux aux bonnes propriétés mécaniques, les gels ont été réticulés par des liaisons chimiques, en plus de la maille physique. La chimie thiol-ène a déjà été utilisée pour former des hydrogels à base de POE[216]. Le gel chimique sera formé grâce à la réaction d'addition de Michael entre maléimides et thiols. Les maléimides sont choisis car ils sont très réactifs en tant qu'accepteurs de Michael en présence de thiols (Figure 104). De plus, ils sont déjà largement utilisés dans la chimie des peptides bioconjugués car cette réaction fait partie des réactions de chimie click : elle est rapide à température ambiante, ne nécessite pas de catalyseur et s'opère dans des conditions physiologiques[217].

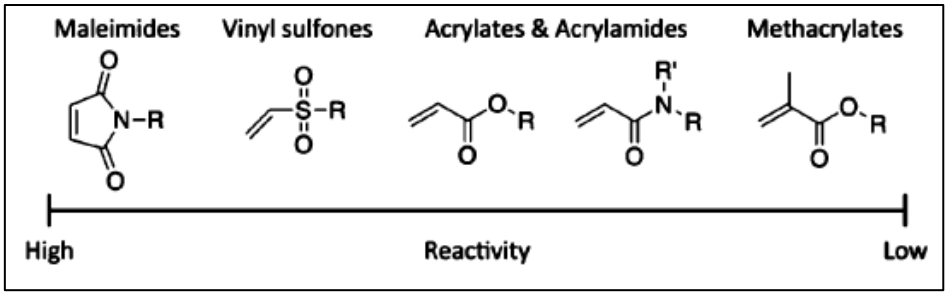


Figure 104 : Réactivité de groupes vinyliques régulièrement utilisés dans des additions de Michael[216].

En tenant compte de ces contraintes, deux molécules ont été synthétisées par l'entreprise Specific Polymers, partenaire de ce projet (Annexes 3 et 4) : une β-cyclodextrine porteuse de fonctions maléimides protégées par le diméthylfurane (DMFu) et un terpolymère aléatoire portant respectivement un motif tétra-fluoro-azobenzène, une longue chaîne POE et une fonction maléimide protégée par le diméthylfurane (Figure 105a. et b.), représentées par leur fractions respectives x, y et z. De cette façon, les deux molécules peuvent *a priori* participer activement à l'élaboration des deux réseaux, physique et chimique. La longueur des chaînes

POE (m, p et q) utilisées comme espaceur entre le squelette de type poly(méthacrylate de méthyle) et les fonctions du terpolymère sont ajustées afin que le polymère final ne montre pas de LCST dans les conditions physiologiques. En effet, l'étude des petites molécules à base de courtes chaînes POE a montré que la présence de ces courtes chaînes entrainait un phénomène d'agrégation au-dessus d'une température critique. Ce phénomène n'est pas souhaitable dans le cadre de la synthèse de gels transparents et homogènes. De plus, il a déjà été montré que les poly(oligo oxyde d'éthylène) méthacrylate étaient caractérisés par des LCST, qui peuvent être contrôlées en jouant sur la taille des greffons POE[218,219]. Plus les greffons sont longs, plus le polymère est hydrophile, ce qui augmente la LCST. Deux thiols commerciaux le POE-tétrathiol ou POE-4SH (Sigma-Aldrich, Etats-Unis) et le POE-dithiol ou POE-2SH (Polymer Source, Canada) (Figure 105c.) seront également utilisés dans la synthèse des hydrogels. Ils assureront la réticulation chimique selon la réaction de Michael maléimide-thiol.

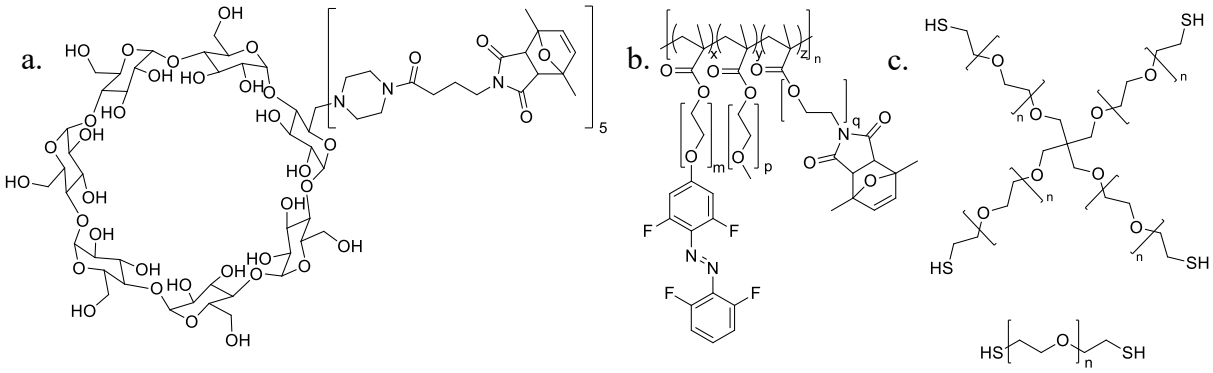


Figure 105 : Structures des molécules utilisées pour la synthèse d'hydrogels stimulables par irradiation lumineuse dans le visible. a. β-cyclodextrine maléimide protégée, b. terpolymère, c.thiols.

I.2. Synthèse, préparation et caractérisation des briques utilisées dans la synthèse d'hydrogels photo-sensibles

Les molécules nécessaires à la synthèse de gels photo-stimulables ont été synthétisées afin de répondre aux critères précédemment cités. La synthèse du terpolymère a nécessité la synthèse de trois blocs méthacrylates fonctionnels qui ont été polymérisés par polymérisation radicalaire contrôlée par transfert de chaîne réversible par addition-fragmentation (RAFT). Les fonctions maléimides protégées ont été déprotégées dans un second temps. Plusieurs β-CD porteuses de maléimides ont été synthétisées, une première portant en moyenne 5 maléimides. Cette molécule ayant un caractère trop hydrophobe, elle a été modifiée en introduisant un chaîne POE

par réaction avec un équivalent de POE-monothiol, une molécule soluble dans l'eau. Une troisième β-CD cette fois bismaléimide soluble dans l'eau a été synthétisée. Ces molécules ont dû, comme le terpolymère, être déprotégées au niveau des maléimides afin de devenir réactives. Une fois synthétisées, la fonctionnalité de ces briques de synthèse a été calculée le plus précisément possible. Il est important de connaître le nombre de fonctions que porte chaque molécule car, lors de la future synthèse de gels, les quantités de chaque brique sont ajustées en fonction de leur fonctionnalité. Connaître précisément ces valeurs permet un certain contrôle lors de la synthèse des hydrogels.

I.2.1. Terpolymère-maléimideprotégé-4F-AZO photo-sensible

Le terpolymère est la brique photo-stimulable engagée dans la synthèse d'hydrogel. Il est porteur de fonctions maléimides protégées (m_p) et de fonction 4F-AZO.

I.2.1.1. Synthèse du terpolymère-mp-4F-AZO

Le terpolymère a été synthétisé dans le DMF à partir de trois unités monomères, POE-MA-4FAZO (~95% *trans*), POE-MA-m_p et POE-MA. Cette synthèse est décrite dans l'ANNEXE 3. Le produit final possédant une fonction maléimide protégée s'étant avéré thermosensible, une polymérisation à faible température a été privilégiée. L'agent RAFT choisi pour cette réaction est l'acide 2-(dodécylthiocarbonothioylthio)-2-méthyl propionique et l'amorceur V-70 (Figure 106) a été sélectionné pour son activation à 30 °C, $t_{1/2}$(30°C) = 10h. Mener la réaction à 30 °C plutôt qu'à 70 °C en utilisant l'AIBN bien connu, a permis d'éviter la déprotection parasite des groupements maléimides. En effet, des expériences préliminaires avaient montré la présence de microgels dans le produit obtenu accompagnée d'une diminution drastique du nombre de maléimides protégés lorsque les réactions étaient menées à 70 °C. La présence d'une impureté dans le monomère POE-MA commercial a été de plus observée et participait également à la formation de microgels. Le monomère POE-MA a donc également été synthétisé pour la synthèse finale du terpolymère.

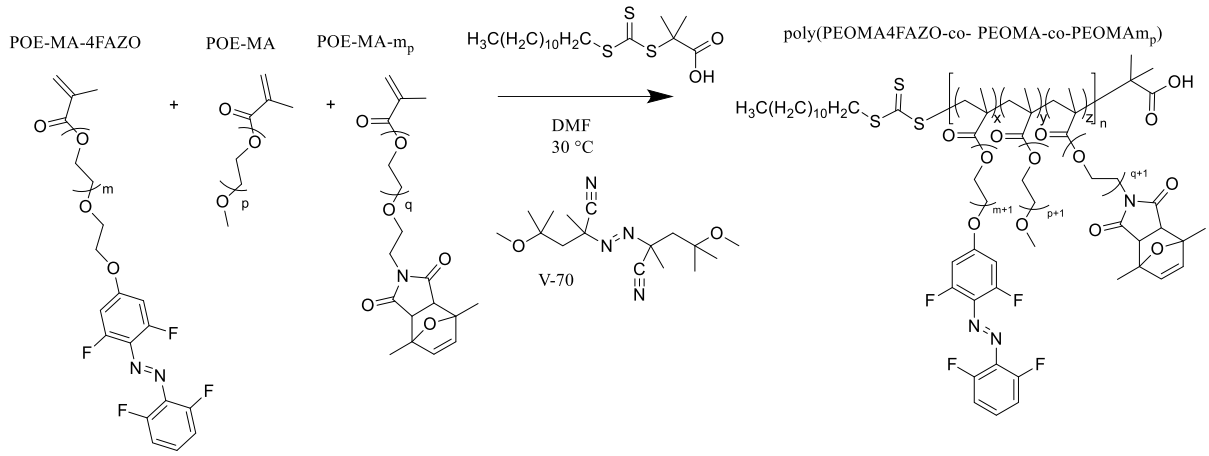


Figure 106 : Schéma de synthèse de la polymérisation RAFT utilisée pour la synthèse du poly(POEMA4FAZO-co-POEMA-co-POEMAm$_p$), ou terpolymère.

Les détails expérimentaux ainsi que les spectres RMN sont disponibles en Annexe 1. La polymérisation est reproductible et a donné une huile orange et visqueuse avec un rendement de 55%. Elle a cependant engendré une déprotection partielle des groupements maléimides. Une dernière étape de reprotection par réaction de Diels-Alder avec le diméthylfurane a donc été réalisée afin d'éviter la dégradation du polymère lors du stockage.

Les caractéristiques du terpolymère final ont été déterminées par RMN par Specific polymers et sont renseignées dans le Tableau 16. Le nombre de chaque bloc par chaîne de polymères a été déterminé en moyenne à 4,1 unités maléimides, 3,5 groupes 4F-AZO et 14,1 unités POE-OMe.

x	0.156
y	0.656
z	0.188
m	6.7
p	19.3
q	14.6
Mn (g.mol^{-1})	20000

Tableau 16 : Caractéristiques du terpolymère obtenues par RMN 1H.

Les fonctions maléimides sont protégées par le DMFu à cause de leur réactivité importante et variée[220]. De fait, elles doivent être déprotégées avant toute synthèse d'hydrogel. La déprotection s'effectue selon une réaction de rétro-Diels-Alder à 93 °C. Cette température correspond également au point d'ébullition du DMFu libre, ce qui permet son élimination, au cours de la déprotection.

I.2.1.2.Déprotection du terpolymère

Le terpolymère est soluble dans de nombreux solvants, notamment, les solvants chlorés, le DMF, le DMSO, le 1,4-dioxane, l'eau, le toluène. Le 1,4-dioxane a été choisi pour réaliser la déprotection puisqu'il peut être facilement éliminé par la suite. Un montage de type Dean-Stark a été utilisé pour déprotéger les fonctions maléimides du terpolymère, formant ainsi le terpolymère-m-AZO-4F, selon la réaction de rétro-Diels-Alder. La réaction a été suivie par RMN ^{1}H : les signaux caractéristiques du DMFu protecteur à 6,2 et 6,3 ppm disparaissent alors que le signal des maléimides à 6,7 ppm croit (Figure 107).

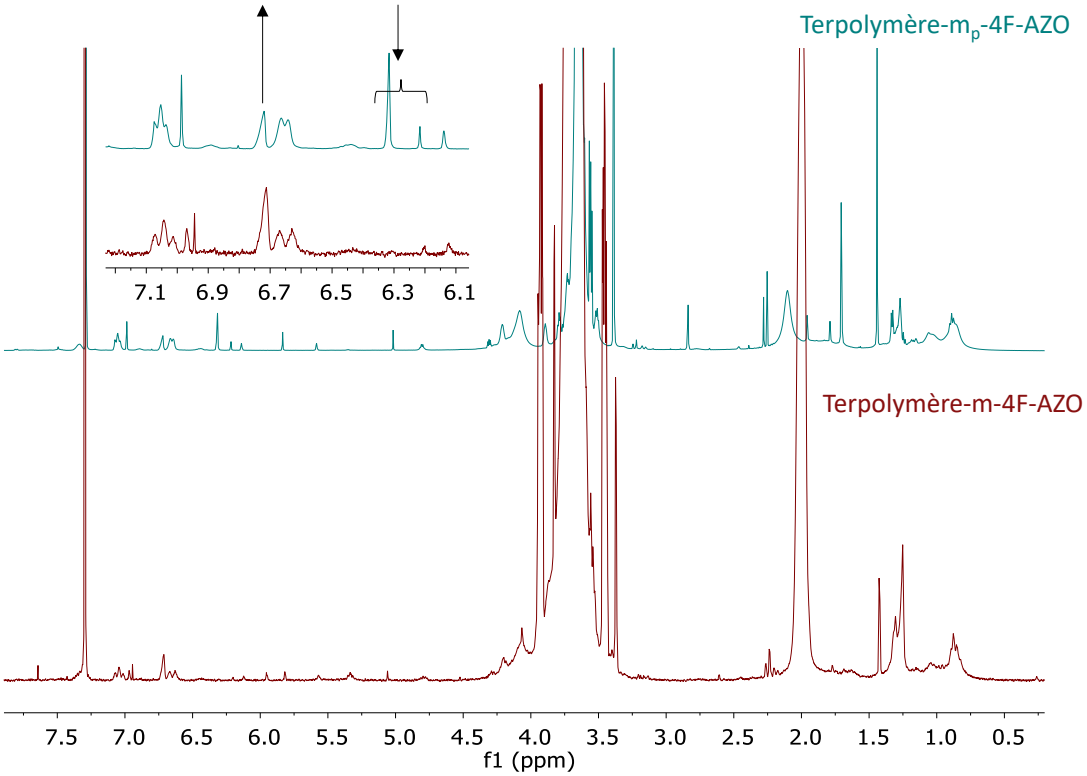


Figure 107 : Spectres de RMN 1H large et agrandissement de 5,9-7,5 ppm montrant en bleu le terpolymère-mp-4F-AZO porteur de groupes protecteurs DMFu et en rouge le terpolymère-m-4F-AZO dont les groupes protecteurs ont été éliminés alors que les fonctions maléimides deviennent libres.

I.2.1.3.Propriétés photochimiques et thermiques

Les caractérisations réalisées sur le 4F-AZO-POE ayant donné une constante d'association plus grande pour la forme *cis* que pour la forme *trans*, les synthèses de gels ont été effectuées avec le terpolymère portant l'isomère *cis* du 4F-AZO. Pour cela, le terpolymère déprotégé a été irradié à 530 nm jusqu'à l'obtention de l'équilibre photostationnaire. Une irradiation à 415 nm permet le retour à l'isomère *trans*, et le polymère peut subir plusieurs cycles d'irradiation sans photoblanchiment (Figure 108a. et b.). La proportion des deux isomères obtenus aux PSS a été

déterminée par ^{1}H RMN (Figure 108c.).

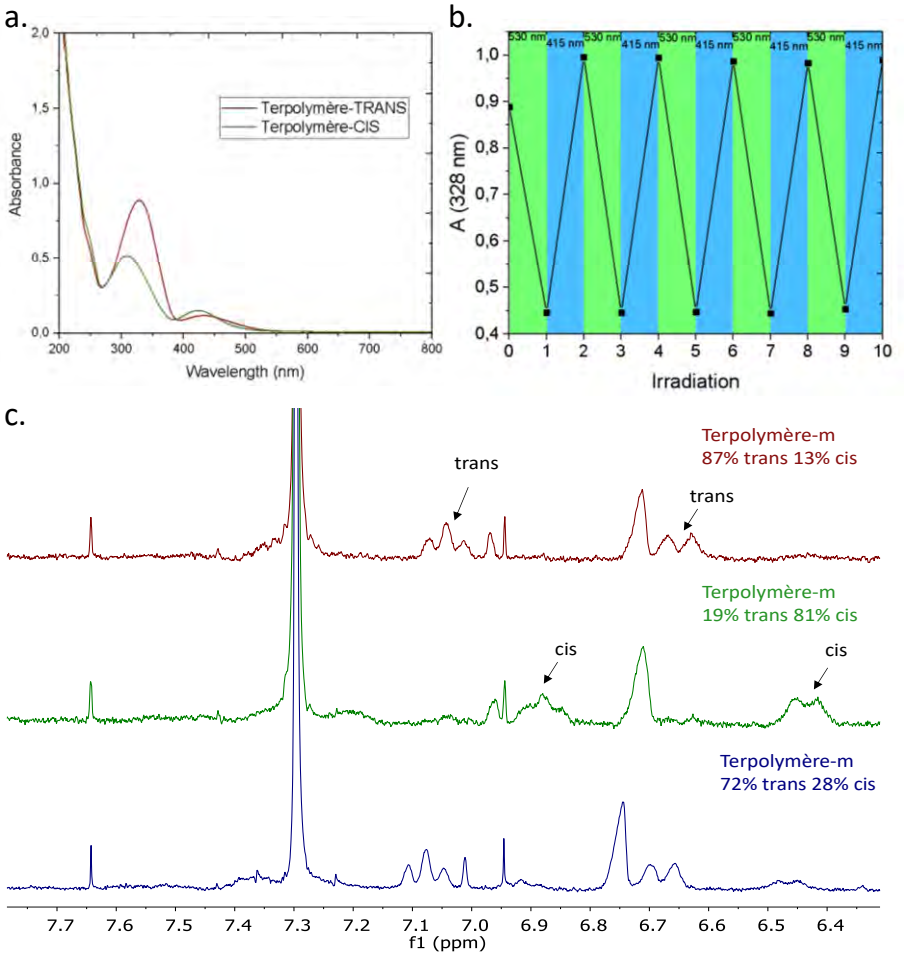


Figure 108 : a. Spectres d'absorbance du terpolymère possédant des 4F-AZOs sous forme majoritairement *cis* et *trans*. b. Absorbance du terpolymère suivie à 328 nm au cours d'irradiations successives à 530 et 415 nm. c. Agrandissement du spectre RMN ^{1}H entre 6,4 et 8,3 ppm du spectre du terpolymère dont les 4F-AZOs sont sous forme *trans* à l'équilibre thermodynamique (rouge), sous forme *cis* au PSS (vert) et sous forme *trans* au PSS (bleu). δ_{CDCl3}=7,29 ppm.

D'après l'intégration des signaux caractéristiques des protons du 4F-AZO-terpolymère en RMN ^{1}H, il semble que la photochimie permette d'atteindre des états photostationnaires un peu plus enrichis en isomère *cis* et *trans* que dans le cas du 4F-AZO-POE. Le PSS-C est enrichi en *cis* à hauteur de 81% contre 72% pour la petite molécule et le PSS-T est enrichi en isomère *trans* à hauteur de 72% contre 67%. Le greffage du 4F-AZO sur un polymère ne dégrade pas ses propriétés photochimiques.

Les propriétés thermiques du terpolymère ont été évaluées en conduisant un test de turbidimétrie entre 10 et 50 °C avec une solution de 65 mg.mL^{-1} de terpolymère protégé dans l'eau. La solution ne montre pas de point trouble dans cette gamme de température (Figure

109). Le composé a donc pu être envisagé pour le travail en conditions physiologiques.

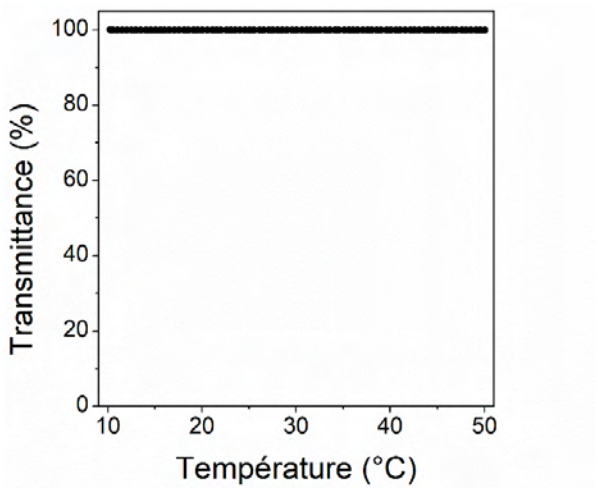


Figure 109 : Essai de turbidimétrie de le terpolymère dans l'eau : tracé du pourcentage de transmittance à 650 nm de la solution en fonction de la température au cours du chauffage à 1°C/min.

I.2.1.4.Fonctionnalités du terpolymère

La fonctionnalité des branches du terpolymère protégé est vérifiée par RMN ^{1}H. Le nitrométhane est utilisé comme étalon interne pour doser les fonctions terminales des branches car son signal apparaît entre 4 et 4.5 ppm, isolé du reste du spectre du terpolymère. Le pourcentage de chaque monomère (x, y et z) est calculé en faisant le rapport entre l'intégration du signal de chaque monomère sur la somme des intégrations des signaux de tous les monomères. Une comparaison des valeurs trouvées par rapport aux valeurs fournies par la fiche technique est donnée dans le Tableau 17.

Unité	Représentation schématique	Valeurs fournies par Specific Polymers (RMN ^{1}H)	Signal utilisé pour quantifier chaque fonction en ppm	Valeurs mesurées expérimentalement
4F-AZO	x	0,156	6,7	0,165
O-Me	y	0,656	3,25	0,649
Maléimide protégé + partie déprotégée	z	0,188	6,2-6,3 6,75	0,186

Tableau 17 : Comparaison des caractéristiques du terpolymère fournies par Specific Polymers et celles déterminées par étalonnage en RMN ^{1}H. x, y et z représentent le pourcentage molaire des unités 4F-AZO, O-Me et maléimide protégé respectivement.

Les valeurs trouvées sont très proches des valeurs attendues, ce qui confirme l'analyse. Le résultat du dosage a été exprimé en moles de fonctions réactives par gramme de composé. On trouve ici pour 1 gramme de terpolymère $2{,}79.10^{-4}$ mol de fonction azobenzène et $3{,}22.10^{-4}$ mol de fonction maléimides. Ces valeurs seront utilisées plus tard dans la formulation des hydrogels.

I.2.2. Fonctionnalités des POE-thiols

Deux thiols commerciaux sont sélectionnés pour servir d'agents réticulants : un POE-tétrathiol à 5000 g.mol^{-1} et un POE-dithiol à 8500 g.mol^{-1}. Pour déterminer la fonctionnalité en thiol de ces molécules, elles ont chacune été dosées par RMN ^{1}H avec un étalonnage interne. Comme précédemment, le nitrométhane est choisi comme étalon interne car sa fréquence de résonance entre 4 et 4,5 ppm est isolée des signaux des POE-thiols (Figure 110).

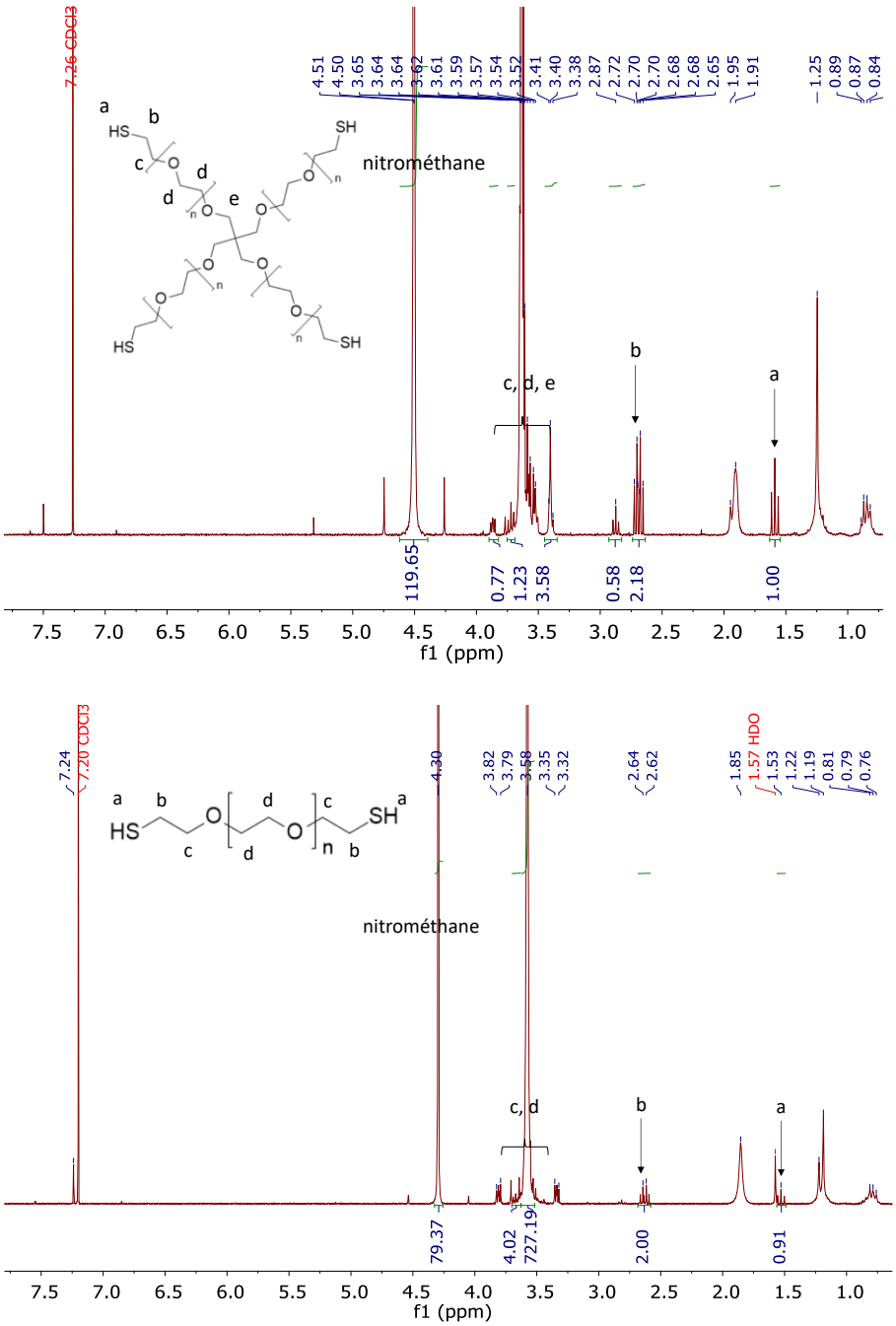


Figure 110 : Spectres RMN ^{1}H des POE-tétrathiol (haut) et POE-dithiol (bas) dans le chloroforme deutéré en présence de nitrométhane comme étalon.

Un POE-monothiol a également été utilisé dans la synthèse de la β-CD-m-POE. Sa fonctionnalité en thiol a été également déterminée par RMN ^{1}H (Figure 111).

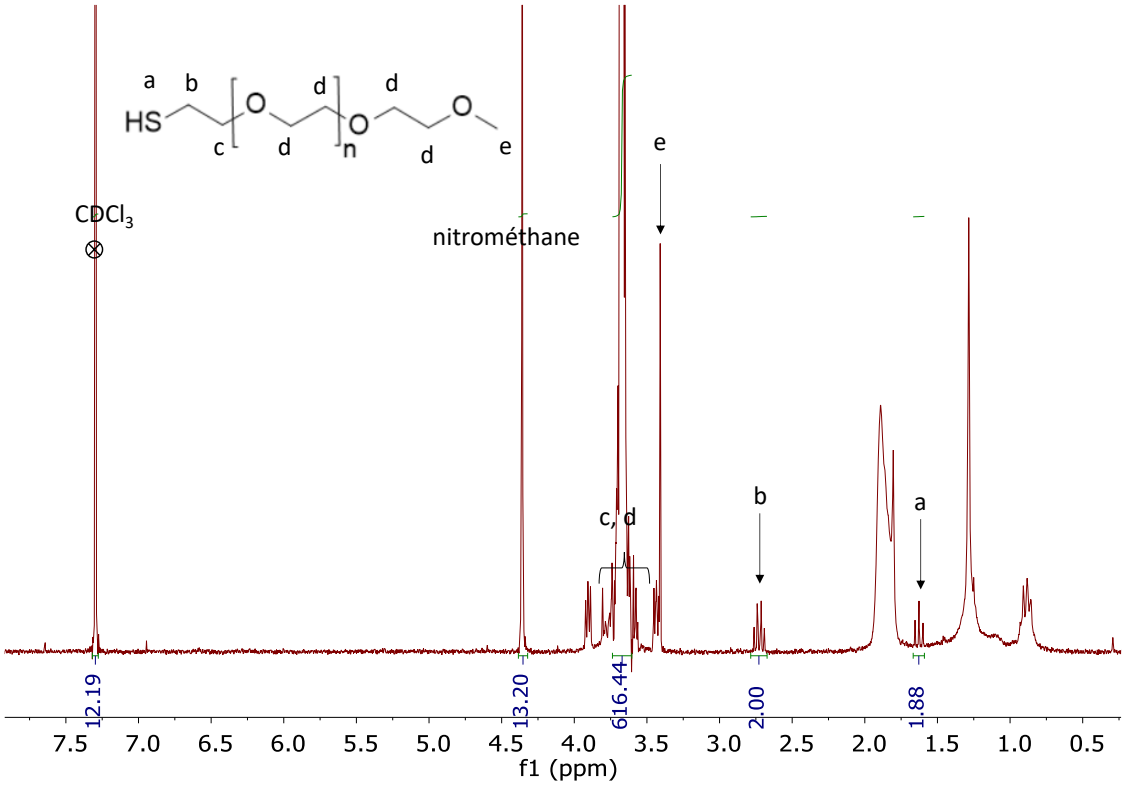


Figure 111 : Spectres RMN ^{1}H des POE-monothiol dans le chloroforme deutéré en présence de nitrométhane comme étalon.

Le nombre de moles de thiol présentes dans chaque composé de chaque lot utilisé a été déterminé puis exprimé par gramme de composé d'intérêt (Tableau 18).

	Mn(g.mol^{-1})	n_{SH}/g (mol/g)	Nombre de fonctions estimé par molécule*
POE-4SH lot 1	5000	6,6 x 10^{-4}	3,3
POE-4SH lot 2	5000	7,5 x 10^{-4}	3,7
POE-4SH lot 3	5000	8,5 x 10^{-4}	4,2
POE-2SH lot 1	8500	3,1 x 10^{-4}	2,6
POE-2SH lot 2	8500	1,2 x 10^{-4}	1,0
POE-SH	6000	2,3 x 10^{-4}	1,4

*en utilisant Mn du composé donné par le fournisseur

Tableau 18 : Résultats du dosage du nombre de fonctions thiols par g de polymère POE-SH par étalonnage interne en RMN.

I.2.3.β-cyclodextrine maléimide$_p$

La β-cyclodextrine est choisie pour sa faculté à complexer le 4F-AZO en milieu aqueux. Pour que cette molécule soit actrice de la réticulation chimique aussi bien que de la réticulation physique, elle doit être fonctionnalisée par des maléimides. La synthèse d'une β-cyclodextrine porteuse de fonctions maléimide a été réalisée par Specific Polymers et est décrite en détail en Annexe 2. Une fois la synthèse aboutie, les fonctions maléimides protégées par le diméthylfurane doivent être déprotégées pour pouvoir réagir avec des thiols en solution et former des gels.

I.2.3.1.Synthèse de la β-cyclodextrine maléimide$_p$

L'objectif de cette partie a été de synthétiser une β-CD porteuse de fonctions maléimides protégées diméthylfurane avec idéalement une fonctionnalité supérieure ou égale à 2, pour assurer sa participation à la réticulation chimique. La voie de synthèse sélectionnée est adaptée d'un article de la littérature[221] et consiste à greffer un synthon maléimide sur une β-CD préalablement modifiée par des fonctions pipérazine, comme illustré dans la Figure 112.

Dans un premier temps, la β-CD-pipérazine a été synthétisée en deux étapes :

- La tosylation sur les fonctions alcool primaires de la β-CD par réaction du chlorure de tosyle (ClTs) sur la β-CD. Cette étape introduit un nombre de groupement tosylate moyen sur la β-CD.
- La substitution du tosyl par la pipérazine.

Le synthon maléimide a été quant à lui synthétisé en trois étapes :

- Synthèse de l'acide maléimidobutyrique par réaction entre l'anhydride maléique et l'acide aminobutyrique ;
- Protection de la fonction maléimide par réaction de Diels-Alder avec le diméthylfurane
- Formation d'un ester activé NHS par réaction du N-hydroxysuccinimide (NHS) sur la fonction acide carboxylique du synthon.

Dans une dernière étape, le synthon maléimide protégé a été greffé sur la β-CD-pipérazine par réaction d'amidification entre les fonctions amines secondaires de la pipérazine et la fonction ester activée du maléimide protégé. A chaque étape, le taux de greffage de la β-CD a été total, ce qui a permis de conserver la fonctionnalité fixée lors de la tosylation.

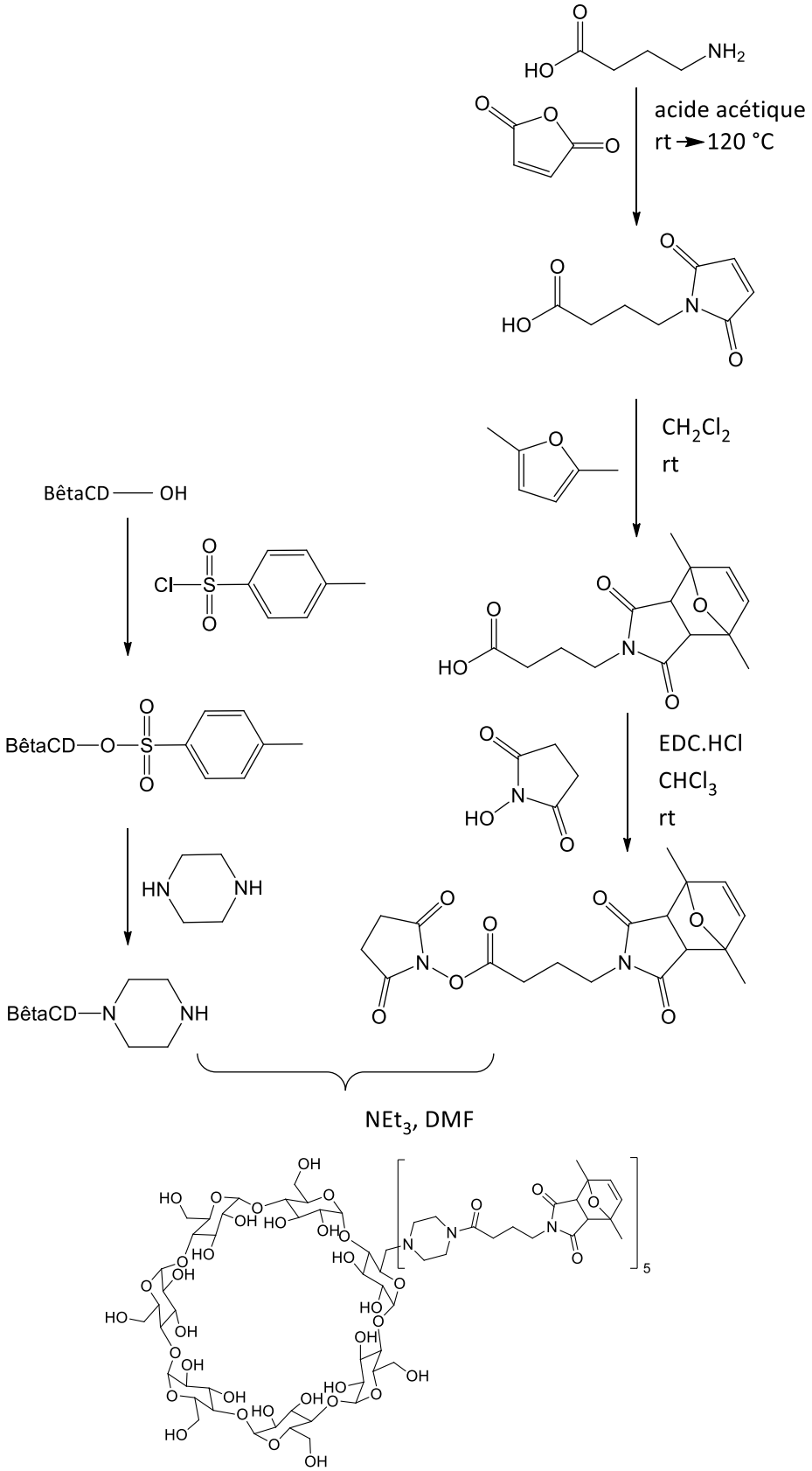


Figure 112: Stratégie de synthèse de la β-cyclodextrine maléimide$_p$. Le taux de greffage des tosyles évalué à 4,3 par RMN.

I.2.3.2.Déprotection de la β-cyclodextrine maléimide protégée (β-CD-m_p)

D'après sa fiche technique, cette molécule porte en moyenne 5,6 unités maléimides par cyclodextrine (déterminé par RMN ^{1}H) ce qui la rend extrêmement hydrophobe. Cependant, sa bonne solubilité dans le DMSO a permis de déprotéger les maléimides. Pour cela, la réaction de rétro-Diels-Alder a été réalisée à la température d'ébullition du DMFu pour permettre son élimination au cours de sa formation. La réaction a été suivie par RMN ^{1}H, grâce à laquelle on voit disparaître les signaux caractéristiques du DMFu protecteur à 6,25 et 1,5 ppm et s'enrichir le signal caractéristique des maléimides à 7 ppm (Figure 113).

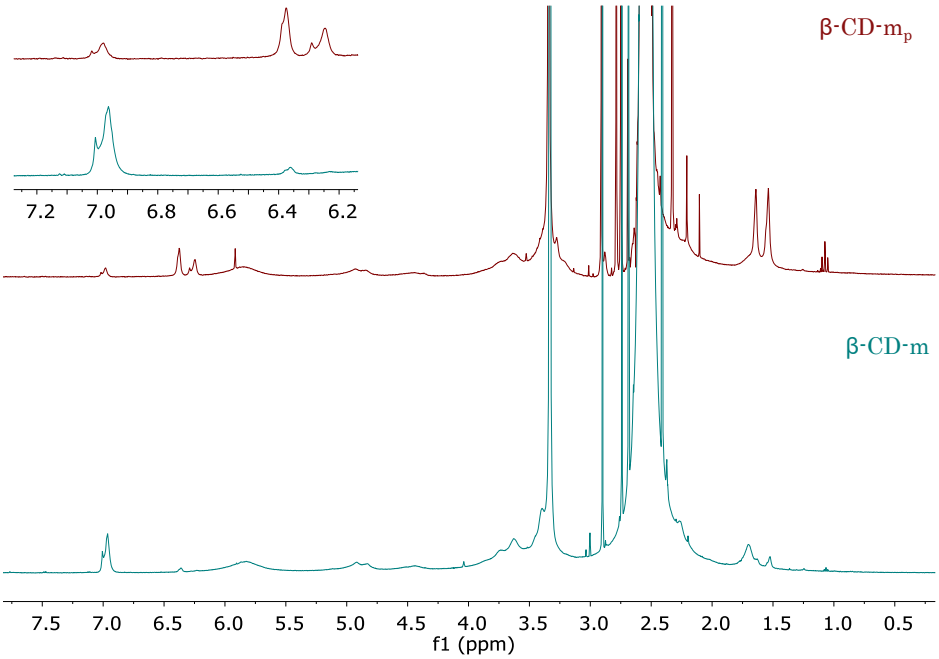


Figure 113 : Spectres de RMN ^{1}H montrant en rouge la β-CD-m_p porteuse de groupes protecteurs DMFu et en bleu la β-CD-m dont les fonctions maléimides ont été déprotégées.

La déprotection des fonctions a été quantitative et a permis d'obtenir une molécule réactive, prête à être engagée dans la synthèse d'hydrogels.

I.2.3.3. Fonctionnalité de la β-cyclodextrine maléimidep

Afin de déterminer le nombre de fonctions maléimides portées par cette β-CD, différentes techniques ont été utilisées : la spectrométrie de masse, la spectrométrie RMN du proton, l'analyse élémentaire ainsi qu'un dosage avec l'octane thiol par RMN ^{1}H.

Le nombre de fonctions maléimides présentes dans le composé β-cyclodextrine maléimide, a été déterminé par HPLC couplée à la spectroscopie de masse. Pour cela, le dosage a été effectué sur le précédent dérivé tosylé, dont les conditions de séparation sont beaucoup plus simples à

mettre en oeuvre (Figure 114). La détection a été réalisée en spectroscopie de masse à électrospray (ESI) couplée à un séparateur HPLC.

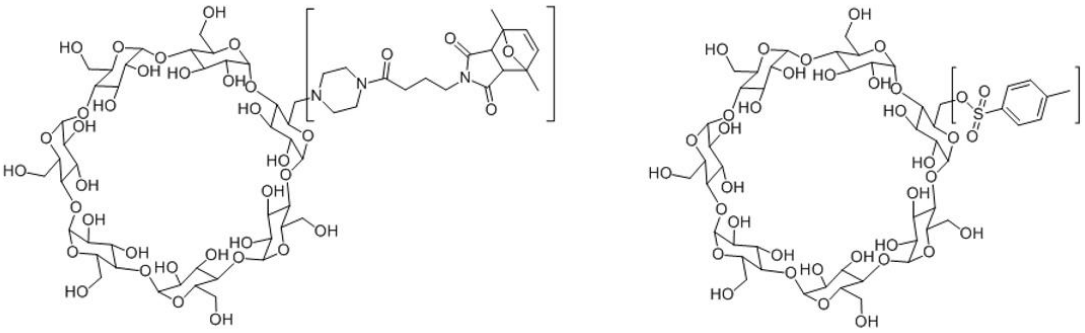
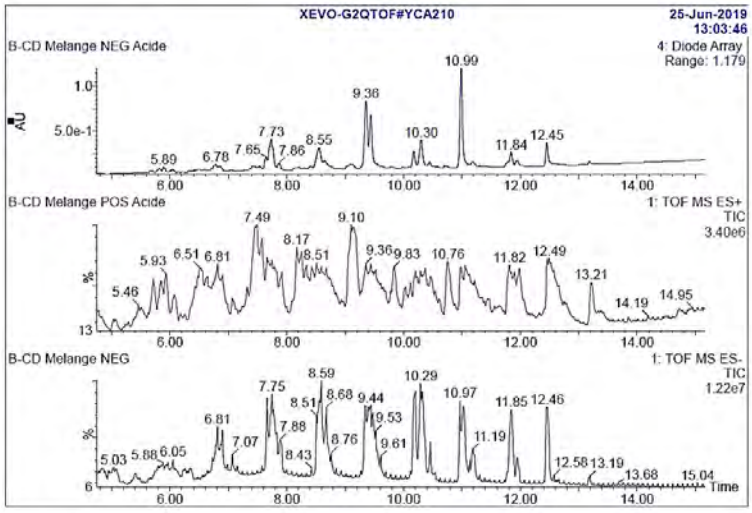


Figure 114 : Comparaison entre la β-CD d'intérêt et son parent tosylé utilisé pour la quantification des branches par spectroscopie de masse.

Le résultat des analyses en spectrométrie masse montre un très grand nombre de pics pas très bien définis. En analysant la composition de chaque pic et en la comparant aux masses molaires des β-cyclodextrines substituées 1 à 7 fois, il est cependant possible de retrouver sous chaque pic la signature d'un composé. En calculant la proportion d'aire qu'occupe chaque composé n-fois substitué, il est possible d'obtenir une distribution approximative représentant la présence de chaque molécule n fois substituée ($0 \leq n \leq 8$) dans le mélange (Figure 115). D'après les résultats obtenus, la β-CD tosylée analysée possède en moyenne 5 groupements tosyles. A chaque étape de synthèse, le taux de greffage de la β-CD a été total, donc la fonctionnalité en maléimides finale est également centrée sur 5 en moyenne par oligosaccharide.



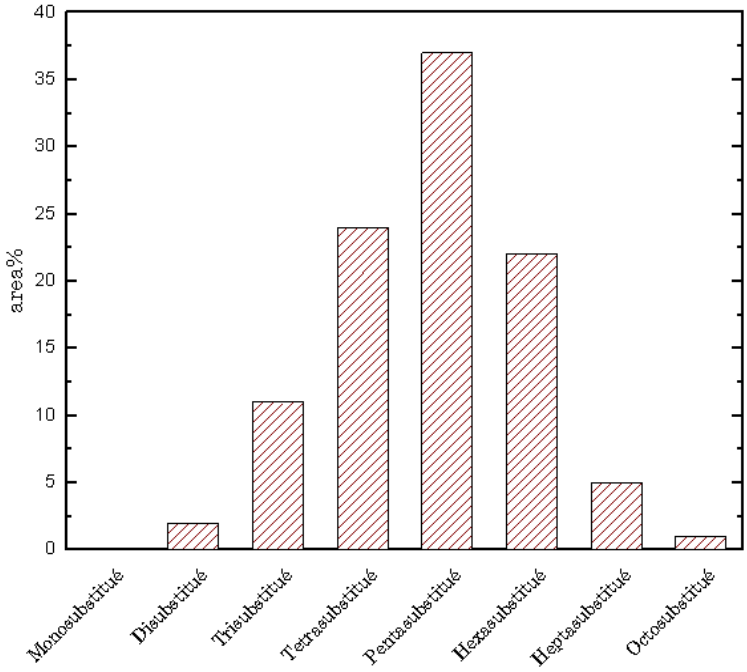


Figure 115 : Résultats des analyses par spectroscopie de masse sur la β-CD tosylée.

Une seconde méthode permettant de déterminer la fonctionnalité en maléimide de la β-CD est le dosage des fonctions en RMN ^{1}H réalisé sur la β-CD maléimide déprotégée. Le chloroforme est utilisé comme étalon interne pour doser les fonctions terminales des branches car son signal apparaît à 8,4 ppm, isolé du reste du spectre de la β-CD maléimide. La Figure 116 a permis de conclure à une fonctionnalité moyenne en maléimides de 5 par molécule de composé. Ce résultat est cohérent avec celui obtenu par spectrométrie de masse.

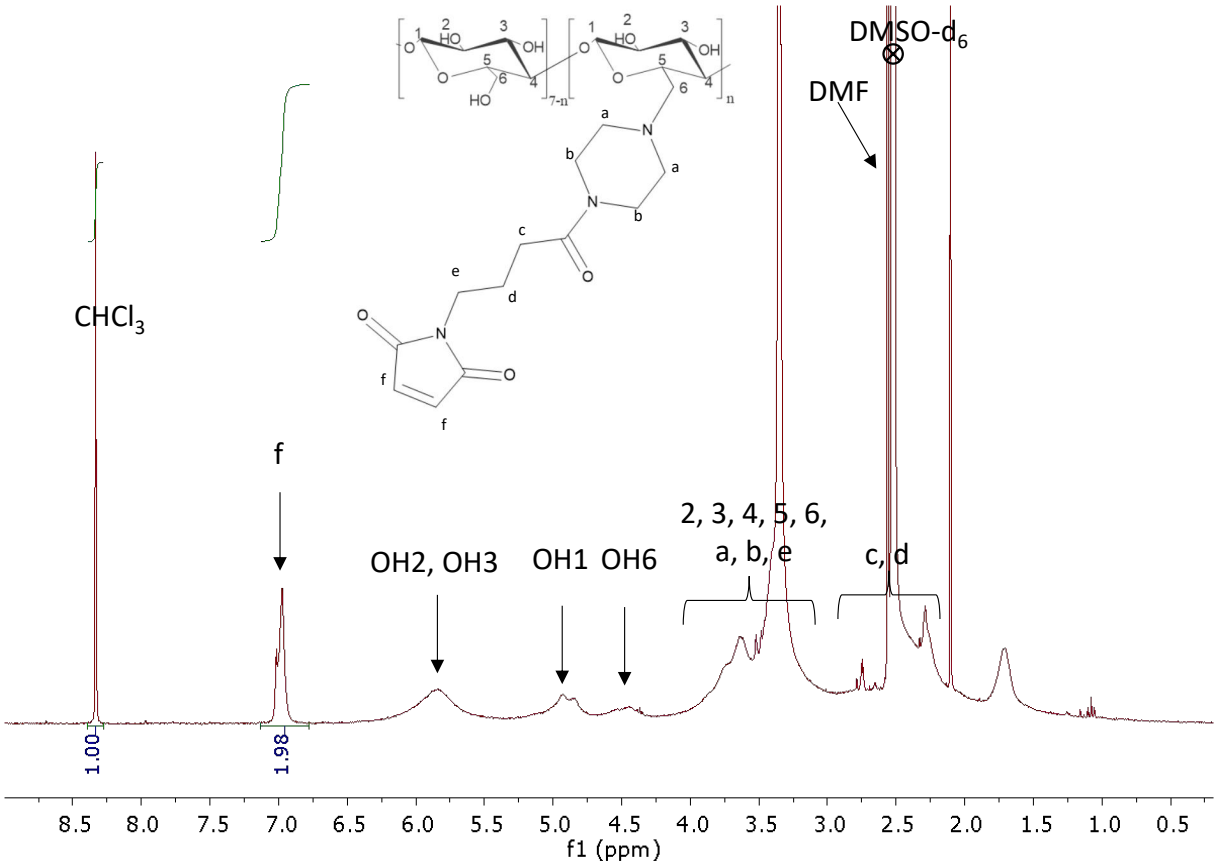


Figure 116 : Spectre RMN ^{1}H de la β-CD maléimide réactive dans le DMSO-d6 en présence du chloroforme comme étalon interne.

L'analyse élémentaire est une technique analytique qui permet d'obtenir la fraction massique de chaque élément présent dans un composé chimique. Cette technique a été utilisée pour analyser la β-CD maléimide protégée et déprotégée et ainsi déterminer le nombre moyen de groupements présents sur la β-CD. Les résultats de l'analyse élémentaire donnent un pourcentage massique moyen sur deux essais des éléments C, N et H dans les échantillons. Les valeurs trouvées sont renseignées dans le Tableau 19. Elles sont à comparer aux valeurs théoriques des molécules n substituées calculées (partie expérimentale). La présence d'atomes d'azote atteste de la présence de branches fonctionnalisées sur la β-CD. En comparant les valeurs de %m des éléments H, C et N à la théorie, le nombre de branches n'est pas très clair. Le %m de C est inférieur à celui attendu, ce qui pourrait s'expliquer par la présence de molécules d'eau associées à la structure. En considérant les %m de N et de H, il semblerait que le nombre de branches se situe entre 4 et 5 pour 1a molécule de β-CD. Cette valeur concorde avec les analyses précédentes.

Echantillon	%m éléments		
	C	N	H
β-CD-mP	50,15	7,26	6,7
β-CD-m	47,52	8,37	6,52

Tableau 19 : Nombre d'atomes de carbone (C), azote (N) et oxygène (O) mesurés sur les β-CD maléimides protégées et déprotégées. La valeur renseignée correspond à la moyenne sur deux mesures.

Le dosage des fonctions maléimides a pu être également effectué par titrage en RMN ^{1}H en utilisant le 1-octanethiol comme espèce titrante. L'objectif de ce titrage est de faire réagir les fonctions maléimides présentes avec des quantités connues de thiol *via* la réaction thiol-maléimide, qui est une réaction rapide quantitative. La Figure 117 montre les spectres RMN ^{1}H de la β-CD déprotégée en présence de quantités croissantes de thiol. La consommation des fonctions maléimides est évidente au regard de la décroissance du pic à 7 ppm. De même, les thiols sont consommés dans les premiers mélanges mais le pic caractéristique à 2,2 ppm apparaît de nouveau lorsqu'il n'y a plus de maléimide à consommer. Il est à noter que même en présence d'un excès de thiol il reste une petite fraction de maléimide qui ne réagit plus. Connaissant exactement la quantité d'octanethiol additionnée dans chaque échantillon, on peut, lorsqu'il est complètement consommé calculer la quantité de maléimide restant et déduire la quantité de maléimide de départ.

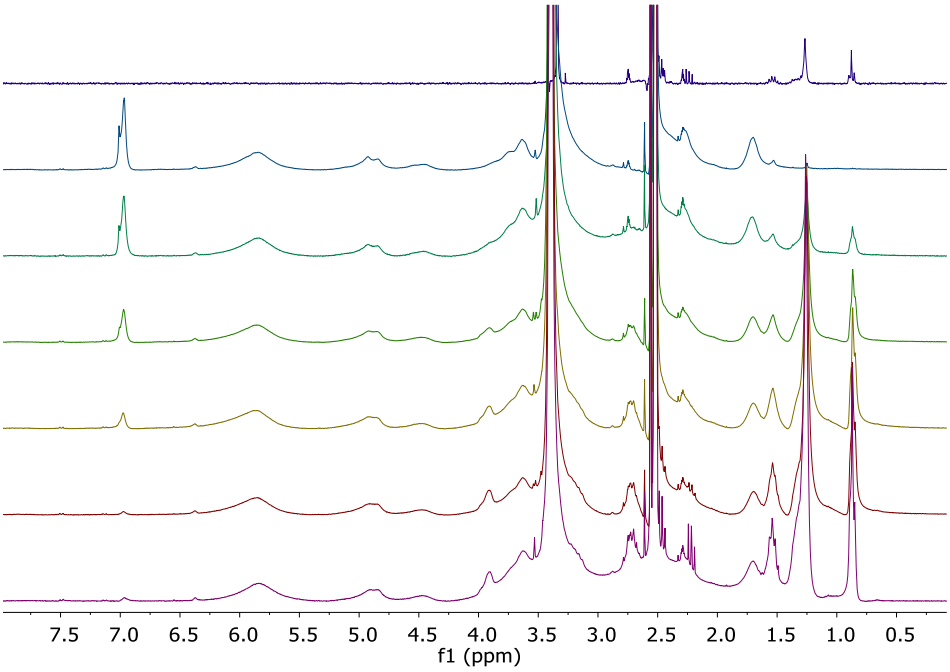


Figure 117 : Suivi par RMN ^{1}H du dosage des maléimides par le 1-octanethiol dans DMSO-d6.

Le calcul du nombre de moles de maléimides présents par mole de composé est disponible en partie expérimentale, ce nombre est évalué à 5,7 d'après ce dosage.

Technique	Nombre de maléimide par β-CD-m
Spectroscopie de masse	5
Spectroscopie RMN ^{1}H	5
Analyse élémentaire	4-5
Dosage par le 1-octanethiol en RMN ^{1}H	5,7

Tableau 20 : Résultats du nombre de fonctions maléimides par β-CD-m mesuré par différentes méthodes.

En résumé, quatre techniques analytiques ont permis d'estimer le nombre de maléimides par β-cyclodextrine-maléimide (Tableau 20). On conservera la valeur de 5 maléimide par β-CD-m pour la suite des expériences.

I.2.4.β-cyclodextrine-maléimide-POE (β-CD-m-POE)

Cette cyclodextrine est synthétisée afin de pallier les limites de solubilité dans l'eau de la β-cyclodextrine-maléimide.

I.2.4.1.Synthèse de la β-cyclodextrine-maléimide-POE (β-CD-m-POE)

La β-cyclodextrine-maléimide déprotégée s'est avérée insoluble dans l'eau, insolubilité certainement due à ses nombreux groupes maléimides hydrophobes. Une stratégie pour obtenir une molécule soluble dans l'eau a été envisagée : augmenter l'hydrophilie de la β-CD-m en fonctionnalisant *via* une réaction maléimide-thiol, l'une des 5 fonctions maléimides par un composé POE-monothiol de 6000 g.mol^{-1}. Cette synthèse est réalisée sous atmosphère inerte dans le DMSO, après déprotection des fonctions maléimides (Figure 118).

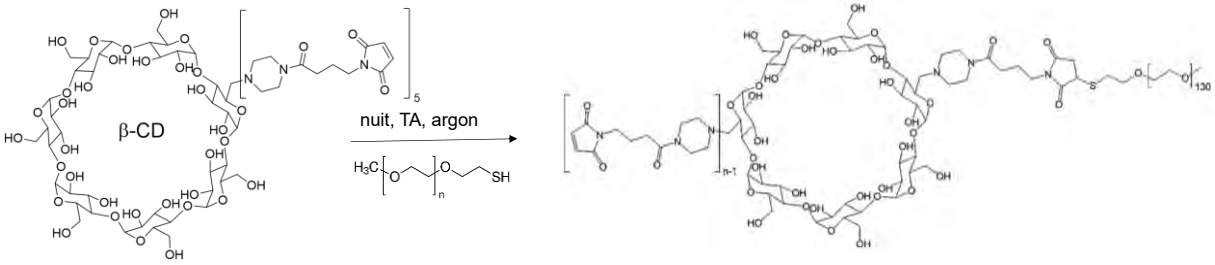


Figure 118 : Schéma de la synthèse d'une cyclodextrine-maléimide soluble dans l'eau.

Le thiol est additionné dans le mélange réactionnel en quantité telle qu'un équivalent de chaîne POE soit apporté par molécule de β-CD. La RMN ^{1}H est utilisée pour confirmer la présence de la chaîne POE sur la β-CD. Sur la Figure 119, on voit apparaître un signal très intense vers 3,5

ppm, c'est le POE. Le DMSO a été éliminé par dialyse et le produit a été lyophilisé.

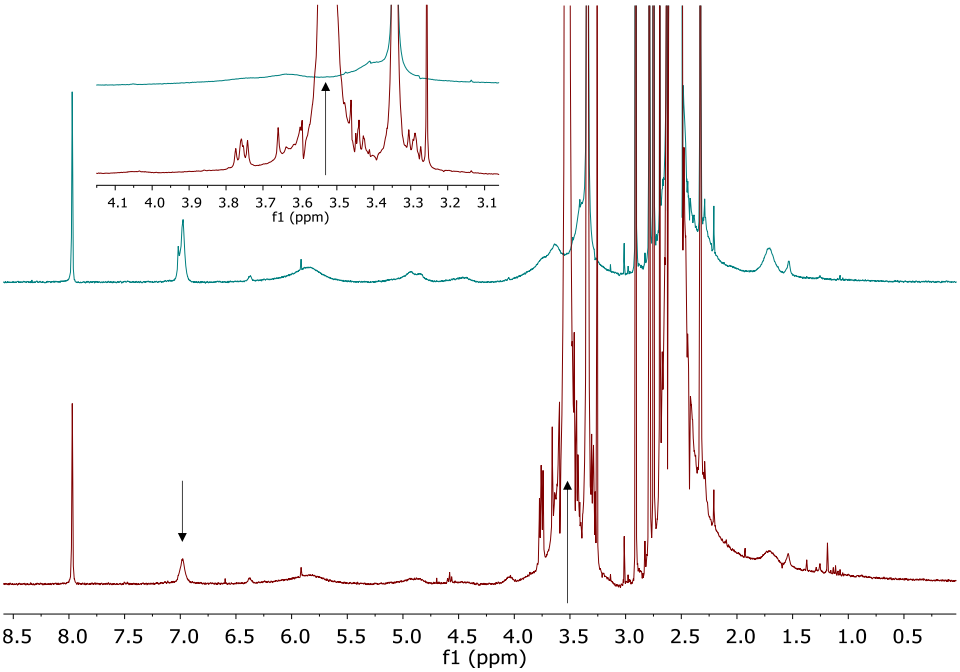


Figure 119 : Spectre RMN ^{1}H du brut réactionnel de la β-CD-m-POE après réaction entre la β-CD-m et le POE-SH dans le DMSO-d6.

Le signal des maléimides à 7 ppm diminue avec l'ajout de thiol qui réagit à leur contact. Le greffage a donc bien lieu. De plus, la molécule de β-CD-m-POE se dissout correctement dans l'eau, elle peut donc être utilisée dans la synthèse de gel dans un environnement 100% aqueux.

I.2.4.2.Fonctionnalité de la β-cyclodextrine-maléimide-POE

La fonctionnalité en maléimide de la β-CD-m-POE est évaluée par RMN ^{1}H en présence de DMF en tant qu'étalon interne. Le dosage donne une valeur d'environ 1,5 maléimide par β-CD-m-POE (Figure 120), ce qui est plus faible que la valeur de 4 attendue. Cependant, ramener le nombre de moles de maléimides dans l'échantillon à une valeur en nombre par β-CD-m-POE nécessite de connaître la masse molaire de la β-CD-m-POE. Cette masse molaire étant elle-même imprécise et moyenne, cela rend la quantification imprécise.

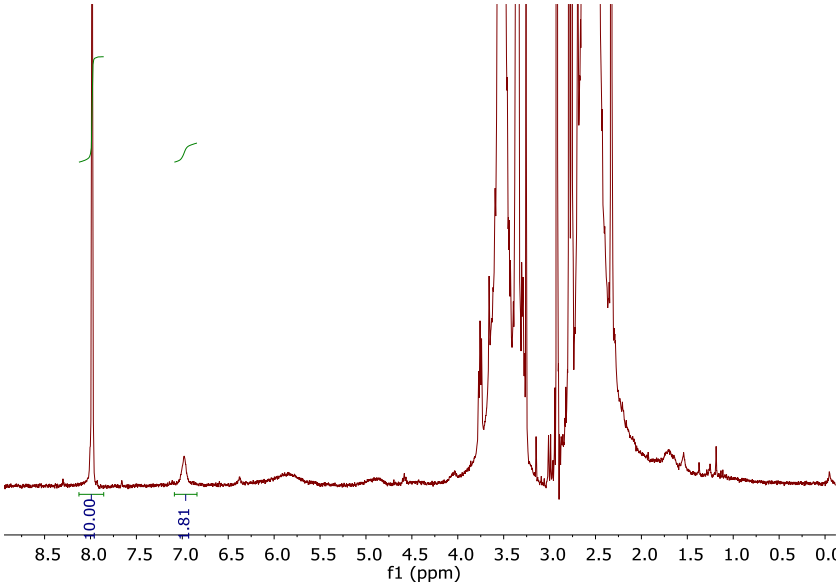


Figure 120 : Spectre ^{1}H RMN de la β-CD-m-POE en présence de DMF dans le DMSO-d_6, l'intégration du signal des maléimides à 7 ppm donne une valeur de 1,5 maléimides par molécule.

De plus, si l'on compare l'intégration du signal des maléimides à celui du proton acétal de la β-CD, il semble que l'on ait un minimum de 3,5 unités substituées par maléimide, en moyenne, sur chaque cyclodextrine (Figure 121).

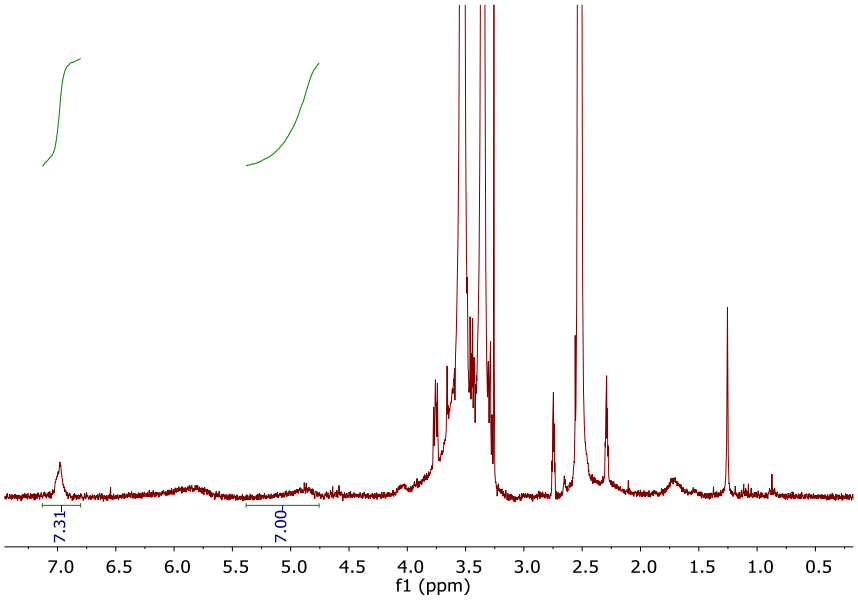


Figure 121 : Spectre RMN ^{1}H de la β-CD-m-POE dans le DMSO-d_6 après lyophilisation, comparant l'intégrale des maléimides déprotégée à celle des protons acétals H(1) de la β-CD.

La complexité évidente du dosage des fonctions maléimides sur la β-CD-m-POE nous a conduit à faire une supposition. Pour pouvoir commencer à travailler à partir de la molécule β-CD-m-POE, soluble dans l'eau, on considère sa fonctionnalité comme étant en moyenne de 4. En effet, la β-CD-m a une fonctionnalité moyenne en maléimide de 5 et l'on y greffe en moyenne 1

chaîne POE par β-CD. Il est donc raisonnable de considérer que la β-CD-m-POE possède une fonctionnalité moyenne de 4 maléimides par β-CD.

I.2.5.β-cyclodextrine-bismaléimide (β-CD-2m)

Une troisième molécule qui contient de la β-CD et des maléimides a été synthétisée. Cette β-CD-2m a pour objectif d'être soluble dans l'eau et de posséder une fonctionnalité connue. Une telle molécule a déjà été décrite par Royes-Mir *et coll.*, elle possède précisément 2 fonctions maléimides.

I.2.5.1.Synthèse de la β-cyclodextrine maléimide bismaléimide

La synthèse d'une β-CD-bismaléimide (β-CD-2m) a été réalisée en suivant le protocole décrit par Royes-Mir *et coll.* (Figure 122)[165].

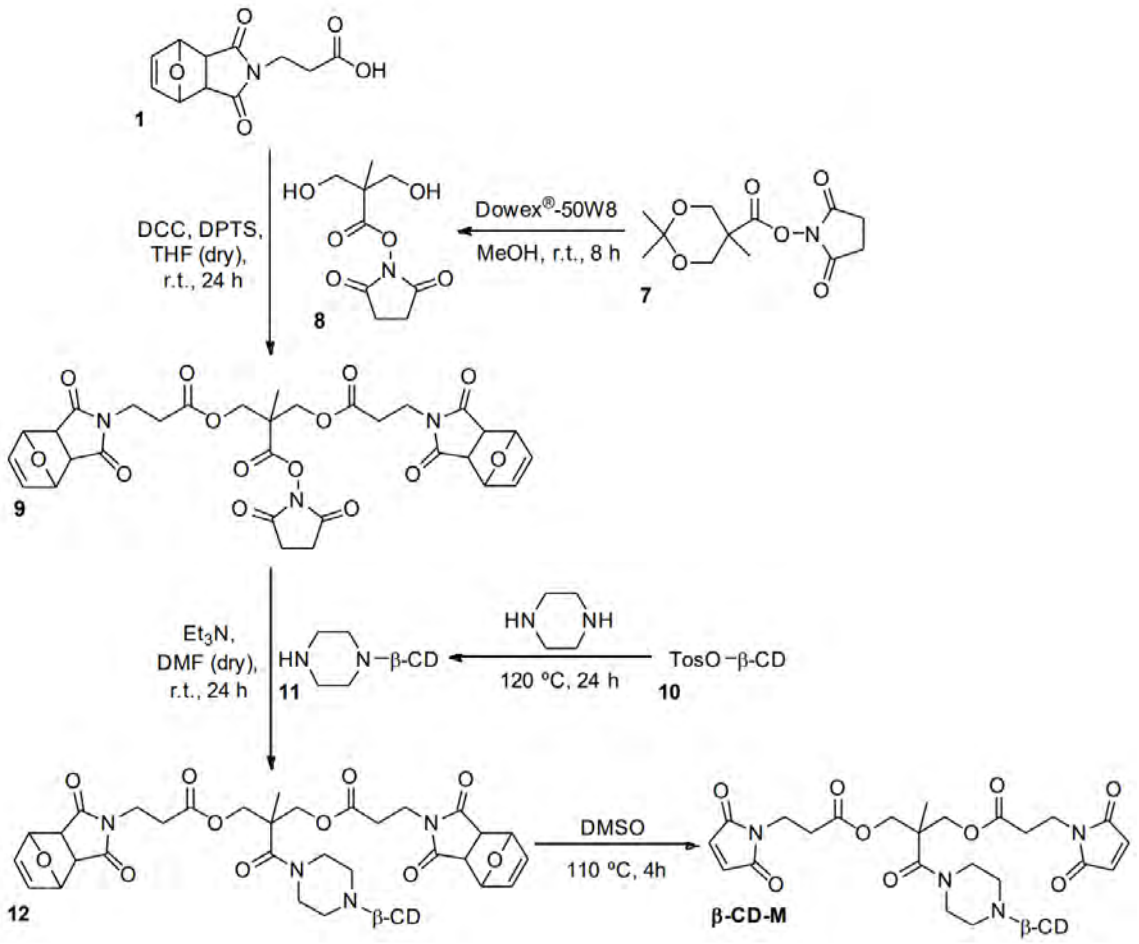


Figure 122 : Schéma de synthèse de la β-CD-2m[165].

Cette synthèse a été réalisée par Alexandre Wodrinski essentiellement, avec la participation de Specific Polymers. La molécule est fournie avec les groupes maléimides protégés par le

dimethylfurane, sous la forme d'une poudre rosée, dont la RMN ^{1}H est donnée en Figure 123.

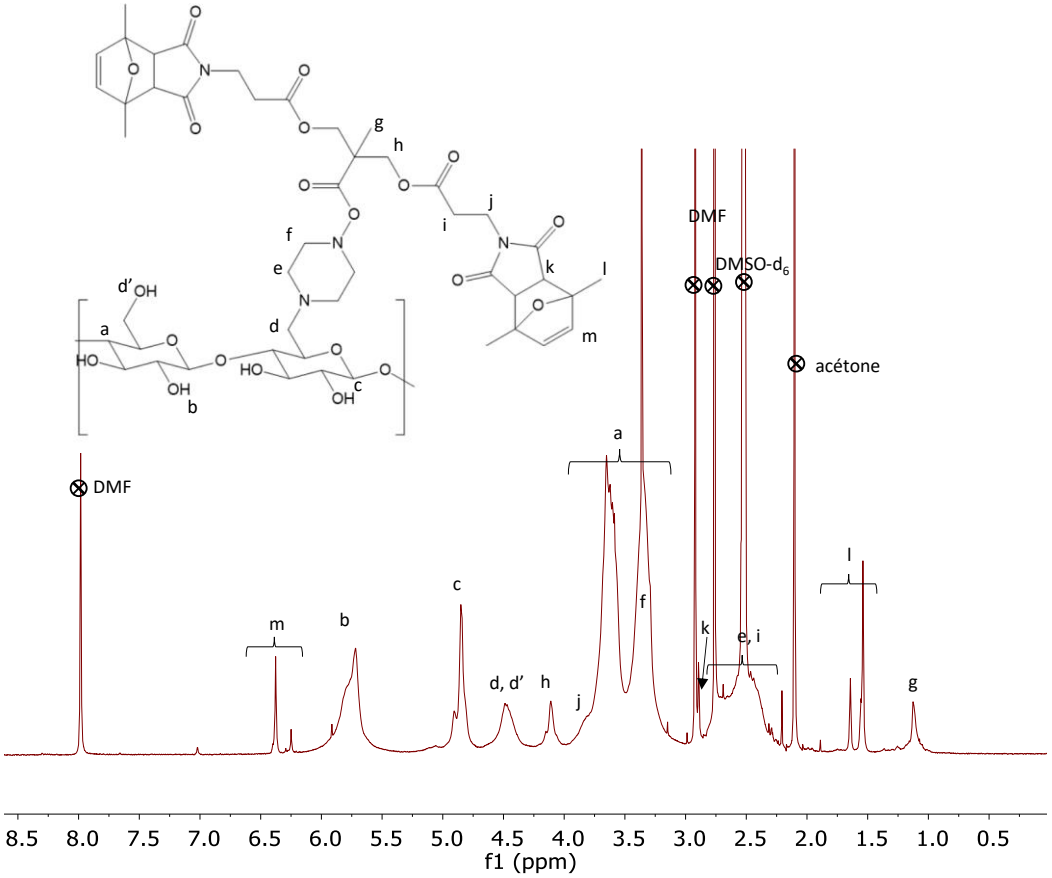


Figure 123 : Spectre ^{1}H RMN de la β-CD-2m dans le DMSO-d_6.

Cette molécule est soluble dans l'eau ainsi que dans le DMSO, solvant dans lequel a été effectuée le déprotection de ses fonctions maléimides selon le protocole adapté de Royes-Mir *et coll.* [165].

I.1.1.1.Déprotection de la β-cyclodextrine maléimide mono-di fonctionnelle

Comme pour la β-CD-m_p, cette molécule a dû être déprotégée avant de pouvoir être utilisée. Le protocole de déprotection est similaire à celui de la β-CD-m. La *retro*-Diels-Alder est quantitative, et le protocole de purification employé a été précédemment décrit[165]. La disparition du groupement protecteur ainsi que l'apparition des fonctions maléimides sont suivies par RMN ^{1}H (Figure 124).

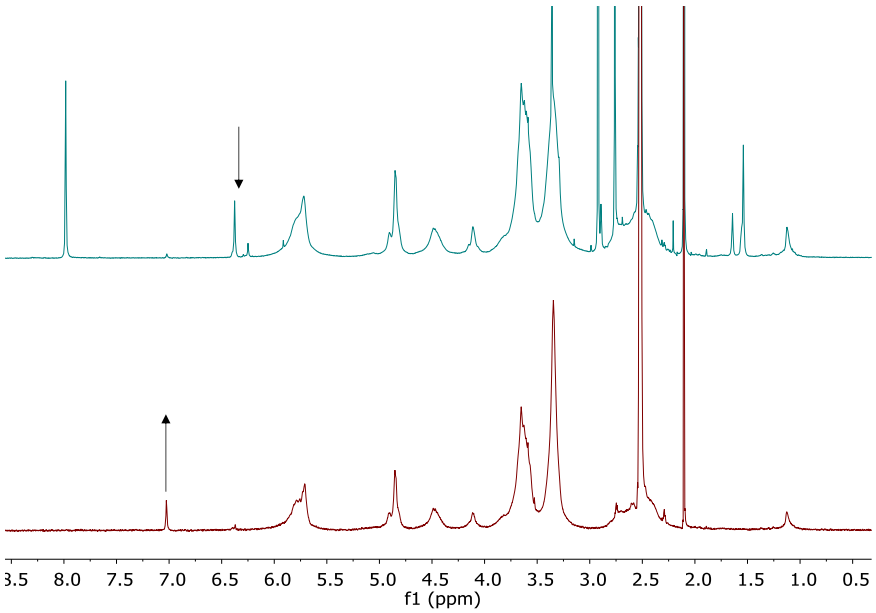


Figure 124 : Spectres RMN ^{1}H de la β-CD-2m protégée (bleu) et déprotégée (rouge) dans le DMSO-d6.

Cette molécule a l'avantage d'être soluble dans l'eau et sa masse molaire est précisément connue. Il s'agit d'une bonne candidate à la synthèse d'hydrogels.

I.2.5.2.Fonctionnalité de la β-cyclodextrine maléimide difonctionnelle

La fonctionnalité de cette molécule est déterminée par RMN ^{1}H en utilisant le DMF comme étalon interne. La fonctionnalité ainsi trouvée est d'environ 1,1 maléimide par molécule ce qui n'est pas les 2 prévus car le greffage n'a pas été quantitatif lors de la synthèse. Cette molécule peut être utilisée dans les synthèses de gel car elle est complètement hydrosoluble mais elle ne contribuera pas à la réticulation chimique du gel.

En conclusion, nous avons, dans cette partie, sélectionné plusieurs molécules candidates dans la formation d'hydrogels combinant réticulation physique et réticulation chimique. Nous connaissons exactement les fonctionnalités des thiols et du terpolymère. Déterminer la fonctionnalité en maléimide des différentes β-CD-maléimides s'est avéré complexe. De nombreuses méthodes ont été employées pour valider le nombre de maléimides portés par la β-CD-m, au nombre de 5. Une fois les briques constituantes des gels préparées et leurs fonctions quantifiées, les gels peuvent être synthétisés. Avant cela, il faut toutefois choisir les formulations à employer. Les gels seront composés de 4 briques et du solvant. Il s'agit d'un nombre important de paramètres à optimiser. Le choix des formulations est fait par les plans d'expériences, qui permettent d'optimiser les choix de formulation en réalisant le moins d'expériences possibles.

I.3. Choix des formulations, plans d'expériences

Une méthode courante pour déterminer l'influence des différents éléments d'une formulation est de fixer tous les paramètres du système et d'en faire varier un dans une gamme de valeurs définie par avance. Ensuite, cette valeur est fixée et une seconde est faite varier. C'est une méthode robuste, cependant elle nécessite de réaliser un très grand nombre d'expériences pour balayer correctement un système possédant autant de paramètres. De plus, elle ne considère pas les liens qui peuvent exister entre les variables, qui peuvent pourtant influencer l'optimisation de l'expérimentation.

I.3.1. Contexte d'utilisation

La méthode des plans d'expériences permet d'optimiser le nombre d'expériences à réaliser afin d'extraire le maximum d'informations d'un système complexe. Elle conduit ainsi, avec le moins d'expériences et la plus grande précision, à des résultats optimaux. De plus, les plans d'expériences permettent de quantifier et modéliser l'influence de paramètres choisis entre eux et sur la réponse étudiée, avec une bonne précision. La diminution du nombre d'expériences rend cette méthode particulièrement attractive dans le cadre de ce travail, car les synthèses de gels sont gourmandes en matières premières et celles-ci ne sont pas commerciales. Elles demandent du temps et de l'argent pour être produites, nous avons donc voulu limiter au maximum le nombre d'expériences.

Les plans d'expériences ont d'ailleurs déjà été utilisés pour optimiser des formulations d'hydrogels dans les domaines de la cinétique de libération de médicaments[222], du taux de gonflement[223], de la tenue mécanique[224]. Par exemple, Agnihotri *et coll.* ont étudié le pourcentage de relargage de capecitabine après 5h encapsulée dans des microsphères d'hydrogel de chitosane-poly(oxyde d'éthylène-g-acrylamide) en fonction de 4 variables indépendantes, grâce à un plan d'expériences[222]. Ils ont pu en conclure l'influence de chaque variable sur le relargage du médicament, ainsi que l'influence des variables les unes sur les autres en ne réalisant que 16 expériences. C'est également la méthode qu'avait utilisée Royes-Mir afin d'optimiser le module d'Young et la densité optique d'hydrogels photo-stimulables[165]. Il s'agit donc d'une méthode qui a prouvé son efficacité et que nous avons choisi d'utiliser pour notre étude.

I.3.2. Définitions et méthode

La mise en place d'un plan d'expériences implique des choix de la part des expérimentateurs et commence par les questionnements suivants : quelles sont les propriétés du système à optimiser ? Quels sont les paramètres que l'on peut modifier et dont on veut connaître l'influence sur ces propriétés ? Pour répondre à ces questions, nous définirons les paramètres suivants (Figure 125) :

Les réponses sont les grandeurs étudiées en sortie, celles dont on recherche les meilleures valeurs dans le processus d'optimisation.

Les facteurs sont les grandeurs dont on suppose qu'elles ont une influence sur les variations des réponses. Afin d'étudier l'influence de ces facteurs, différentes valeurs leur sont attribuées, ces valeurs sont appelées **des niveaux**. Les facteurs peuvent prendre des valeurs continues, discrètes ou qualitatives. Ils sont complètement caractérisés par un niveau bas, un niveau haut ou un nombre de valeurs intermédiaires, choisies régulièrement entre le niveau haut et le niveau bas.

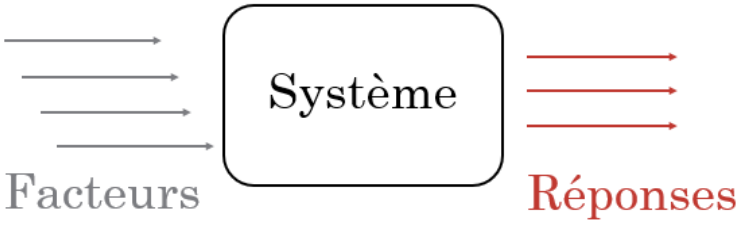


Figure 125 : Schéma représentant le principe simplifié du plan d'expériences.

Les plans d'expériences permettent d'établir des relations mathématiques entre réponses et facteurs ainsi que d'étudier les effets combinés entre des variables indépendantes et les relations non linéaires qui caractérisent les réponses. Pour cela, il est possible de construire un espace ayant pour dimension le nombre de facteurs, chaque point de cet espace représentant une combinaison de valeurs possibles de chacun des facteurs. On appelle cet espace le **domaine d'étude** (DE). Le DE inclut tous les points d'expériences (Figure 126). La méthode des plans d'expériences consiste à n'étudier que certains points du DE choisis pour leur propriété d'orthogonalité.

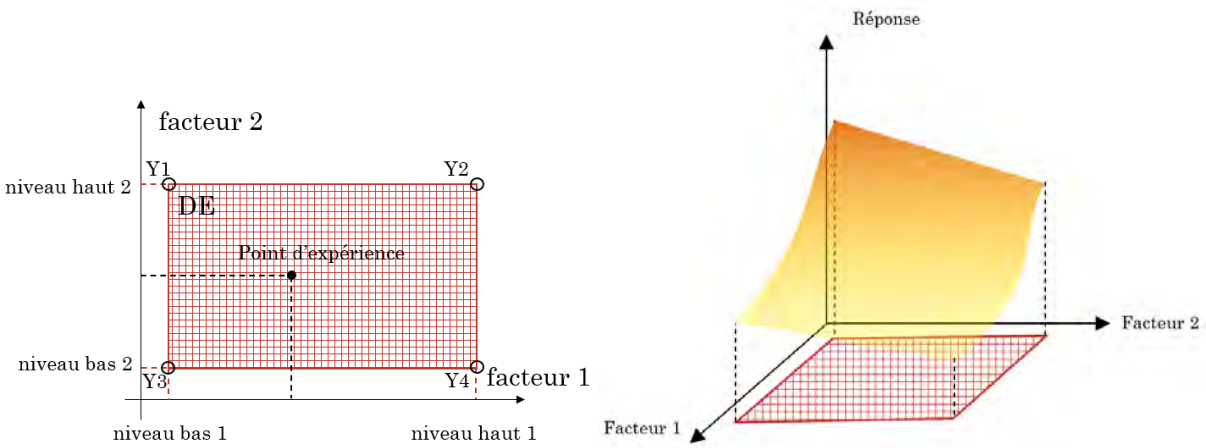


Figure 126 : Représentation du domaine expérimental et de la surface de réponse dans le cas d'un plan d'expériences à 2 facteurs.

Pour expliquer le choix des points expérimentaux, nous allons étudier le cas d'un système de 2 facteurs à 2 niveaux sur une réponse. Considérons que sur la (Figure 126), les facteurs 1 et 2 possèdent uniquement leurs niveaux haut et bas, le rectangle rouge représente le DE d'un tel système. La méthode des plans d'expériences consiste à mesurer la réponse du système aux extrémités du DE, c'est-à-dire aux points Y1, Y2, Y3, Y4. Tous ces points sont ensuite utilisés pour estimer l'effet du facteur 1 ainsi que celui du facteur 2, ce qui donne une grande précision au résultat par rapport à celle que l'on obtiendrait avec une méthode plus traditionnelle.

Le modèle mathématique postulé, dont les coefficients sont estimés à partir des points expérimentaux, peut être représenté graphiquement sous la forme d'une **surface de réponse**. Elle peut être représentée géométriquement sur un axe orthogonal à l'espace expérimental. Par exemple, on représente un plan d'expériences à deux facteurs dans 3 dimensions (Figure 126).

Une condition régissant l'utilisabilité d'un plan d'expériences est l'**orthogonalité**, c'est-à-dire que chaque niveau d'un facteur est associé à tous les niveaux de l'autre le même nombre de fois. Cela permet de ne pas introduire de biais et de calculer les effets d'un facteur indépendamment des autres.

On appelle **plan factoriel**, le plan d'expériences où au moins un essai est réalisé pour chaque combinaison de facteur. Pour un plan factoriel de k facteurs à deux niveaux, le nombre d'expériences vaut donc $N=2^k$. En adoptant la notation simplificatrice où un « - » représente le niveau bas d'un facteur et un « + » son niveau haut, on peut introduire la **matrice d'expériences** qui permet de déterminer les essais à faire pour un plan factoriel de 3 facteurs à 2 niveaux (Tableau 21).

Expérience	Facteur 1	Facteur 2	Facteur 3	Réponse
1	-	-	-	Y1
2	+	-	-	Y2
3	-	+	-	Y3
4	+	+	-	Y4
5	-	-	+	Y5
6	+	-	+	Y6
7	-	+	+	Y7
8	+	+	+	Y8

Tableau 21 : Matrice d'expériences d'un plan factoriel de 3 facteurs à deux niveaux.

Ici, le domaine expérimental peut être représenté par le cube schématisé en Figure 127.

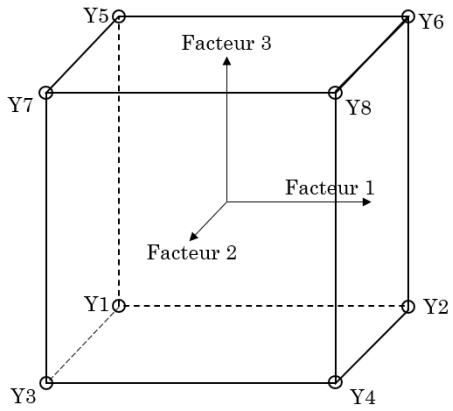


Figure 127: Domaine d'étude du plan 2^3.

On peut enfin écrire les **vecteurs d'effets** (Tableau 22) à partir de la matrice d'expériences. Ils permettent de calculer les effets de chaque facteur et les interactions entre les facteurs.

Expérience	Moyenne	F1	F2	F3	F1F2*	F1F3*	F2F3*	F1F2F3*	Réponse
1	+	-	-	-	+	+	+	-	Y1
2	+	+	-	-	-	-	+	+	Y2
3	+	-	+	-	-	+	-	+	Y3
4	+	+	+	-	+	-	-	-	Y4
5	+	-	-	+	+	-	-	+	Y5
6	+	+	-	+	-	+	-	-	Y6
7	+	-	+	+	-	-	+	-	Y7
8	+	+	+	+	+	+	+	+	Y8
Effet	I_0	E_1	E_2	E_3	I_{12}	I_{13}	I_{23}	I_{123}	

*les colonnes d'interactions sont calculées en multipliant les colonnes facteurs correspondantes

Tableau 22 : Matrice des vecteurs d'effets

Les valeurs des effets sont calculées par les formules suivantes :

$E_x = \frac{1}{N} * \langle F_x \rangle * \langle Y \rangle$ par exemple : $E_1 = (1/8) * (-Y_1+Y_2-Y_3+Y_4-Y_5+Y_6-Y_7+Y_8)$

et $I_x = \frac{1}{N} * \langle I_x \rangle * \langle Y \rangle$

On peut finalement estimer l'importance de chaque facteur sur la réponse et celle des interactions entre facteurs.

Il est parfois nécessaire d'augmenter le nombre de niveaux pour un ou plusieurs facteurs. Cela fait rapidement grimper le nombre d'expériences pour un plan factoriel. Pour pallier ce problème, il est possible d'utiliser un **plan fractionnaire**. Il s'agit de réduire le nombre d'expériences tel que $N = n^{k-p}$ avec n le nombre de niveaux, k le nombre de facteurs et p un nombre ajustable en fonction du nombre d'expériences que l'on désire obtenir. On choisira pour l'exemple de diviser en 2 la matrice précédente en regroupant les essais qui ont le même signe pour l'interaction F1F2F3 et on s'intéressera à la demi-matrice supérieure (Tableau 23).

Expérience	Moyenne	F1	F2	F3	F1F2*	F1F3	F2F3	F1F2F3
2	+	+	-	-	-	-	+	+
3	+	-	+	-	-	+	-	+
5	+	-	-	+	+	-	-	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+

Tableau 23 : Demi-matrice d'expériences d'un plan factoriel de 3 facteurs à deux niveaux

On remarque que les colonnes de cette demi-matrice sont identiques deux à deux. Seulement 4 effets pourront être calculés à partir de cette matrice, on les appelle des **contrastes**, ils représentent les sommes des colonnes jumelles. Diviser un plan factoriel en plan fractionnaire entraîne donc une perte d'information puisque l'on n'a plus accès aux effets de chaque facteur seul. Il est nécessaire d'être critique et vigilant lors de l'interprétation des résultats d'un plan fractionnaire. Cependant, on constate que chaque effet principal est jumelé avec une interaction, c'est toujours le cas dans un plan fractionnaire. De cette façon, si l'on choisit des facteurs tels que leurs interactions soient négligeables, alors on peut connaître les effets des 3 facteurs en réalisant 4 expériences au lieu de 8.

Lorsque l'on travaille avec un grand nombre d'expériences, il est possible de beaucoup fractionner le plan associé ; cela implique un plus grand mélange des interactions avec les effets principaux. Il faut alors construire judicieusement son plan fractionné de manière à coupler les effets d'intérêt avec des interactions minimes. Les plans fortement fractionnés restent cependant

source d'ambiguïtés et sont le plus souvent utilisés comme première approche d'un problème, avant de réaliser plus d'expériences pour préciser les effets intéressants.
Il existe une autre catégorie de plans d'expériences, qui n'est plus axée sur l'étude des facteurs et de leurs interactions (comme les plans fractionnaires), mais qui permet d'obtenir des modèles prévisionnels permettant une étude fine de la réponse choisie. C'est l'approche que nous avons souhaité suivre dans le cadre de la synthèse d'hydrogels photo-stimulables.

I.3.3. Matrice de Doehlert

En 1970, Doehlert a proposé un modèle de plans d'expériences appelé « *Uniform shell design* »[225]. Ces plans d'expériences, construits sur un réseau appelé de Doehlert, sont facilement applicables à l'optimisation de facteurs et demandent moins d'expériences que les plans d'expériences décrit auparavant dans la littérature. Le réseau de Doehlert décrit un DE sphérique, ses points expérimentaux sont répartis de manière uniforme dans le DE. Pour deux facteurs, il peut être représenté par un point au centre et six autres points formant un hexagone régulier (Figure 128).

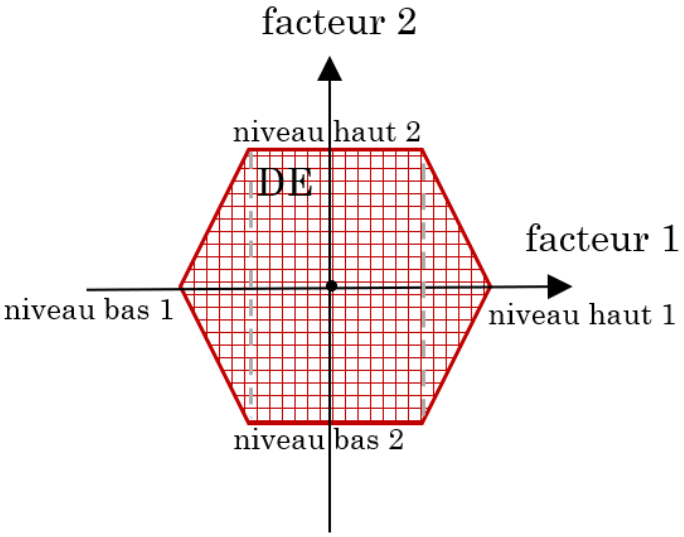


Figure 128 : Représentation du domaine expérimental dans le cas d'un réseau de Doehlert à 2 facteurs.

Dans un plan d'expériences de Doehlert, le nombre de niveaux n'est donc pas le même pour chaque facteur. On voit graphiquement, que pour deux facteurs, l'un des facteurs est étudié sur 5 niveaux alors que le deuxième n'est étudié que sur 3 niveaux. L'expérimentateur peut donc choisir comment il assigne ces niveaux, sachant qu'attribuer le plus de niveaux au facteur qui a le plus d'influence sur la réponse étudiée permet d'obtenir le plus d'informations[226]. Dans le cas d'un plan d'expériences à 3 facteurs, comme dans ce travail, il faut choisir 5, 7 et 3 niveaux. Les plans d'expériences de Doehlert sont définis à partir des variables codées C_i de la matrice

d'expériences. La relation entre valeurs codées et réelles est donnée par :

$$C_i = \left\{\frac{X_i - X_i^0}{\Delta X_i}\right\}\alpha$$

avec C_i la valeur codée pour le niveau du facteur i, X_i sa valeur réelle dans une expérience, X_i^0 la valeur réelle au centre du domaine expérimental, ΔX_i est le pas de variation des valeurs réelles et α la valeur codée limite pour chaque facteur. Le nombre d'expériences requis N est donné par $N = k^2 + k + C_0$ avec k le nombre de facteurs et C_0 le nombre de points au centre. Le point au centre est répété afin de valider le modèle par une analyse de la variance. En choisissant de réaliser le point au centre en triplicat, le nombre d'expériences d'un réseau de Doehlert à trois facteur s'élève à 15 expériences.

I.3.4. Analyse de la variance

Les expériences réalisées dans le cadre d'un PE constitué d'expériences réelles sont soumises à deux erreurs principales : l'erreur expérimentale et l'erreur de mesure. L'erreur expérimentale est l'erreur provenant de la conception et réalisation des expériences. Elle est évaluée en réalisant l'expérience représentant le centre du domaine expérimental en triplicat. L'erreur de mesure traduit la variabilité des réponses. Une fois toutes les réponses obtenues, des tests statistiques (ANOVA) permettent de valider les modèles de prédictions obtenus. La somme des carrés de la régression (SSR) et la somme résiduelle des carrés (SSr) explicitant la variance totale des données ont été utilisées par Royes-Mir *et coll.*[165] afin d'estimer la validité de leur modèles. Rapidement SSr a été décomposé en deux contributions : l'écart au modèle (SSlof) et l'erreur pure de la somme des carrés (SSpe). L'écart au modèle de la régression a été examiné pour tous les modèles obtenus à l'aide d'un F-test comparant le quotient SSlof/SSpe aux valeurs critiques tabulées pour les degrés de liberté indiqués. Puis la significativité de la régression a été évaluée en comparant le rapport SSR/SSr aux valeurs critiques de F-test tabulées et en extrayant les p-values correspondantes. Le modèle a été considéré significatif pour des p-value<0,05.

I.3.5.Cas des hydrogels photo-stimulables

Dans le cadre du cahier des charges de notre hydrogel, la réponse étudiée dans un premier temps a été la rigidité en compression, ou module d'Young (E). L'objectif initial du projet est d'obtenir deux gels tel que E ≈ 5 kPa pour l'un et 15 kPa < E < 25 kPa pour l'autre. Ces valeurs de modules correspondront à l'état rigide de ces gels, c'est-à-dire lorsque les azobenzènes sont complexés par les cyclodextrines.

Trois paramètres dont on suppose l'influence comme décrite ci-dessous seront définis comme facteurs :

- **Le pourcentage de polymère en masse** dans la formulation (%m) : il représente la fraction massique des composés du gel dans le solvant. Il a déjà été montré qu'augmenter la fraction de polymère en solution augmentait la rigidité de gel [227,228], on s'attend à obtenir des résultats similaires ici.
- **Le rapport tétrathiol/dithiol** (4SH/2SH) : il représente le rapport entre les fonctions mercapto provenant du POE-tétrathiol et celles venant du POE-dithiol. Le POE-tétrathiol possède plus de fonctions que le POE-dithiol par définition et ses branches sont plus courtes. Il aura donc tendance à former des gels possédant une plus grande densité de réticulation que le POE-dithiol pour un même nombre de fonctions mercapto apportées. On s'attend donc à ce que l'augmentation du rapport 4SH/2SH rende le gel plus rigide.
- **Le rapport AZO/β-CD** : il représente le rapport entre le nombre de moles d'azobenzène et celui de β-CD présents dans le gel. Nous avons montré que le 4F-AZO et la β-CD se complexent avec une stœchiométrie 1:1. Cependant, l'équilibre thermodynamique ainsi que l'accéssibilité de la cavité font que tous les AZOs ne seront pas complexés par toutes les CDs. L'ajout de l'un des deux composés en excès pourrait favoriser la complexation, créant plus de points de réticulation physique et donc un gel plus rigide.

La stœchiométrie entre les fonctions maléimides et mercapto est imposée comme une constante et est choisie afin d'obtenir des hydrogels avec les fonctions résiduelles désirées. Les calculs ont été faits en considérant stœchiométrique le rapport entre thiol et maléimides, si l'inverse n'est pas spécifié.

Etant assez sûrs que les facteurs et leur gamme de variation choisis sont influents sur la réponse que nous souhaitons étudier (le module d'Young), nous avons choisi d'établir un modèle prévisionnel permettant de modéliser les variations des réponses en fonction de ces trois facteurs. Pour cela, nous avons utilisé un réseau uniforme de Doehlert[225].

Le plan d'expériences est construit avec les facteurs ci-dessus et leurs niveaux sont choisis selon un réseau de Doehlert 3 facteurs. Au pourcentage massique de la formulation et au rapport entre tétrathiol et dithiol ont été attribués 7 et 5 niveaux respectivement car ce sont les paramètres qui doivent avoir une influence critique sur la rigidité du gel formé. Le facteur AZO/CD a donc contenu 3 niveaux. Les niveaux extrêmes et médians des facteurs sont dans un premier temps

définis arbitrairement (Tableau 24). Le plan d'expérimentation suivi est présenté dans le Tableau 25.

	Réticulant chimique Tétrathiol/dithiol	%m polymère	Réticulant physique AZO/β-CD
Centre	50/50	20	50/50
Pas de variation	50	10	10

Tableau 24 : Niveaux des facteurs déterminés par leur valeur au centre et leur pas de variation pour un réseau de Doehlert à trois facteurs.

Expérience	tétrathiol/dithiol	%m polymère	AZO/β-CD
1	100/0	20	50/50
2	0/100	20	50/50
3	75/25	30	50/50
4	25/75	10	50/50
5	75/25	10	50/50
6	25/75	30	50/50
7	75/25	23	60/40
8	25/75	17	40/60
9	75/25	17	40/60
10	50/50	26	40/60
11	25/75	23	60/40
12	50/50	14	60/40
13	50/50	20	50/50

Tableau 25 : Plan d'expériences suivant un réseau de Doehlert à trois facteurs.

Chaque ligne de cette matrice correspond à une expérience à réaliser. Dans le but d'estimer les coefficients du modèle quadratique postulé, il faudra que chacune des 13 expériences soit réalisée au moins une fois et qu'une valeur de réponse soit associée à chacune. L'une des 13 expériences doit être réalisée 3 fois, pour réaliser une ANOVA. De manière générale il s'agit du point central du plan d'expériences, ici la formulation 13.

I.3.6. Application : méthode de calcul

Le plan d'expériences choisi pour l'étude du système hydrogel photo-stimulable donne les conditions de chaque expérience à réaliser. Il est nécessaire de transformer ces conditions en quantité de matière à peser afin de pouvoir mélanger les différents composés dans les bonnes proportions. Les composés choisis pour la formation des gels sont de type polymère, leur masse molaire est mal définie. Pour s'affranchir de cette incertitude lors des pesées, nous avons utilisé,

pour déterminer les masses à peser, le nombre de fonctions par unité massique, soit par gramme, déterminé plus haut dans le chapitre. Il est possible d'écrire un système de 4 équations à 4 inconnues pour résoudre ce problème :

Soient les inconnues :

x la masse de β-CD maléimide

y la masse de terpolymère

z la masse de POE-tétrathiol

w la masse de POE-dithiol

Soient des constantes :

a le nombre de moles de groupes β-cyclodextrine par gramme de β-CD maléimide

b le nombre de moles de fonctions maléimides par gramme de β-CD maléimide

c le nombre de moles de fonctions maléimides par gramme de terpolymère

d le nombre de moles de groupes azobenzène par gramme de terpolymère

e le nombre de moles de fonction mercapto par gramme de POE-tétrathiol

f le nombre de moles de fonction mercapto par gramme de POE-dithiol

Soit m_{tot} la masse totale de gel à préparer

p le pourcentage de masse de polymère dans l'hydrogel

Alors : $\begin{cases} x + y + z + w = p * m_{tot} \\ \frac{dy}{ax} = \frac{AZO}{BCD} \\ bx + cy = ez + fw \\ \frac{ez}{fw} = \frac{4SH}{2SH} \end{cases}$

- Equation de conservation de la masse
- Définition du ratio des fonctions azo et CD
- Équimolairité des fonctions maléimide et thiols
- Définition du ratio des fonctions thiols entre 4SH et 2SH

$$\Leftrightarrow \begin{cases} x + y + z + w = p * m_{tot} \\ a\frac{AZO}{BCD}.x - dy = 0 \\ bx + cy - ez - fw = 0 \\ ez - f\frac{4SH}{2SH}.w = 0 \end{cases}$$

Ce système peut être écrit de façon matricielle sous la forme AX=B avec A la matrice associée au système et B la matrice des constantes.

$$\begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 & 1 \\ a\frac{AZO}{BCD} & -1 & 0 & 0 \\ b & c & -e & -f \\ 0 & 0 & 1 & -f\frac{4SH}{2SH} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} x \\ y \\ z \\ w \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} p * m_{tot} \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix}$$

Ce système peut être résolu par une inversion de matrice disponible dans Microsoft Excel. Les

solutions x, y, z et w sont le résultat de la multiplication matricielle de la matrice inverse A^{-1} et de la matrice B.

Cette méthode de calcul des masses par résolution d'un système à quatre équations est rapide, efficace et reproductible. Elle sera utilisée pour obtenir les masses à peser à partir des plans d'expériences tout au long de l'étude.

I.4. Premières synthèses d'hydrogels et optimisation du protocole de synthèse

Une procédure générale a été définie préalablement à la réalisation des gels photo-sensibles selon les plans d'expériences. Pour cela, des gels préliminaires sont réalisés et les paramètres influençant la synthèse sont étudiés et optimisés.

I.4.1. La réaction maléimide-thiol

La réaction entre thiol et maléimide est l'une des réactions de type addition de Michael les plus efficaces. Les forces motrices de cette addition sont l'effet attracteur des deux carbonyles du maléimide en configuration *cis* ainsi que l'abaissement de la tension de cycle[217]. Le mécanisme le plus souvent décrit est celui de l'addition de Michael nécessitant la formation de thiolates qui permettent l'amorçage du cycle catalytique (Figure 129a.). Ces thiolates peuvent être formés de deux façons : par ajout d'une base ou d'un nucléophile. Une base en quantité catalytique peut déprotoner une petite quantité de thiols (Figure 129b.) qui, devenus thiolates, amorcent le cycle catalytique. Dans le mécanisme d'addition nucléophile, l'agent nucléophile attaque d'abord le maléimide pour donner un intermédiaire zwitterionique qui déprotone par la suite une quantité de thiols. La suite du processus est la même que pour l'amorçage basique. Dans ce second mécanisme, un sous-produit de l'addition nucléophile est formé en faible quantité (Figure 129 c)).

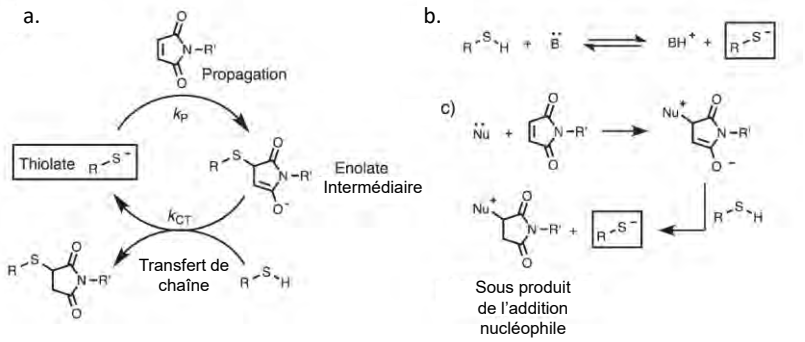


Figure 129 : a. Mécanisme de l'addition d'un thiol sur un maléimide *N*-substitué catalysée par un thiolate, b. Formation d'un thiolate par équilibre acide-base, c) Formation d'un thiolate par réaction nucléophile sur un maléimide. Schéma reproduit depuis Jansen et collaborateurs[229].

Jansen et collaborateurs ont remarqué plus tard que, dans un tampon PBS, la réaction maléimide-thiol entre un POE-tétramaléimide et un POE-dithiol pouvait se produire sans l'addition de base. Les auteurs suggèrent ainsi que, au pH du PBS, la formation de thiolate est déjà capable d'amorcer l'addition de Michael. Dans ces conditions, la réaction dépendrait donc du pKa du thiol[227].

I.4.2. Synthèse de gels préliminaires par réaction maléimide-thiol

La réaction de Michael faisant réagir thiols et maléimides a été largement utilisée pour synthétiser des hydrogels à base de POE. Phelps *et coll*. ont par exemple synthétisé plusieurs hydrogels à base de POE grâce à cette réaction. Les auteurs ont déterminé, en comparant différents groupes accepteurs de Michael (acrylate, vinyl-sulfone et maléimide), que la réaction entre maléimides et thiols permettait d'obtenir des gels adéquats pour des applications en biologie et biomatériaux. En effet, ils réticulent rapidement (1-5 min) et possèdent un réseau serré dont la rigidité est de l'ordre de celle de la MEC. Ils représentent donc de bons candidats pour des applications cliniques, notamment en tant qu'encapsulant et/ou hydrogels injectables[65].

Pour se rapprocher du système d'étude, quelques gels ont été préparés sans β-CD pour étudier les propriétés de gels composés de terpolymère et de thiols. Afin de se rapprocher des futurs gels, synthétisés selon les plans d'expériences, ainsi que des conditions de la littérature, les gels sans β-CD sont synthétisés à 10% en masse avec 100% de tétrathiol et un rapport maléimide:thiol calculé stœchiométrique, dans l'eau. Cette formulation a été réalisée en triplicat. Une solution de terpolymère et une solution de tétrathiol-POE sont préparées comme indiquées dans la partie expérimentale puis mélangées dans un moule afin de former trois gels identiques.

Le temps de prise de ces gels est d'environ 10 à 15 min ce qui n'est ni trop long ni trop court pour l'application visée. Les gels résultants ont été laissés gonfler dans l'eau et leur gonflement a été étudié au cours du temps. Ces gels sont transparents et homogènes (Figure 130).

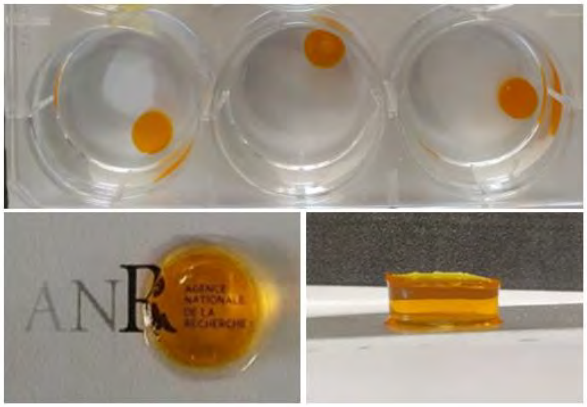


Figure 130 : Photographies des hydrogels préparés sans cyclodextrine pendant et après gonflement.

Après ces essais préliminaires, les hydrogels contenant les quatre briques sont formulés en accord avec le plan d'expériences choisi.

I.4.3. Synthèse de gels à base de β-CD-m-POE selon le premier plan d'expériences

La β-CD-maléimide synthétisée s'est avérée insoluble dans l'eau, à cause de l'hydrophobie apportée par les 5 groupements maléimides. La β-CD-m-POE, soluble dans l'eau, a donc été utilisée pour de premières synthèses d'hydrogels photo-stimulables. En amont de la quantification précise de toutes les fonctions intervenant dans ces synthèses, de premiers gels ont été synthétisés avec la β-CD-m-POE dans l'eau en suivant certaines formulations du premier plan d'expériences décrit dans le Tableau 25. Les fonctions sont alors estimées avec les données fournisseurs ainsi que les masses molaires des composés. La formation idéale des hydrogels est schématisée Figure 131. Elle implique la formation des interactions hôte/invité dans un premier temps, par mélange de β-CD-m-POE avec le terpolymère, puis la formation des liaisons chimiques par ajout de thiol. Expérimentalement, le terpolymère dont le 4F-AZO est sous forme *cis* et la β-CD maléimide sont pesés dans un même pilulier et mis en solution dans l'eau. Une solution de thiols est préparée en parallèle et les deux solutions sont versées simultanément dans un moule puis le gel est laissé à réticuler chimiquement soit à température ambiante, soit à 4°C.

Les formulations 1, 3, 5, 7, 8, 9, 10 et 13 sont synthétisées pour obtenir des gels entre 200 et 900 mg de matière selon le premier plan d'expériences (Tableau 26 et partie expérimentale), puis, une fois démoulées, sont mises à gonfler dans de l'eau déionisée avant d'être caractérisés. Les gels obtenus ont tous été transparents après gonflement et ont pu, pour la plupart, être mesurés en compression.

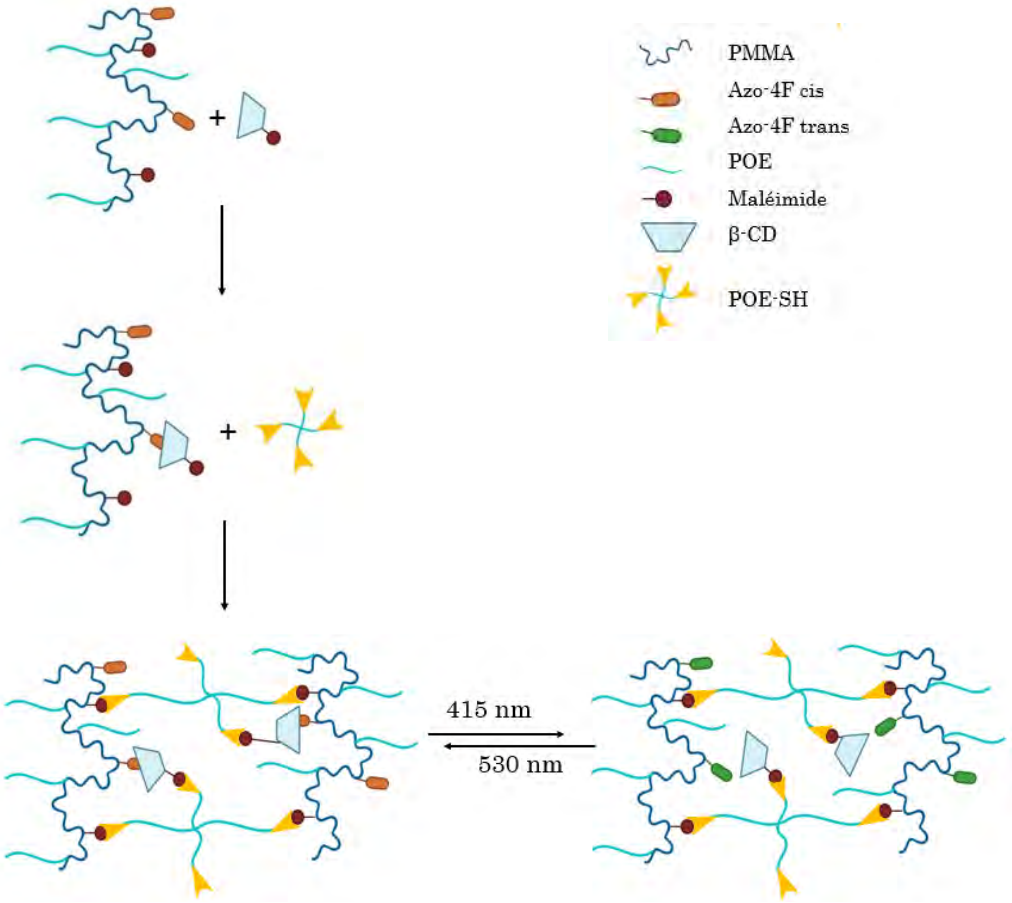


Figure 131 : Représentation schématique de la formation d'hydrogels chimiques et physiques et de leur mécanisme supposé de réponse à la lumière.

Au cours des synthèses réalisées, une observation s'est imposée : dans les proportions utilisées, la réaction maléimide-thiol est quasi-instantanée à température ambiante. De telles cinétiques de réticulation ont déjà été décrites dans la littérature[227]. Cela pose la question du bon mélangeage et de l'homogénéité des gels qui en résultent.

Formulation	$m_{cyclodextrine}$ (mg)	$m_{terpolymère}$ (mg)	m_{4SH} (mg)	m_{2SH} (mg)	m_{eau} (mg)
1	70,8	55,3	69,4	0	654,5
3	82,7	64,7	67,5	40,1	595,0
5	27,6	21,6	22,5	13,4	765,0
7	77,1	40,2	59,8	35,5	637,5
8	39,3	46,1	14,7	78,4	671,5
9	50,0	58,6	43,8	26,0	671,5
10	59,6	69,8	39,1	69,5	612,0
13	48,9	38,2	29,8	53,1	680,0

Tableau 26 : Masse théorique calculées pour des gels de 850 mg selon les paramètres du premier plan d'expériences.

Malgré un contrôle non optimal des fonctionnalités de chaque espèce et des premières difficultés rencontrées dans la formulation de gel concentré (30%) à cause de la quantité restreinte de solvant pour mettre les espèces en solution, ces synthèses ont permis de cibler plusieurs points à améliorer. Notamment, certains gels à faible concentration massique en polymère (formulations 5 et 8) ont été trop mous pour être correctement mesurés en compression. Un second plan d'expériences a donc été envisagé par la suite, pour corriger ce problème.

I.4.4. Optimisation des paramètres influençant la synthèse des gels

Le protocole utilisé pour ces synthèses d'hydrogels s'est avéré peu optimal : les gels se forment trop vite et le démoulage n'est pas toujours facile ; le gel adhère beaucoup au moule et se déchire régulièrement. Afin de répondre au mieux aux problématiques expérimentales, plusieurs paramètres ont été étudiés et optimisés, à savoir : la technique de moulage, la méthode de mélangeage, ainsi que les facteurs impactant la cinétique de la réaction maléimide-thiol.

I.4.4.1.Choix des moules et techniques de moulage/démoulage

Un premier moule a été utilisé dans ce travail pour permettre un démoulage facile des gels formulés. Il s'agit d'un tore composé de deux pièces démontables et il a été employé pour la synthèse du premier lot de gels (Figure 132a.). Cependant, le démoulage de gels mous, module d'Young inférieurs à 5 kPa, s'est avéré compliqué avec ce moule. En effet les gels ont tendance à adhérer à la surface du moule et son ouverture a pu conduire à la fracture des gels les moins résistants.

Pour cette raison, une seconde technique de moulage a été mise en place. Elle consiste à utiliser une seringue en polypropylène comme moule (Figure 132b.). Le démoulage est ainsi facilité par la présence du piston qui pousse le gel formé jusqu'à la sortie. Cette seconde méthode sera conservée comme méthode préférentielle pour le moulage des hydrogels.

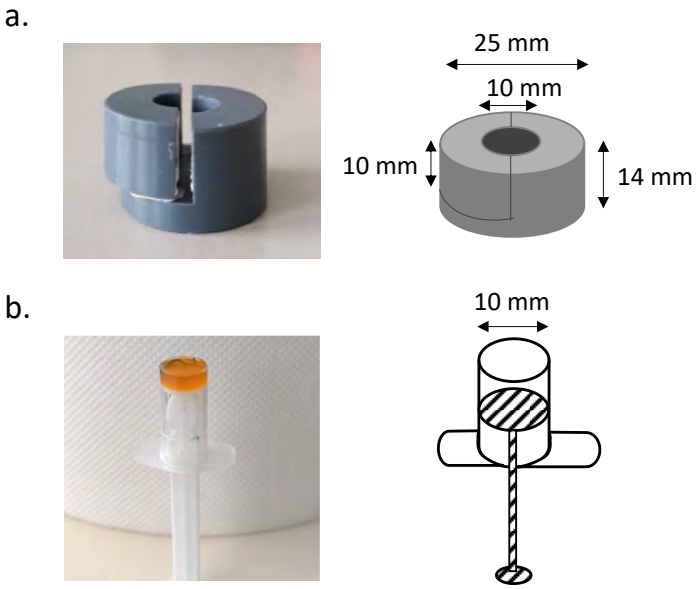


Figure 132 : Photographie et représentation schématique des deux types de moules utilisés. a. tore b. seringue retournée.

I.4.4.2.Techniques de mélangeage

Au cours des différentes synthèses, nous avons pu observer que la réaction maléimide-thiol était très rapide. Typiquement, les gels réticulent entre 5 s et 1 min. Il a donc fallu mettre en place une technique de mélangeage optimale afin d'obtenir un matériau homogène à l'issue de la synthèse.

Trois méthodes permettant de mélanger les deux solutions précurseurs sont étudiées : un simple pipetage en aller-retour avec une micropipette, un mélangeur en Y connecté à deux seringues, un mélangeur à vis placé en bout d'une double seringue (partie expérimentale). Les deux dernières méthodes ont été testées dans un premier temps avec un gel modèle composé d'un POE-tétrathiol de 5000 g.mol^{-1} et d'un POE-tétramaléimide à 20000 g.mol^{-1}. Pour vérifier l'homogénéité du mélange, un colorant, le rouge de cochenille soluble dans l'eau, est ajouté à la préparation intermédiaire de thiol. Une formulation où le rapport des fonctions SH:maléimide est 3:1 est coulée avec les deux systèmes de mélangeage puis une formulation avec SH:maléimide 1:1 est coulée avec le système de mélangeur à vis. Le système de mélangeur à vis s'est avéré extrêmement efficace dans l'obtention d'un bon mélangeage. Cependant, la réticulation des deux formulations testées est tellement rapide que le gel formé reste bloqué dans le mélangeur.

Le système en Y mélange les deux solutions intermédiaires sans faire réticuler le gel trop rapidement par rapport au mélangeur à vis. Cette méthode est donc choisie pour être testée sur

plusieurs formulations extraites du plan d'expériences.

Cinq formulations 1, 2, 4, 9, 13 sont synthétisées en utilisant la β-CD-m-POE par l'intermédiaire du mélangeur Y. On relève des pertes de matières au cours de l'expérience dans : les eppendorfs, les seringues, le mélangeur Y et les tubulures. Les gels sont formulés pour une masse totale de 480 mg maximum. Les résultats de ces pertes sont rassemblés dans le Tableau 27 ci-dessous.

Gel	Solution	eppendorf perte (g)	seringue perte (g)	connecteur+tubulure perte (g)
1	β-CD/terpo	0,0118	0,0485	0,012
	Thiols	0,0047	0,0156	
2	β-CD/terpo	0,0122	0,0531	0,015
	Thiols	0,0118	0,029	
4	β-CD/terpo	0,0101	0,0437	0,013
	Thiols	0,0111	0,0236	
9	β-CD/terpo	0,0119	0,0493	0,0224
	Thiols	0,0043	0,0171	
13	β-CD/terpo	0,0089	0,049	0,0187
	Thiols	0,005	0,016	

Tableau 27 : Tableau indiquant les pertes de matière mesurées au cours de la formation de gels avec le mélangeur Y. Le terme « thiols » désigne le mélange dithiol/tétrathiol dans les proportions déterminées par le plan d'expériences.

Le système de mélangeur Y donne des gels homogènes, cependant, l'utilisation de seringues génère une perte massive et non contrôlable de matériaux : en moyenne, environ 100 mg de solutions préparées sont perdus dans le processus. Sur 480 mg cela représente 20% de la masse totale du gel. De plus, il n'est plus assuré que les proportions précisément calculées entre thiols et maléimides soient conservées. En fin de réaction, il n'est donc pas garanti que le gel formé ait les caractéristiques souhaitées. Cette méthode n'est finalement pas satisfaisante.

On remarque que les pertes de matière dans les eppendorfs sont minimes (3% environ), il est donc envisageable de simplement prélever les solutions intermédiaires et de les mélanger ensemble dans le moule. Le pipetage à l'aide d'une micropipette s'est avéré être la méthode la plus viable. Elle nécessite quelques dizaines de secondes pour obtenir un bon mélange. Cela implique que le temps de gélification du gel soit plus grand que le temps de l'étape de mélange. Les formulations qui réticulent plus rapidement ne sont donc pas adaptées à cette étude. Nous nous sommes donc intéressés aux paramètres influençant la cinétique de la réaction afin de déterminer s'il était possible de ralentir la cinétique de prise des gels.

I.4.4.3.Influence de la température

Des formulations ont été réalisées à température ambiante (30 °C), et à froid (dans un bain de glace). Lors des expériences à froid, les pipettes et les moules sont placés au moins 30 minutes au congélateur avant l'expérience tandis que les solutions intermédiaires de thiols et de mélange β-CD/terpolymère sont placées dans un bain de glace 10 min avant l'expérience.
En fonction des formulations, les temps de prise des gels vont de 10 à 120 sec environ, qu'ils soient synthétisés à 30 °C ou à 0 °C. Travailler à froid ne semble pas être la manière la plus efficace de ralentir la vitesse de réticulation.

I.4.4.4.Influence du pH

La rapidité de la réaction entre thiol et maléimide a déjà été décrite dans la littérature. Jansen et ses collaborateurs ont notamment étudié les moyens de réduire la vitesse de cette réaction lors de la synthèse d'hydrogels à base de POE en solution aqueuse[227]. Ils remarquent notamment que passer de pH 7,2 à pH 5,8 diminue la cinétique de la réaction d'un facteur 6. Certaines formulations d'hydrogel gélifient en moins de 5 sec et on voudrait augmenter ce temps à environ 1 min. Une solution de HCl diluée à pH = 4,2 a été préparée. La formulation 4 du premier plan d'expériences, composée de 10 %m de polymère, est préparée dans l'eau ultra-pure en diluant les thiols dans la solution d'HCl (au total 28 %m de solution à pH4). Cette formulation réticule en 20 sec environ. Il semble donc qu'acidifier le milieu ait bien tendance à ralentir la cinétique de l'addition de Michael.

I.4.4.5.Influence d'un peptide comme agent ralentisseur de réaction maléimide-thiol

Dans la même étude, Jansen et ses collaborateurs se sont intéressés à l'influence que pouvaient avoir différents acides aminés à proximité de la fonction thiol sur le ralentissement de la réaction maléimide-thiol. En effet, Lutolf *et coll.* ont montré en 2001 que l'introduction d'acides aminés chargés à proximité d'une cystéine permettait de modifier le pKa du thiol par interactions électrostatiques. Les auteurs remarquèrent que la présence de charges positives à proximité du thiol avait tendance à abaisser son pKa et à accélérer la réaction thiol-ène associée tandis que la présence de charges négatives de l'acide aspartique, à l'inverse, augmentait le pKa du thiol, ralentissant la cinétique de réaction[230]. Jansen *et coll.* ont ainsi conçu un oligopeptide portant une cyctéine à chaque extrémité, capable de ralentir radicalement (d'un facteur 90) la réaction maléimide-thiol dans le PBS au pH de 5,8. Nous avons décidé d'évaluer l'efficacité de ce peptide (séquence CREIPESLRAGERC), sur la vitesse de réaction, dans notre système.

Plusieurs formulations ont été préparées en remplaçant le POE-dithiol par le peptide-dithiol, en équivalent de fonction. Nous avons comparé les temps de prise des gels préparés avec le POE-dithiol et ceux préparés avec le peptide-dithiol.

Formulation*	4SH/2SH	%m polymère	%m peptide	Temps de prise avec POE (s)	Temps de prise avec peptide (s)
2	100% dithiol	20	2,2	25	1440
4	75/25	10	1,9	35	+∞
5	25/75	10	1,3	24	84
12	50/50	18	2,6	20	1920

*Inspirées du premier plan d'expériences

Tableau 28 : Comparaison des temps de prise des gels lors de leurs synthèses en utilisant, soit les thiols pégylés, soit le peptide de séquence CREIPESLRAGERC porteur de cystéines à chaque extrémité.

On constate effectivement un ralentissement important dans les quatre cas de réticulations avec le peptide. L'utilisation de ce peptide est donc une méthode efficace pour diminuer la vitesse de prise des gels. On remarquera que le peptide ayant une masse molaire plus faible que le POE-dithiol, les gels à base de peptide possèdent un pourcentage massique de polymère inférieur à celui renseigné dans le Tableau 28.

Or il semble que ce paramètre joue également sur le temps de gélification. Par exemple, la formulation 4 qui doit être composée de 10 %m de polymère n'est plus qu'à 8 %m. Cette formulation n'a pas pris la forme d'un gel. Ceci peut être dû, soit au fait qu'à 8 %m de polymère on se place sous la limite de percolation du gel, soit au fait qu'un excès de peptide ralentisse tellement la réaction qu'elle n'a pas pu être observée. Il faudra donc être vigilant, dans l'hypothèse d'un PE avec du peptide, que toutes les formulations forment bien des gels.

I.5. Synthèse de gels optimisés à base de β-CD-m-POE selon le deuxième plan d'expériences

Un second lot de gel a été préparé à partir d'un deuxième plan d'expériences dont la gamme de pourcentage massique a été modifiée. Au lieu de varier entre 10% et 30% massique, la fraction de polymère des gels varie maintenant entre 16%m et 30%m (Tableau 29) afin de ne plus générer de gels trop mous pour être mesurés en compression. Cette fois, toutes les fonctionnalités des composés intervenant dans la synthèse de gel ont été déterminées par RMN ^{1}H et fixées comme constantes. Celle de la β-CD-m-POE avait notamment été calculée à $2{,}8.10^{-5}$mol par gramme de produit en RMN ^{1}H à cette étape, ce qui correspond à une faible fonctionnalité (0,26 maléimide par cyclodextrine).

Niveau	tétrathiol/dithiol	%m polymère	AZO/β-CD
1	0/100	16	40/60
2	25/75	18	50/50
3	50/50	21	60/40
4	75/25	23	
5	100/0	25	
6		28	
7		30	

Tableau 29 : Niveaux des facteurs pour un deuxième réseau de Doehlert à trois facteurs.

Un lot de six gels a été synthétisé à partir de ce plan d'expériences et du système de mélangeage en Y. Il s'agit du même lot que celui synthétisé pour estimer les pertes de ce mélangeur.
Les gels de formulation 1, 2, 4, 9, 12, 13 appelés respectivement 1.2, 2.2, 4.2, 9.2, 12.2, 13.2 sont synthétisés selon le deuxième plan d'expériences pour une masse totale de 500 mg, comme décrit en partie expérimentale, avant d'être lavés et caractérisés. Les six gels synthétisés ont pu être mesurés en compression sans dégradation. L'objectif du deuxième plan d'expériences a donc été rempli. Le mélangeur en Y entraînant des pertes importantes de matière, on choisira cependant de ne pas continuer le plan d'expériences avec ce système.

I.6. Autres synthèses d'hydrogels

I.6.1. Synthèse de gels par une méthode de cosolvant

Deux gels à base de β-CD-m et β-CD-2m ont été formulés en présence de DMSO, car il s'agit d'un bon solvant pour les cyclodextrines fonctionnalisées maléimides. L'objectif de cette méthode est de solubiliser la β-CD fonctionnelle dans le DMSO en amont de son mélange avec le terpolymère. Le DMSO étant miscible avec l'eau, il pourrait permettre de solubiliser la β-CD-m en présence d'eau ou bien favoriser la rencontre entre le 4F-AZO plutôt hydrophobe et la β-CD-2m, formant plus facilement le complexe hôte/invité. Pour ce faire, la β-CD est solubilisée dans du DMSO lors d'une première étape, avant d'être mélangée à une solution de terpolymère dans des quantités respectant la formulation 5 du premier plan d'expériences. Le DMSO est ensuite éliminé du gel par lavages.
Ainsi, β-CD-m a été solubilisée dans du DMSO avant d'être mélangée au terpolymère en solution dans l'eau. Le rapport en masse 1,5:10 DMSO:eau est utilisé, mais le mélange n'est pas transparent. Le gel obtenu selon la formulation 5 du plan d'expériences après ajout de thiols réticule très vite, pendant le mélange, et reste opaque (Figure 133a.). Il a été lavé dans de l'eau afin d'éliminer le DMSO. La même méthode a ensuite été appliquée pour former un gel à base

de β-CD-2m (5.3_{DMSO}) transparent après les lavages (Figure 133b.).

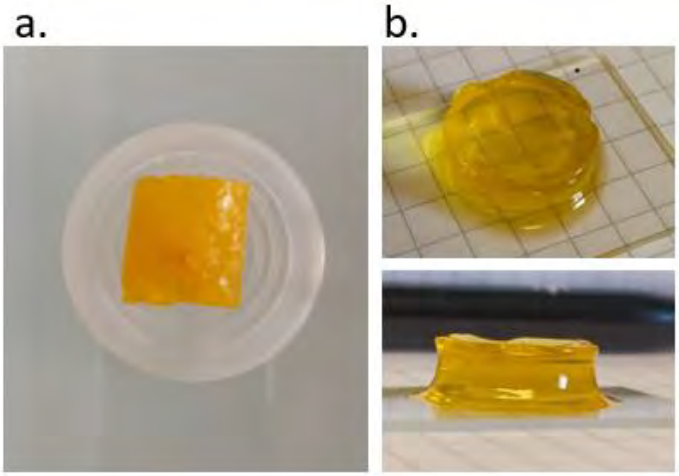


Figure 133 : Photographies de gels a. à base de β-CD-m non soluble dans l'eau après gonflement et b. à base de β-CD-2m soluble dans l'eau, en présence de DMSO lors de la synthèse.

La méthode de cosolvant ne permet pas d'obtenir un gel homogène à partir de la β-CD-m mais cela a été possible en utilisant la β-CD-2m soluble dans l'eau. La β-CD-2m sera donc utilisée également pour la synthèse de gel sans DMSO, même si l'étape de lavage rallonge le protocole de synthèse.

I.6.2. Synthèse de gels à base de β-CD-2m dans l'eau

La β-CD-2m n'a pas la fonctionnalité en maléimides désirée, elle ne peut pas participer à la formation du réseau chimique. En revanche, elle peut y être incorporée car elle porte un maléimide, et a l'avantage d'être soluble dans l'eau. Trois gels ont donc été formulés avec cette molécule dans l'eau afin de pouvoir les étudier en parallèle des autres. Les gels 5.3, 13.3 et $13.3_{PEPTIDE}$ ont été synthétisés, comme décrit dans la partie expérimentale, avec la β-CD-2m soluble dans l'eau.

Une fois ces gels synthétisés, ils ont été caractérisés par différentes méthodes classiquement utilisées pour étudier les propriétés des hydrogels. Les objectifs de la partie suivante ont donc été de déterminer et comparer les propriétés mécaniques des différents gels formés, ainsi que l'influence de la formulation sur leurs propriétés de gonflement et leur organisation microscopique. Enfin il a fallu déterminer si les interactions photo-stimulables hôte/invité permettaient de stimuler ces gels à l'aide de la lumière.

II. Caractérisation des hydrogels photo-stimulables

Les hydrogels sont, sans équivoque, d'excellents candidats pour l'étude du vivant. Cela leur

impose d'être compatibles avec les cellules, c'est-à-dire non toxiques et de posséder des propriétés mécaniques proches de celles de la MEC. Il existe dans le corps de nombreuses cellules différentes et elles ne sont pas toutes sensibles et fonctionnelles à la même gamme de rigidité. La Figure 134 donne les ordres de grandeurs des modules des principaux tissus biologiques humains. La caractérisation des propriétés mécaniques de matériaux voués à être utilisés comme matrice extra-cellulaire de synthèse pour la culture cellulaire a donc toute son importance.

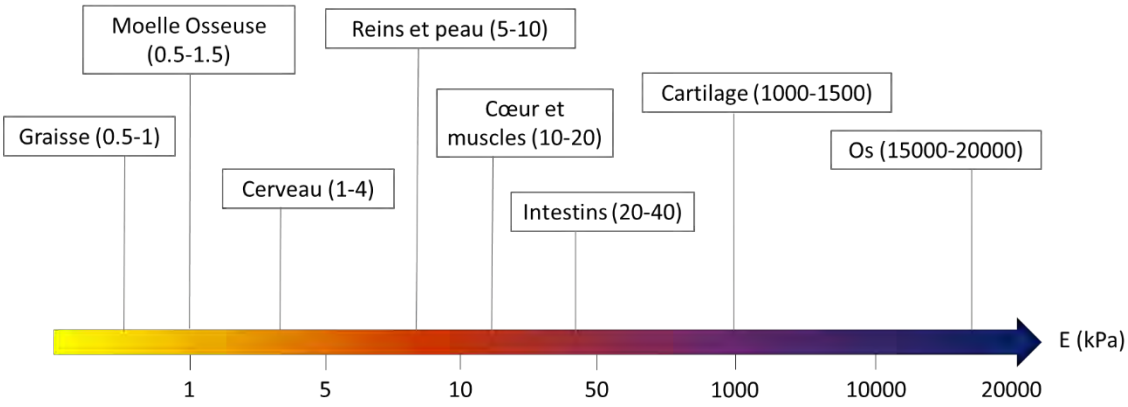


Figure 134 : Frise classant quelques tissus biologiques humains par ordre de rigidité.

Cette partie sur la caractérisation des hydrogels détaille l'étude des propriétés de gonflement, structurales, photo-stimulables et mécaniques des hydrogels macromoléculaires synthétisés.
Dans l'optique d'une application comme porte-échantillon pour la microscopie, les propriétés de gonflement des gels doivent être connues. Le moule du porte échantillon doit être conçu en fonction de ce paramètre important. Le gonflement d'un matériau donne également des informations sur les propriétés intrinsèques des gels, notamment, il est dépendant de la taille de maille du gel à l'équilibre qui peut être reliée au taux de réticulation.

II.1.Taux de gonflement des hydrogels macromoléculaires

L'étude du taux de gonflement est d'une grande importance, en général, dans la caractérisation d'hydrogels et ici, pour l'observation d'échantillons vivants en microscopie. En effet, il permet de décrire et d'expliquer certaines propriétés des hydrogels comme leur rigidité, leur élasticité, ou encore comme leurs propriétés de transport et relargage de molécules d'intérêt biologique. Par exemple, il a été montré que les gels gonflés sont plus fragiles que non gonflés car leurs mailles sont tendues et plus proches de la rupture qu'à l'état non gonflé (Figure 135)[228].

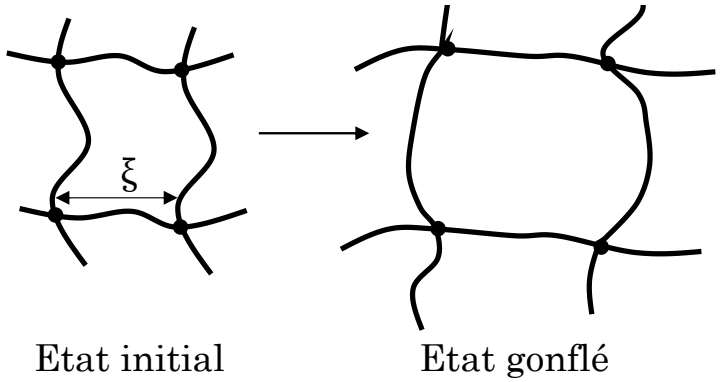


Figure 135 : Schéma d'une maille d'hydrogel avant et après gonflement et définition du paramètre de maille ξ.

D'après Peppas et ses collaborateurs[235], la structure d'un hydrogel peut être définie par trois paramètres importants : la fraction de polymère à l'état gonflé ($\upsilon_{2,s}$), la masse molaire moyenne d'une chaîne polymère reliant deux points de réticulation voisins ($\overline{M_c}$) et la longueur de corrélation, ou taille de la maille (ξ). $\upsilon_{2,s}$ est défini comme le rapport entre le volume de polymère (V_p) sur le volume du gel gonflé (V_{gel}). Le taux de gonflement (Q) a pu être défini comme l'inverse de $\upsilon_{2,s}$ tel que :

$$\upsilon_{2,s} = Vp / V_{gel} = 1 / Q$$

Théoriquement, $\overline{M_c}$ peut être reliée au degré de réticulation (X) et à la masse molaire de l'unité de répétition du polymère (M_0) telle que :

$$\overline{M_c} = M_0 / 2X$$

Cependant, elle est plus précisément déterminée par des expériences de gonflement[236]. Le taux de gonflement d'un hydrogel est donc lié à la distance moyenne entre les points de réticulation. Lorsqu'un gel est mis à gonfler, il est soumis à deux forces opposées : la force de thermodynamique de mélange, liée au paramètre d'interaction polymère-solvant (χ_1) et la force de rétractation élastique. A l'équilibre, ces deux forces sont égales. C'est ce que décrit la théorie de Flory-Rehner. Une équation de Flory-Rehner modifiée a été proposée par Peppas *et coll.* pour décrire des hydrogels préparés en présence d'eau[237] :

$$\frac{1}{\overline{M}_c} = \frac{2}{\overline{M}_n} - \frac{\frac{\bar{\upsilon}}{V_1}\left[\ln\left(1-\upsilon_{2,s}\right) + \upsilon_{2,s} + \chi_1 \upsilon_{2,s}^2\right]}{\upsilon_{2,r}\left[\left(\frac{\upsilon_{2,s}}{\upsilon_{2,r}}\right)^{\frac{1}{3}} - \left(\frac{\upsilon_{2,s}}{2\upsilon_{2,r}}\right)\right]}$$

avec $\overline{M}_n$ la masse molaire des chaînes polymères préparées dans les mêmes conditions mais sans agent de réticulation, $\bar{\upsilon}$ le volume spécifique du polymère, V_1 le volume molaire de l'eau et $\upsilon_{2,r}$ la fraction volumique de polymère à l'état relaxé, c'est-à-dire immédiatement après

réticulation mais avant le gonflement. Les propriétés élastiques de hydrogels peuvent également être utilisées pour déterminer leur structure en utilisant la théorie « rubber-elasticity ». Cette théorie s'écrit comme suit pour un hydrogel préparé en présence de solvant et soumis à une contrainte τ lors d'un test de traction[237] :

$$\tau = \frac{\rho RT}{\bar{M}_c}\left(1 - \frac{2\bar{M}_c}{\bar{M}_n}\right)\left(a - \frac{1}{a^2}\right)\left(\frac{\upsilon_{2,s}}{\upsilon_{2,r}}\right)^{1/3}$$

avec ρ la densité du polymère, R la constante des gaz parfaits, T la température absolue et a le ratio d'élongation des chaînes. La taille des pores ξ utilisée pour distinguer les gels macro, micro et nanoporeux, peut ainsi être calculée par la relation :

$$\xi = a(\bar{r}_0{}^2)^{1/2}$$

avec $(\bar{r}_0{}^2)^{1/2}$ la moyenne quadratique, non perturbée, de la distance entre deux bouts de chaine polymère reliant deux points de réticulation voisins. Dans le cas d'un gel gonflé de manière isotropique, on peut écrire a tel que :

$$a = \upsilon_{2,s}{}^{-1/3}$$

Ainsi la théorie de Flory-Rehner décrit le fait qu'en contrôlant les paramètres macromoléculaires d'hydrogels, il est possible de contrôler la structure de ces hydrogels et donc leurs propriétés mécaniques, de diffusion et leur caractère stimulable.

La théorie de Flory-Rehner décrit le gel comme un réseau neutre réticulé par quatre fonctions et composé de chaînes polymères caractérisées par une distribution de Gauss étroite. Cette analyse est l'une des plus souvent utilisées dans le contexte de gonflement d'hydrogels. Zustiak et Leach l'utilisèrent par exemple dans le cas d'hydrogels à base de POE pour déterminer la taille de maille de ces gels, formée par la réaction entre un POE vinylique tétrafonctionnel et différents agents réticulant difonctionnels[238]. Ils étudièrent ainsi l'influence de la masse molaire du POE, de la nature de l'agent réticulant et la densité du polymère sur ξ sur la taille de maille. Cette théorie permet d'extraire des informations intéressantes depuis la synthèse de gels supposés idéaux, cependant, elle possède certaines limites[239]. Dans la réalité, les polymères sont imparfaits, ils ne possèdent pas une masse molaire fixe, ce qui entraîne la formation d'un réseau inhomogène en ce qui concerne la taille de maille lors de la réticulation. D'autres écarts au modèle peuvent survenir comme la formation de boucles ou la présence de bouts de chaine non réticulés. Le modèle considère également que la longueur des chaînes complètement étirées est bien plus grande que la distance entre deux points de réticulation voisins. Cette hypothèse entraîne des écarts importants entre le modèle et des cas de gels à taux de gonflement élevés ou

à des systèmes composés de courtes chaînes. Enfin la complexité de certains polymères ainsi que l'encombrement de groupes pendants n'ont pas été intégrés à ce modèle. Ces limites ont contribué au fait que nous n'ayons pas essayé de prédire ni d'analyser les propriétés des hydrogels synthétisés dans ce travail avec la théorie de Flory-Rehner. En effet, la complexité du terpolymère utilisé (distribution des masses molaires, présence de groupes pendants statistiques et taux de gonflement élevés) n'aurait certainement pas permis d'obtenir une modélisation correcte des expériences.

Cependant, le taux de gonflement reste un paramètre important dans notre étude car il témoigne de la capacité des hydrogels à retenir du milieu. Ceci est en particulier nécessaire pour la culture cellulaire[240]. Trois formulations contenant de la β-CD, « F1 », « F2 » et « F3 » et une n'en contenant pas « sans β-CD » ont donc été préparées et leur taux de gonflement relevés au cours du temps tel que t_0 corresponde au temps du démoulage. Les formulations F1 et F2 ont été synthétisées avec la β-CD-m-POE et la formulation F3 avec la β-CD-2m, comme décrit en partie expérimentale. Notamment, la formulation F1 contient du dithiol tel que le rapport tétrathiol/dithiol soit de 75/25 alors que les trois autres formulations ne contiennent que du tétrathiol.

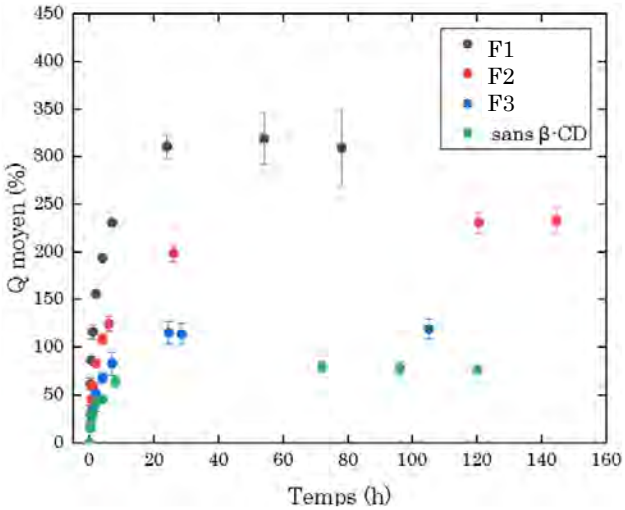


Figure 136 : Gonflement de trois formulations de gel contenant de la β-CD et d'une n'en contenant pas. Les barres d'erreurs représentent l'intervalle de confiance à 95% des mesures avec n=2 pour F1 et n=3 pour les autres formulations.

La Figure 136 montre le gonflement au cours du temps de gels contenant différentes cyclodextrines-maléimides et de gel n'en contenant pas. En comparant les valeurs de gonflement des gels avec et sans β-CD, on constate que la formulation influence beaucoup la valeur du plateau, c'est-à-dire le gonflement maximum que peut atteindre le gel. Cependant il semble qu'elle joue peu sur le temps nécessaire pour atteindre ce plateau, en effet, quelle que

soit la formulation, ce temps est d'environ 30h. Arslan *et coll.* ont étudié l'influence de la longueur des chaînes POE et du taux de réticulation sur leurs propriétés de gonflement de gels. Ils ont montré que l'augmentation du taux de réticulation diminuait la capacité de gonflement en eau des gels alors que l'augmentation de la longueur des chaines POE l'augmentait[241]. Dans notre cas, la longueur des chaines POE ne varie que par la variation du rapport tétrathiol/dithiol. Le taux de réticulation est également influencé par ce rapport. Nos expériences vont dans le sens des observations des auteurs car le gel F1, contenant du dithiol, atteint un taux de gonflement à l'équilibre plus important que les autres formulations qui ne contiennent que du tétrathiol. La présence de cyclodextrine et la nature de celle-ci semble également jouer un rôle sur les capacités de gonflement des hydrogels. Il semblerait que l'utilisation de β-CD-m-POE permette d'obtenir des gels capables d'atteindre des gonflements plus importants qu'avec la β-CD-2m.

Il est donc possible de contrôler les propriétés de gonflement des hydrogels par leur formulation. Ceci est un avantage notable pour ce qui est des applications d'hydrogels injectables ou pour la délivrance de molécules d'intérêt biologique.

II.2. Caractérisation de la microstructure des hydrogels pas microscopie électronique à balayage (MEB)

La microscopie électronique à balayage est une technique d'imagerie qui permet d'obtenir des images de la surface d'échantillons. Elle est souvent utilisée pour caractériser la structure d'hydrogels[168,242] et déterminer leurs tailles de pores. Ici, quatre échantillons de gels, issus du deuxième plan d'expériences, ont été observés en cryo-MEB haute pression. Des gels rigide (13.2, ~17 kPa) et mou (4.2, ~5 kPa) ont été sélectionnés pour étudier la relation entre la taille des pores et la rigidité. Deux morceaux de gel 12.2 (~8 kPa) irradiés soit à 415 nm soit à 530 nm seront imagés pour voir l'influence de la lumière sur la taille des pores.

Sur les images de la Figure 137, on voit la présence de structures alvéolaires caractéristiques des pores qui composent les hydrogels. Dans une étude similaire, Lee *et coll.* ont synthétisés des hydrogels de polyacrylamide à rigidité photo-contrôlable grâce à l'incorporation d'azobenzènes comme agents de réticulation chimique du gel[242]. Ils analysèrent en MEB la structure de leurs hydrogels avant et après irradiation UV et dans le bleu. Ils observèrent des changements structuraux au niveau des mailles des hydrogels suite aux isomérisations, témoignant d'une réorganisation induite par les changements de configuration des azobenzènes. On pourrait donc s'attendre ici à observer ce genre de réorganisation en comparant les gels 12.2

trans et 12.2 *cis*, dans le cas où la lumière permettrait de complexer et décomplexer les 4F-AZOs et les β-CDs présentes dans la masse. On s'attend également à retrouver une relation reliant inversement la taille des pores à la rigidité du matériau en comparant les gels rigide 13.2 et mou 4.2.

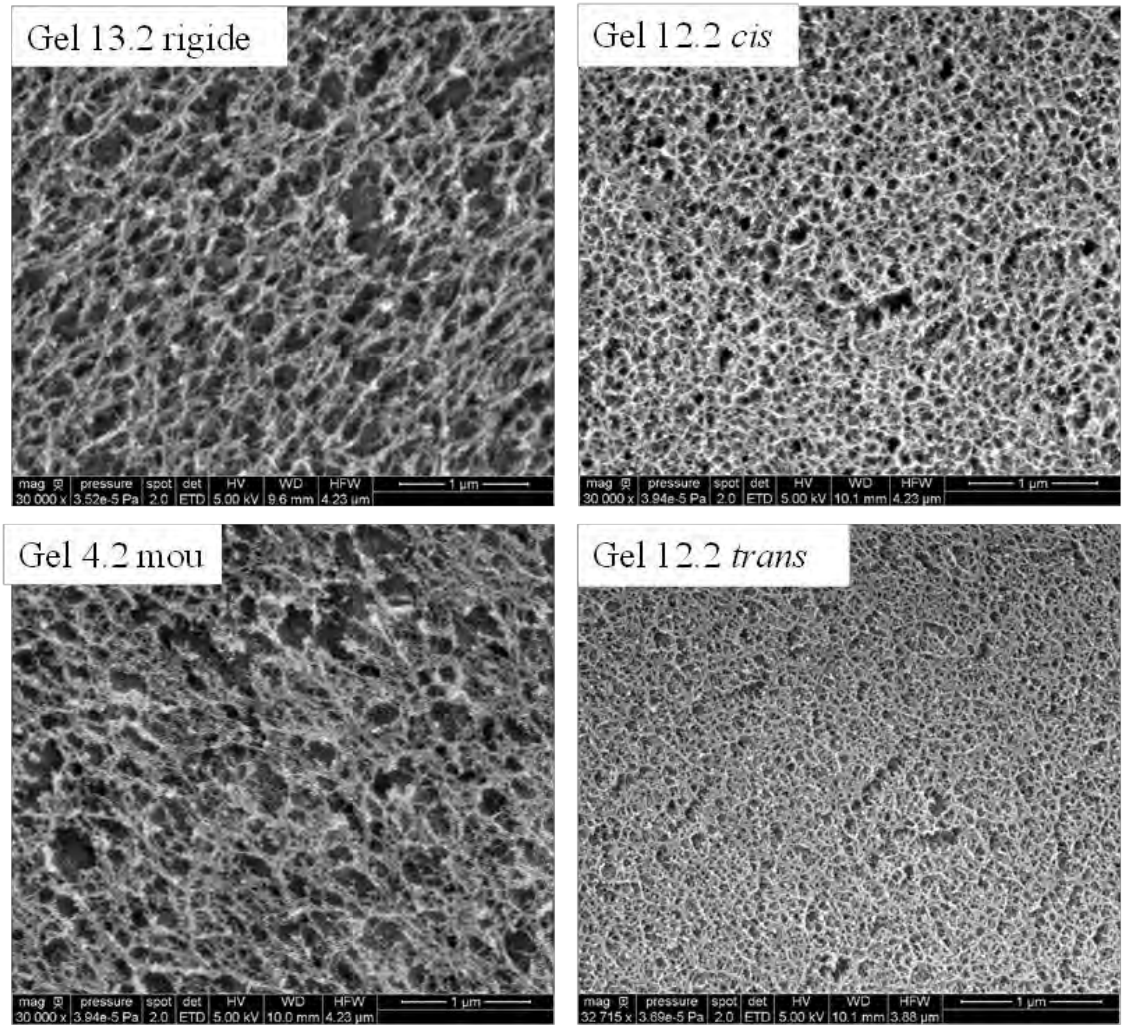


Figure 137 : Images de cryo-MEB haute pression de 4 échantillons de gels, un rigide (13.2, ~17 kPa), un mou (5.2, ~5 kPa) et deux intermédiaires (12.2, ~8 kPa) sous forme *cis* et l'autre sous forme *trans*. Echelle : 1µm.

La taille des pores obtenue par l'analyse des images obtenues en cryo-MEB est de l'ordre de dizaines de nanomètres. Il s'agit de pores bien plus petits que ceux obtenus par Lee *et al.* par exemple, dont les gels ont des pores d'environ 5 à 20 µm. Cependant, la méthode d'analyse n'est pas identique, ni les formulations. Afin de comparer les images obtenues entre elles, un traitement d'image à l'aide du logiciel Image J est réalisé. Il permet d'avoir une idée de la distribution des tailles de pores de ces gels.

Gel	Diamètre moyen des pores (nm)
Rigide	69 ± 2
Mou	69 ± 2
Cis	64 ± 1
Trans	45 ± 1

Tableau 30 : Tailles des pores de quatre gels, déterminées par cryo-MEB. Les incertitudes représentent l'erreur standard à la moyenne.

L'analyse statistique des données a été effectuée par analyse des variances unidirectionnelle (ANOVA) suivi d'un post test de Tukey pour comparer les échantillons deux à deux. Ces tests ont révélé que les écarts de taille des pores entre les gels rigide, mou et *cis* ne sont pas significatif. Par contre le gel *trans* a des pores significativement plus petits que ceux des trois autres échantillons, dont le gel *cis*. Cela va à l'encontre de ce à quoi on s'attendrait en considérant que la forme *cis* de l'azobenzène se lie à la β-CD. En effet, le complexe supramoléculaire devrait ajouter des points de réticulation physique et favoriser des rapprochements entre les chaînes. A cette étape du travail, nous avons émis cinq hypothèses pour expliquer cette observation :

- la lumière n'entraîne peut être pas l'isomérisation *cis*→*trans* au sein du gel
- le gel n'était peut-être pas homogène et la différence entre *cis* et *trans* pourrait être due au morceau de gel choisi
- dans le système gel, la forme *trans* de l'azobenzène se complexe mieux à la β -CD
- le complexe ne se forme pas dans les conditions expérimentales choisies
- l'étape de décomplexation n'engendre pas de déformation notable du réseau.

Les étapes suivantes du travail ont consisté à garder en tête ces hypothèses et à les évaluer de différentes façons. La première étape a été de déterminer si la lumière pouvait bien être responsable de l'isomérisation des 4F-AZOs contenus au sein des hydrogels.

II.3.Photo-stimulation d'un hydrogel

Le caractère photo-sensible des hydrogels synthétisés a été étudié par spectroscopie UV-Visible. En effet, les azobenzènes introduits dans le gel ont la capacité de s'isomériser en fonction de la lumière envoyée sur le matériau. Pour cela un spectromètre équipé d'une sphère d'intégration a été utilisé afin de déterminer l'absorbance en réflexion d'une tranche du gel de formulation 5.3_{DMSO}. Prise entre deux lames de verre, la tranche est analysée entre 325 et 675 nm (Figure 138).

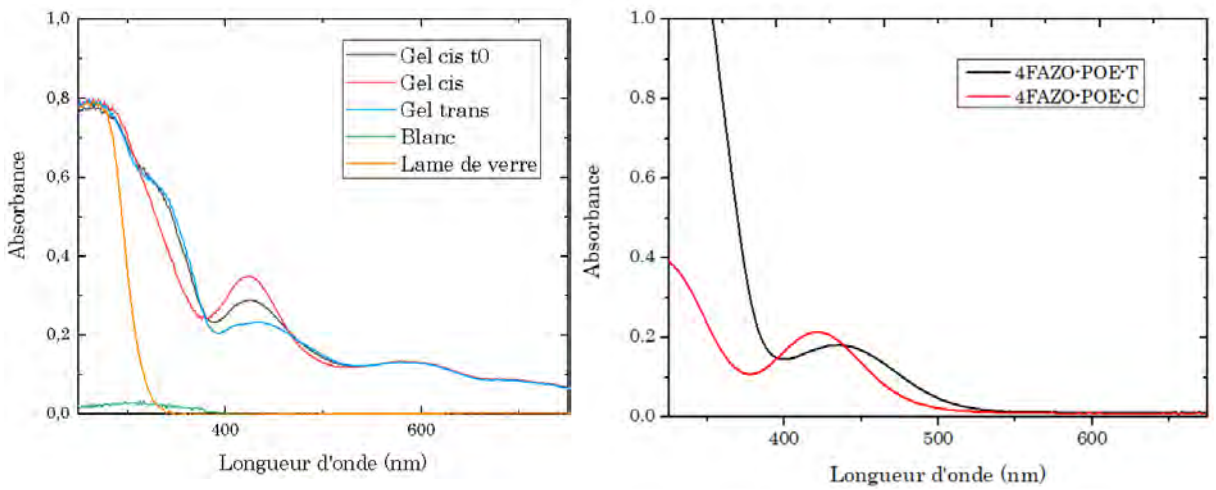


Figure 138 : Réponse de l'hydrogel 5.3_{DMSO} (gauche) à la stimulation lumineuse par les LEDs à 415 nm, pour donner le gel *trans*, et à 530 nm, pour donner le gel *cis,* observée par spectrométrie UV-Visible en réflexion. A titre de comparaison, réponse du 4F-AZO-POE libre en solution, aux mêmes stimulations lumineuses (droite).

Le verre commence à absorber la lumière vers 350 nm, il n'est donc pas possible d'observer en UV-Visible la bande $\pi \rightarrow \pi^*$ des AZOs contenus dans ce gel. Le spectre noir (Figure 138 gauche) représente le gel dont le 4F-AZO est partiellement *cis* et partiellement *trans* après gonflement. Une irradiation bleue (415 nm) pendant 10 min entraine une diminution de la bande d'absorbance du spectre vers 425 nm ainsi que son décalage vers les hautes longueurs d'onde alors qu'une irradiation verte (530 nm) pendant 20 min entraine son augmentation et un décalage vers les basses longueurs d'onde. Le gel ne semble pas totalement transparent, la ligne de base n'est pas à zéro ce qui signifie que le matériau diffuse la lumière. Cela peut être dû à la présence d'interface gel-air au sein de l'échantillon. En effet, placer le gel entre deux lames de verre entraine la présence de fissures dans le gel. Diffusion mise à part, la réponse à la lumière de cet hydrogel est sensiblement comparable à celle du 4F-AZO-POE libre en solution (Figure 138 droite) dans l'eau. On peut donc conclure que les 4F-AZOs présents au sein du gel subissent des isomérisations *cis* et *trans* lorsqu'ils sont soumis à des stimuli lumineux. Les gels synthétisés ont donc la faculté de voir leurs azobenzènes changer de configuration sous l'influence de lumière visible, ils sont photo-stimulables. L'étape suivante a été d'étudier les propriétés mécaniques des gels supramoléculaires et de déterminer l'influence de l'isomérisation des 4F-AZOs sur ces mêmes propriétés.

II.4.Détermination de la rigidité par test de compression

Il existe différentes méthodes pour caractériser les propriétés mécaniques des matériaux. Une méthode courante pour les polymères est la méthode de traction qui consiste à déformer un

échantillon pris entre deux mors de façon uniaxiale en traction (Figure 139a.). Cette technique a été utilisée pour déterminer le module d'Young ainsi que l'élongation à la rupture de gels à base de 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) –acrylic acid (AA), gonflés ou non[228]. La plupart des gels formés dans notre travail sont trop fragiles pour être placés entre des mords sans risque d'être détériorés. Cette technique n'a ainsi pas été utilisée dans ce travail. Pour les matériaux viscoélastiques, il est possible de mesurer les propriétés de gels soumis à un cisaillement appliqué par un rhéomètre (Figure 139b.). Cette technique est déjà amplement utilisée dans le cas d'hydrogels à rigidité modulable[231,232]. Cependant, elle est peu adaptée à l'étude des propriétés mécaniques d'hydrogels peu élastiques et risque de causer des cassures dans un échantillon trop rigide (E>10 kPa) ou fragile. Une troisième méthode connue pour caractériser les propriétés des hydrogels est la méthode de compression (Figure 139c.). Cette méthode a déjà été utilisée pour la caractérisation d'hydrogels d'agarose[233] et de POE[234]. Elle est facile à mettre en œuvre et permet notamment de caractériser des matériaux aux modules allant de quelques kPa à plusieurs centaines de kPa. Nous avons utilisé la technique de compression, rapide et facile à mettre en place pour des hydrogels dans notre gamme de rigidité.

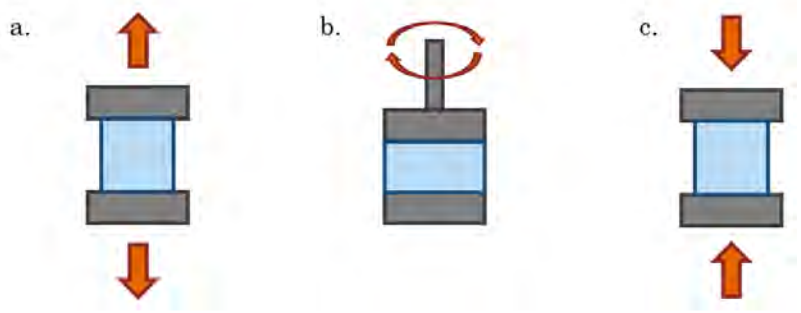


Figure 139 : Schémas de différentes méthodes d'étude des propriétés mécaniques d'hydrogels : a. traction, b. cisaillement en rhéologie, c. compression.

Les tests mécaniques en compression sont réalisés après démoulage de l'échantillon, lavage et mesure de ses dimensions (hauteur : h_0 et diamètre : d) au pied à coulisse. L'échantillon est ensuite placé pour la mesure et la force normale (F_0) mesurée par la cellule est relevée. Le programme de compression relève la force F appliquée par le module sur l'échantillon ainsi que le déplacement du plateau supérieur ΔL en fonction du temps. Les équations suivantes permettent de tracer la courbe contrainte-déformation avec ces données :

(1) soit ε la déformation de l'échantillon : $\varepsilon = \frac{|L-L_0|}{h_0} = \frac{\Delta L}{h_0}$

avec L : l'écart entre les plateaux à l'instant t (en mm),

L_0 : l'écart entre les deux plateaux au contact (en mm)

h_0 : la hauteur du gel (en mm)

(2) soit σ la contrainte appliquée sur l'échantillon : $\sigma = \frac{F}{S} = \frac{F}{\pi.(\frac{d}{2})^2}$

avec F : la force appliquée sur l'échantillon (en N)

S : la surface de l'échantillon soumise à la force F (en m^2)

d : le diamètre de l'échantillon (en m)

Le tracé de la courbe contrainte-déformation permet d'accéder au module d'Young (E) du matériau, d'après la loi de Hooke :

$$\sigma = E.\varepsilon$$

A faible déformation, l'approximation d'une déformation linéaire peut être établie et la loi de Hooke peut être appliquée. Le module d'Young de chaque gel a été déterminé comme la pente initiale de la courbe contrainte-déformation tracée pour des compressions du gel d'environ 10%. Des expériences de compression ont donc été réalisées pour les différentes formulations de gels synthétisés.

II.4.1.Compression de gels synthétiques

Une fois synthétisés, les hydrogels sont lavés dans leur solvant aqueux et laissés gonfler au moins 24h afin qu'ils atteignent leur équilibre thermodynamique. Leurs modules d'Young sont déterminés à partir des expériences de compression.

La littérature est riche en exemples d'hydrogels dont la composition est sélectionnée afin d'obtenir les propriétés mécaniques, de gonflement, de délivrance de molécules souhaitées. Dans ces exemples, l'augmentation du pourcentage massique de polymère dans la formulation entraîne, dans la quasi-totalité des cas, une augmentation de la rigidité du matériau final[228]. Il en est de même du taux de réticulation, dont l'augmentation entraine une rigidité plus grande du matériau ainsi qu'un gel souvent plus compact, avec un gonflement réduit.

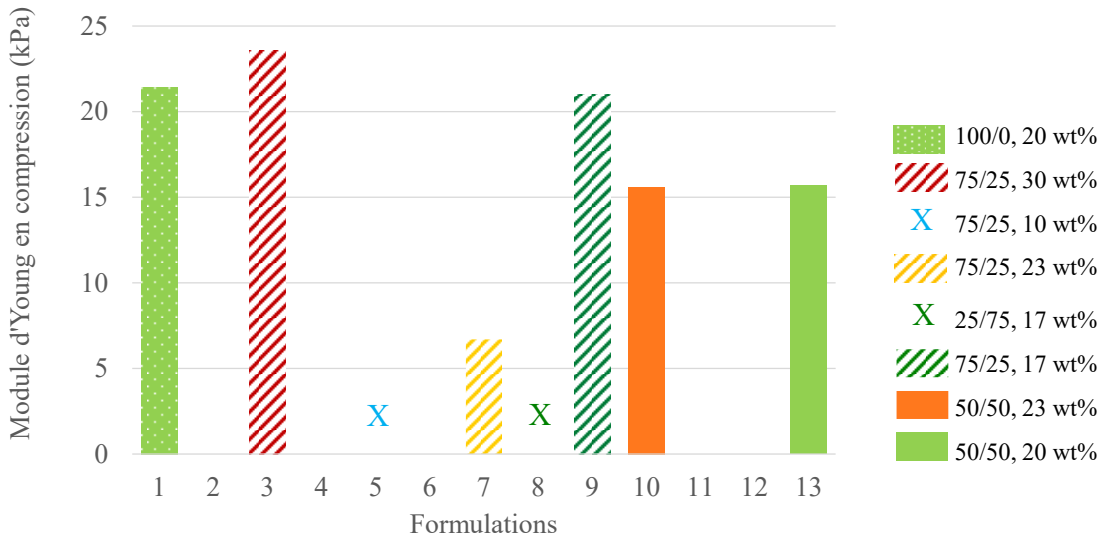


Figure 140: Résultats des modules des gels formulés par le premier plan d'expériences avec la β-CD-m-POE et mesurés en compression. Les croix représentent les formulations qui n'ont pas pu être mesuré car trop molles.

Les gels synthétisés à base de β-CD-m-POE selon le premier plan d'expériences ont été mesurés en compression et les valeurs de module trouvées ont été représentées sous forme d'histogramme sur la Figure 140. Ce plan d'expériences n'a pas été finalisé car certaines formulations, trop molles, n'ont pas pu être mesurées en compression. Dans un souci d'économie de matière, nous avons donc choisi de ne pas réaliser toutes les expériences. Ces expériences nous ont permis de faire plusieurs remarques quant à l'influence de la formulation sur la rigidité finale des hydrogels. On constate tout d'abord en comparant les gels 3 et 5 que le pourcentage massique en polymère joue bien un rôle dans la rigidité finale du matériau. En effet le gel 5 contenant 10 %m de polymère est si mou qu'il ne peut pas être mesuré en compression sans être endommagé tandis que le gel 3 à 30 %m en polymère est le gel le plus rigide de la série. En comparant les gels 1 et 13 par exemple, on peut voir l'influence du taux de réticulation. En effet, plus une formulation est riche en tétrathiol par rapport au dithiol, plus son taux de réticulation est important et plus son module semble élevé. Le gel 1 ne contenant que du tétrathiol apparaît plus rigide que le gel 13 pour le même pourcentage massique. La même remarque peut être faite en comparant les rigidités des gels 8 et 9. La rigidité du gel 7 apparaît peu cohérente avec les observations précédentes. Il s'agit peut-être d'un point aberrant.

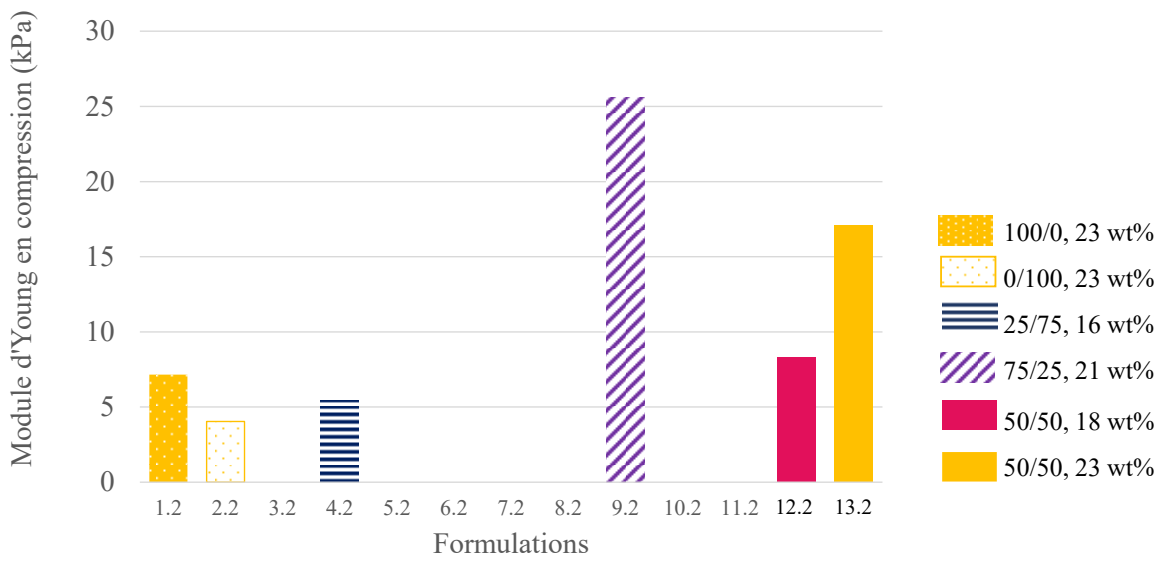


Figure 141 : Résultats des modules des gels formulés par le deuxième plan d'expériences avec la β-CD-m-POE et mesurés en compression.

Les résultats du deuxième plan d'expériences suggèrent la même tendance (Figure 141), les gels 9.2 et 13.2 à respectivement 21 et 23 %m de polymère sont plus rigides que le gel 4 à 16 %m. Le gel 2.2 est le plus mou car il n'est constitué que de dithiol qui ne participe pas à la réticulation du gel de façon aussi marquée que le tétrathiol. Seule la formulation 1.2 ne semble pas obéir à ces règles. Cependant, des imprécisions peuvent venir de la méthode de mélangeage (en Y) utilisée pour ces synthèses. On a pu noter que les changements opérés dans le deuxième plan d'expériences, à savoir augmenter le %m de plusieurs formulations, ont permis de pouvoir synthétiser et mesurer en compression les gel 2 et 4 pourtant attendus comme les plus mous de ce plan d'expériences.

Les paramètres choisis pour les plans d'expériences, permettent bien d'obtenir des gels aux modules en compression variés et dans les ordres de grandeurs recherchés. Des mesures en microscopie à force atomique ont ensuite été réalisées afin de déterminer si l'isomérisation des 4F-AZO au sein du gel permet un contrôle de ses propriétés mécaniques.

II.5. Caractérisation des propriétés mécaniques des hydrogels par microscopie à force atomique (AFM)

La microscopie à force atomique (AFM) est une technique de microscopie à champs proche qui scanne la surface d'un échantillon en mesurant ses forces d'interactions avec la sonde. Cette technique est classiquement utilisée pour deux types d'analyse, de la morphologie de surface (imagerie) et de la caractérisation de propriétés mécaniques. Elle a déjà été utilisée pour

analyser les propriétés mécaniques d'hydrogels et a été utilisée ici pour évaluer la dépendance entre la rigidité des gels macromoléculaires contenant du 4F-AZO et de la β-CD, et la configuration des 4F-AZOs contrôlée par irradiation à 415 et 530 nm.

II.5.1. Théorie et méthode

L'AFM a été développée en 1986[243] et peut fournir des images en trois dimensions de la surface de matériaux avec une résolution moléculaire, voire atomique dans certains cas. La sonde utilisée par l'AFM est une pointe, généralement pyramidale ou conique, de taille micrométrique. Cette pointe est montée au bout d'un bras de levier qui se déforme lorsque la pointe approche, touche ou se retire d'une surface. Un laser pointant sur l'arrière du levier est réfléchi sur un photodétecteur à quatre cadrans (photodiode), ce qui permet d'enregistrer la déformation du levier (Figure 142). Grâce à la photodiode, les déflexions verticale et horizontale du levier sont mesurées au cours du balayage de la surface d'intérêt, renseignant sur l'angle de déflexion du levier et donc sur les caractéristiques de la surface sous-jacente.

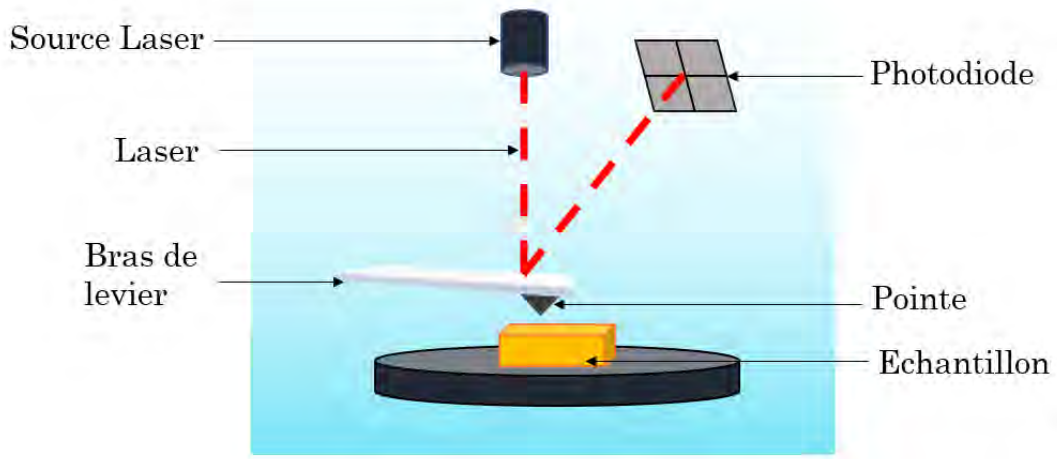


Figure 142 : Schéma de principe de l'AFM. Un laser arrive sur le levier et s'y réfléchit jusqu'à la photodiode qui acquiert le signal.

Chaque levier est défini par sa constante de raideur (k), qui dépend de ses propriétés mécaniques et de ses dimensions. Le levier est le capteur de force de l'AFM, sa déformation induite par une force dépend de sa raideur d'après la loi de Hooke. En fonction de l'application recherchée, il est nécessaire de travailler avec un levier de raideur adaptée. Par exemple, pour l'analyse de morphologies de surface, le levier ne doit pas déformer ni endommager l'échantillon alors que pour l'étude mécanique de surfaces par courbes de forces, il faut que le levier soit capable de déformer légèrement cette surface. Un levier de raideur faible ne permettra pas de déformer un matériau très rigide comme un levier de raideur importante ne permettra pas de mesurer de

faibles forces.

Différents types d'interactions, attractives ou répulsives, peuvent entrer en jeu lors d'une mesure par AFM. Elles sont classées en fonction de leur distance d'action : forces à très courte portée (0 à 1 nm), forces à courte portée (1 à 10 nm), forces à longue portée (au-delà de 10 nm). A longue portée, ce sont les forces électrostatiques qui priment. Elles peuvent être dues à la présence de charges sur l'échantillon ou à la présence d'un potentiel appliqué sur celui-ci. Les forces à courte et très courte portées englobent les forces de Van der Waals, attractives, les forces « chimiques », lorsque des atomes de la pointe peuvent réagir chimiquement avec des atomes de la surface, et les forces d'adhésion et de capillarité. La force de capillarité est due à l'eau présente dans l'air, le cas échéant, qui se dépose en fine couche sur tout l'échantillon et génère un ménisque à l'approche de la pointe. La force d'adhésion est conséquente lors de l'étude de matériaux comme les polymères qui possèdent une forte adhésion de surface. Ces interactions peuvent être mesurées en effectuant des courbes d'approche-retrait ou courbes de force. Elles donnent les forces subies par la pointe en fonction de sa distance à la surface de l'échantillon.

Il existe plusieurs modes de fonctionnement d'un AFM, à utiliser en fonction de l'information recherchée et de la nature de l'échantillon. Pour les comprendre, nous expliciterons le potentiel de Lennard-Jones[244]. Il décrit la force d'interaction entre deux atomes i et j telle que l'énergie potentielle produite par ces atomes soit :

$$V_{ij}(r) = 4\varepsilon\left[\left(\frac{R_0}{r_{ij}}\right)^{12} - \left(\frac{R_0}{r_{ij}}\right)^{6}\right]$$

avec R_0 la distance interatomique pour laquelle le potentiel change de signe, ε la profondeur du puits où l'énergie d'interaction est minimale, r_{ij} la distance entre les deux atomes i et j. Le terme en r^{-6} décrit les forces attractives de Van der Waals alors que le terme en r^{-12} représente la répulsion entre deux atomes (Figure 143)[245].

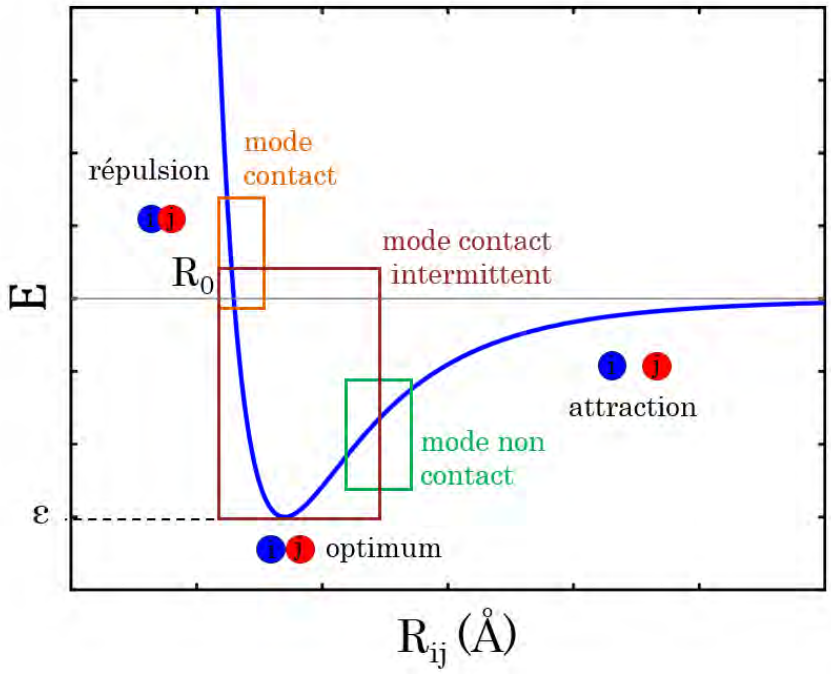


Figure 143 : Potentiel de Lennard-Jones et modes d'action de l'AFM en fonction de la distance pointe-échantillon.

Trois zones se dégagent du tracé du potentiel de Lennard-Jones, en fonction de la distance entre la pointe de l'AFM et de l'échantillon, correspondant à trois modes d'action de l'AFM (Figure 143).

Le mode contact s'effectue dans la zone où les forces exercées sur la pointe sont répulsives. Ce mode permet de caractériser la topographie de l'échantillon en suivant la déflexion du levier lorsque la pointe est en contact avec sa surface. Pour cela, on peut, soit mesurer la force d'interaction à hauteur constante du levier par rapport à la surface, soit suivre la position du levier à déflexion constante. La limite principale de cette méthode est le risque d'endommager la surface de l'échantillon, ou la pointe, car la pression appliquée par celle-ci peut s'avérer importante lors du balayage de la surface. Il s'agit d'un inconvénient d'autant plus grand que l'on veut analyser des matériaux mous.

Le mode contact intermittent, ou dynamique, a été développé par Martin *et coll.* en 1987 pour pallier ces limites[246]. Dans ce mode, la pointe oscille à sa fréquence de résonnance juste au-dessus de la surface de l'échantillon. Lorsque la pointe interagit avec la surface, l'amplitude des oscillations et leur phase sont modifiées respectivement par la topographie et la dureté de l'échantillon. L'avantage de cette méthode par rapport au mode contact est la diminution des forces de contact et donc un risque moindre d'abîmer l'échantillon. Cette méthode est cependant moins rapide à exécuter que la précédente. L'expérimentateur devra donc faire un compromis entre une plus grande qualité d'analyse ou un temps plus court.

Le mode non-contact travaille dans le domaine où les forces attractives priment. Dans ce mode, la pointe n'entre jamais en contact avec l'échantillon, elle est conservée à distance fixe de la surface et oscille à une fréquence proche ou égale à sa fréquence de résonnance. La déflexion du levier est enregistrée et elle n'est due qu'aux interactions attractives existant entre la pointe et l'échantillon. Ce mode de fonctionnement concerne essentiellement les expériences menées sous vide.

Dans ce travail nous avons utilisé l'AFM afin de déterminer les propriétés mécaniques locales d'échantillons d'hydrogel. A ces fins, l'AFM est utilisé en mode de mesure de force par contact, souvent appeler mode spectroscopie de force, la pointe enregistre la force appliquée en fonction de la distance qu'elle parcourt en indentant le gel. La courbe de force ainsi tracée permet d'extraire le module d'Young du gel grâce à la constante de raideur du levier et à l'application d'un modèle mécanique à l'échantillon étudié. La constante de raideur est déterminée par une calibration sur un substrat connu, ici une lame de verre. Le modèle de Hertz est le plus souvent utilisé pour décrire le comportement d'hydrogel dans leur domaine d'élasticité, avec le coefficient de Poisson (ν) adapté au polymère d'intérêt, souvent 0,5 pour des gels de gélatine[247] et de 0,45 à 0,5 pour des gels de POE[231]. La valeur de 0,5 sera considérée ici, correspondant à l'hypothèse que sur de très faibles indentations, les gels macromoléculaires sont incompressibles. La forme de la pointe sera considérée comme un cône de demi-angle 17,5°. Ce mode d'acquisition de données et ce modèle ont permis de tracer des courbes de force pour plusieurs gels et d'analyser ainsi la rigidité de ces matériaux en différents points, à différents temps et pour différents états d'isomérisation du 4F-AZO.

II.5.2.Résultats des analyses AFM

Afin de mettre au point la préparation d'échantillon et la méthode, des gels sans β-CD ont tout d'abord été analysés en AFM par spectroscopie de force. Puis des gels macromoléculaires photo-stimulables sont ensuite mesurés en présence d'irradiations *in situ*.

II.5.2.1.Gel sans β-CD

Un gel formé à partir de terpolymère et de tétrathiol, sans cyclodextrine, a ensuite été étudié afin de déterminer si l'isomérisation des 4F-AZOs contenus dans le gel suffit à entraîner un changement de propriétés mécaniques du gel. En effet, certaines études ont montré que l'isomérisation d'un azobenzène contenu dans des gels de POE[159] et de polyacrylamide[242] permettait le contrôle des propriétés mécaniques de ces gels. Plus précisément, Rosales *et coll.* montrèrent, en rhéologie, que le module de stockage de gels de POE pouvait chuter de 3 à 8%

environ, selon la formulation, lors de l'isomérisation *trans→cis*. Les propriétés initiales des gels pouvaient être retrouvées après l'isomérisation retour, moyennant une certaine fatigue. De la même façon, Lee *et coll.* intégrèrent un azobenzène dans un gel de polyacrylamide puis mesurèrent par AFM le module d'Young de ces gels avant et après irradiation à 365 nm. Sur quatre formulations préférentielles, deux formulations montrent une rigidification (de 1,1 à 2,5 fois) après irradiation. Les deux autres montrent une diminution de module, l'une de 20% et l'autre de 80%. Il n'est donc pas exclu que, même sans la présence de β-CD, les hydrogels macromoléculaires contenant du 4F-AZO aient des propriétés mécaniques photo-stimulables.
Le gel sans β-CD préparé est fixé sur une lame de verre avec du vernis et recouvert d'une goutte d'eau (Figure 144a.) avant d'être analysé. Pour le suivi, en fonction des irradiations, des propriétés mécaniques du gel sans β-CD, des courbes de forces sont relevées à intervalle de temps régulier en un point du gel, en même temps irradié à 415 nm ou à 530 nm (Figure 144b.). Le gel est irradié *in situ* par la lumière bleue puis verte à l'aide d'une fibre optique amenée à l'intérieur du microscope. Il semble ici que la lumière n'ait pas d'influence sur la tenue mécanique du gel mesurée par AFM, qui semble stable au cours du temps malgré la présence de variations importantes. Ces variations peuvent être dues à la proximité entre la pointe AFM et l'interface eau/air qui peut induire des forces parasites sur la pointe.

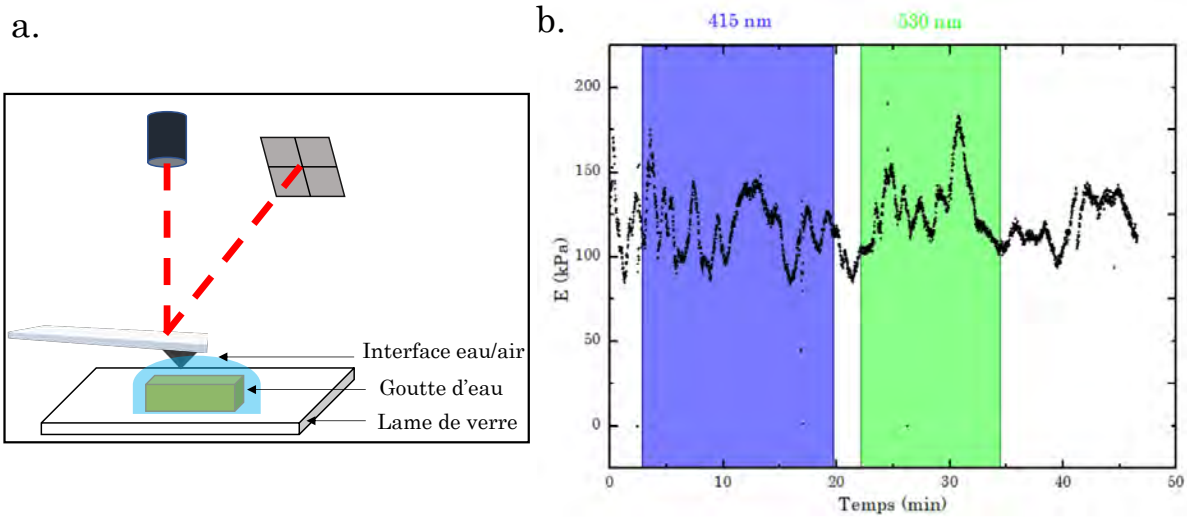


Figure 144 : a. Représentation schématique du montage de l'échantillon pour l'analyse AFM et b. suivi de la rigidité en un point au cours du temps sous irradiation par AFM pour un gel sans β-CD.

Plusieurs hypothèses peuvent être formulées à la suite de ces résultats :

- L'isomérisation d'AZOs en tant que groupes pendants, non intégrés au réseau qui forme le gel, n'affecte pas les propriétés du matériau. En effet dans les cas de Rosales *et coll.* et de Lee *et coll.*, l'azobenzène est l'agent réticulant du réseau de l'hydrogel, il fait donc

partie intégrante de la maille.

- La formulation choisie n'est pas optimale pour observer des variations de tenue mécanique. Comme montré par les précédentes études, la formulation des gels a une influence non négligeable sur l'amplitude de la réponse photomécanique.
- Le bruit de fond important obtenu pendant ces mesures cache l'amplitude de la réponse à la lumière, qui, comme revu précédemment, n'est pas toujours supérieure à 10%.

Les analyses suivantes ont été faites sur des gels formulés avec de la β-CD, afin de discuter ces hypothèses avec plus d'éléments.

II.5.2.2. Gel avec β-CD

Des hydrogels de différentes formulations contenant à la fois terpolymère et β-CD sont analysés après gonflement d'au moins 24h en AFM (Figure 145). Plusieurs groupes de recherche ont obtenu des résultats concluants en irradiant des hydrogels contenant des AZOs et CDs comme groupements pendants de polymères variés. Tamesue *et coll.* ont par exemple montré que les propriétés rhéologiques de gels à base de PAA et de curdlane pouvaient être contrôlées de manière réversibles entre des viscosités de 45 Pa.s et 9 Pa.s grâce aux interactions AZO/CD photoréversibles[162]. Rosales *et coll*. montrèrent de façon similaire, que la présence d'AZOs et de β-CDs comme groupes pendants sur de l'acide hyaluronique a permis l'obtention d'hydrogels à rigidité photocontrôlable par irradiations UV et bleue[164]. Les propriétés mécaniques de ces gels ont été contrôlées entre des modules 1 kPa et 650 Pa, déterminés en rhéologie. Les gels développés par Jorge Royes Mir contenant un réseau chimique créé par réaction maléimide-thiol et un réseau physique basé sur la complexation photocontrôlable entre AZO et β-CD ont été étudiés par AFM. Il a été montré que le module d'Young de ces gels perdait 50% au cours de l'isomérisation *trans*→*cis*[165]. L'isomérisation inverse a permis de retrouver les propriétés mécaniques initiales minorées d'une faible fatigue. L'objectif des expériences suivantes a été de déterminer si les hydrogels synthétisés possèdent des propriétés mécaniques photo-stimulables et avec quelle amplitude. Dans ce cas un second objectif aurait été d'optimiser cette réponse par la formulation. Un matériau possédant une grande amplitude de réponse est considéré comme préférable à un matériau dont les propriétés ne changent pas sensiblement en fonction de l'irradiation.

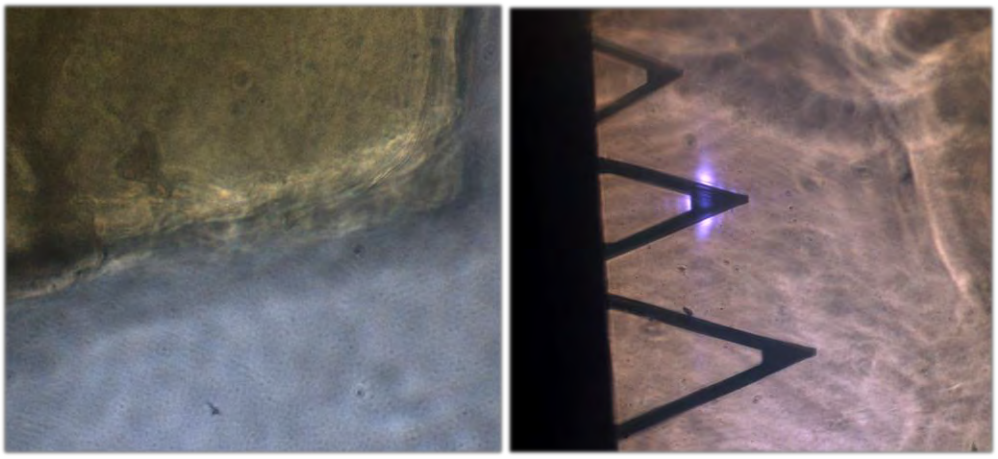


Figure 145 : Photographies d'une tranche d'hydrogel vue sous le microscope et des leviers AFM surplombant l'hydrogel.

Dans un premier temps, trois gels synthétisés avec de la β-CD sont analysés (Figure 145) selon le même protocole que pour le gel sans β-CD, c'est-à-dire, un point de la surface est choisi pour y enregistrer des courbes de force au cours du temps. L'analyse comprend un temps sans irradiation, puis une illumination bleue qui isomérise les azobenzènes majoritairement sous forme *cis* en forme *trans*. Une illumination verte suivra afin de ramener les azobenzènes à un état *cis*.

Un gel très mou (5.3, E≈1 kPa) et un gel plus rigide (9.2, E≈25 kPa) ont été analysés, comme précédemment, sur lame de verre (Figure 146a. et b.). Selon ce protocole, on a observé, à chaque fois, d'importantes fluctuations sur le tracé du module d'Young au cours du temps, comme dans le cas du gel sans β-CD. Ce phénomène parasite est certainement dû à la proximité entre la pointe et l'interface eau/air. Le choix du levier peut également influencer la mesure. En effet, le gel « rigide » a été analysé avec le levier C, le plus mou, de k=0,015 $N.m^{-1}$. Peut-être est-il trop mou pour déformer correctement le gel. Ce protocole ne semble en tout cas pas permettre de conclure à un effet des irradiations successives sur la rigidité des gels.

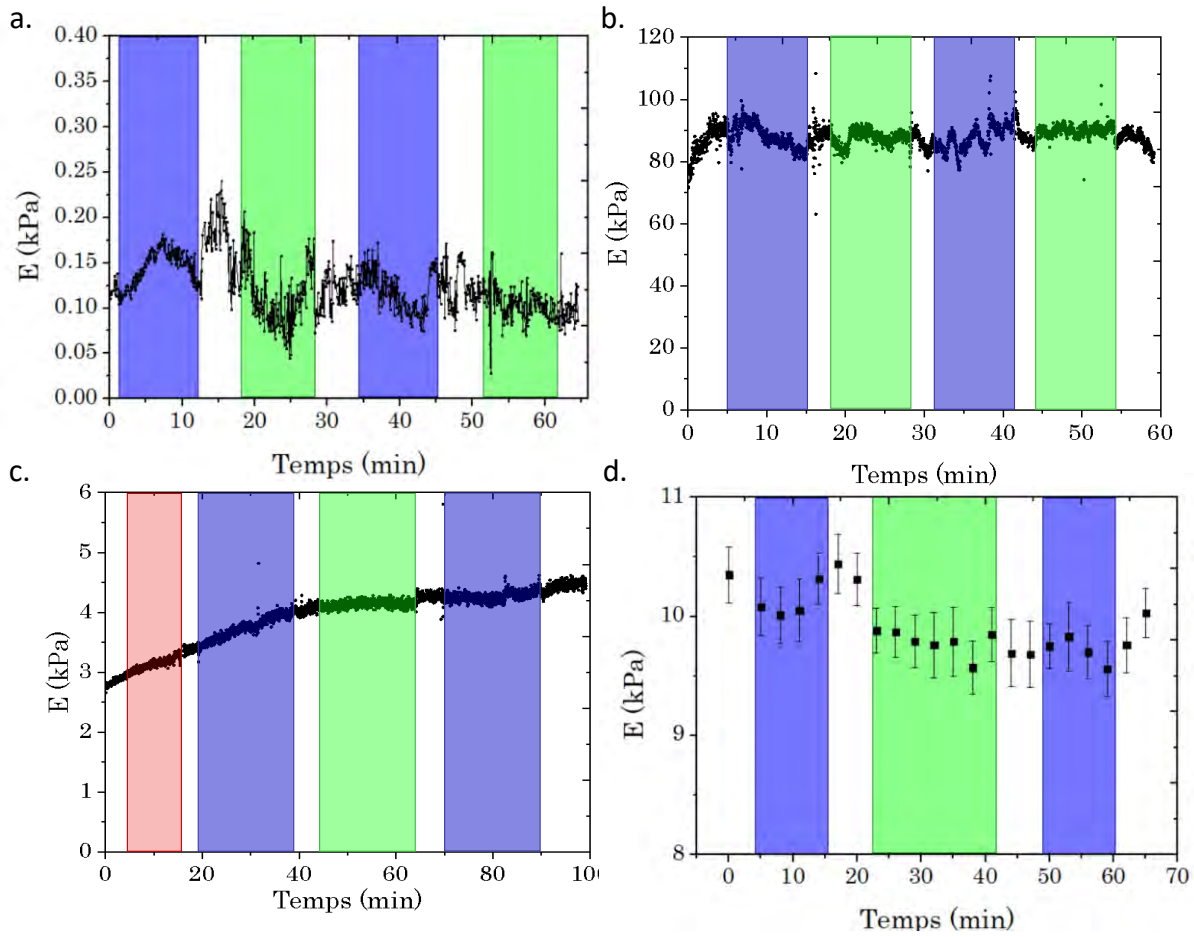


Figure 146 : Résultats des analyses par AFM de a. un gel mou (5.3, E≈1 kPa), b. un gel rigide (9.2, E≈25 kPa), c. un gel mou (5.3_{DMSO}, E≈1 kPa) dans la BioCell® et d. un gel de rigidité moyenne (F3) dans la BioCell® analysé par cartes de forces. Les barres d'incertitudes représentent l'intervalle de confiance à 95% (k=2).

Une troisième expérience a été réalisée en plaçant l'échantillon de gel mou (1 kPa en compression) sur une lamelle de verre, dans une cellule BioCell®, un porte-échantillon fermé par un joint hermétique (Figure 147). De cette façon, la mesure devrait être moins influencée par la proximité de l'interface eau/air ainsi que par l'évaporation de l'eau qui recouvre l'échantillon. La mesure utilise un levier MLCT-D de constante de raideur k=0,0379 $N.m^{-1}$, plus rigide que le levier MLCT-C. Ici, l'utilisation de la BioCell®, ainsi que celle d'un levier adapté, semble avoir un vrai impact sur le bruit de la mesure, qui est significativement réduit par rapport aux expériences précédentes (Figure 146c.). La tendance de la courbe expérimentale à augmenter en pente douce jusqu'à l'atteinte d'un plateau s'apparente à une stabilisation thermique, processus lent et indépendant des irradiations. Il apparaît donc nécessaire de stabiliser la température de bain, ou de la salle. Une irradiation rouge a été appliquée à l'échantillon en début d'expérience afin d'étudier l'effet de l'irradiation indépendamment de sa longueur d'onde. Considérant que la modification des propriétés mécaniques sur cette portion

de la courbe est liée à un effet thermique, le matériau ne semble pas sensible à la lumière rouge. Il n'est malheureusement pas plus sensible aux lumières bleue et verte appliquées par la suite. Compte tenu de la littérature sur le sujet et des conclusions du Chapitre 2, le résultat attendu pour une telle expérience aurait été la diminution du module d'Young lors de l'irradiation bleue conduisant à l'isomérisation *cis*→*trans* du 4F-AZO. Ce n'est pas ce que l'on observe ici. Les résultats ne laissent pas non plus entrevoir de rigidification du matériau lors de l'isomérisation retour vers l'isomère *cis*. Cette expérience nous pousse à conclure que l'isomérisation des azobenzènes de cet hydrogel n'a pas d'influence sur ses propriétés mécaniques.

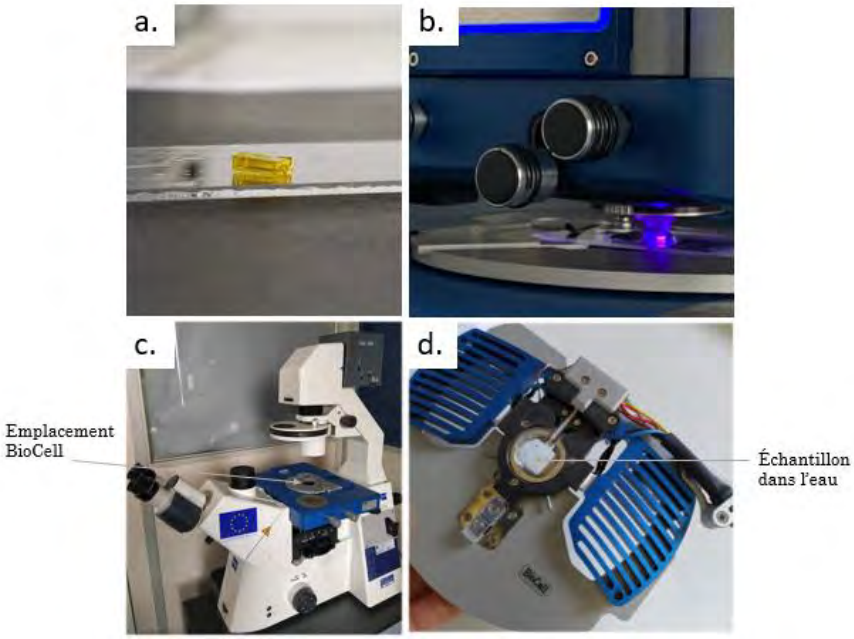


Figure 147 : Photographies de a. un échantillon pour l'analyse AFM, tranche de 1mm d'épaisseur environ, b. de la tête AFM au contact d'un échantillon sur lame de verre irradié à 415 nm, c. du microscope utilisé pour l'AFM et d.de la BioCell® contenant un échantillon fixé sur lamelle de verre et immergé dans l'eau.

Chacune de ces expériences n'étudie les propriétés mécaniques du gel au cours du temps qu'en un point. Un point dont la stabilité peut varier en fonction de l'adhérence du gel à la lamelle de verre support ou de la déformation du matériau. Afin de s'affranchir de cette incertitude de mesure, la dernière expérience décrite ici enregistre des cartes de force au cours du temps sur un échantillon de gel de formulation F3 placé dans la BioCell® sous atmosphère thermostatée (23°C). Une carte de 4 μm^2 à 1024 pixels est enregistrée avant le début de l'expérience et une seconde à la fin (Figure 148). Ces cartes sont précises mais longues à acquérir, c'est pourquoi seulement deux sont enregistrées en début et fin d'expérience. Chaque carte de la cinétique balaye 1 μm^2 divisé en 256 points. Chaque point du graphique (Figure 146d.) représente la

moyenne des modules trouvés sur une carte. Pendant l'acquisition, l'échantillon est de nouveau soumis à trois irradiations. Ce graphe ne semble pas montrer clairement une dépendance à la configuration des 4F-AZO.

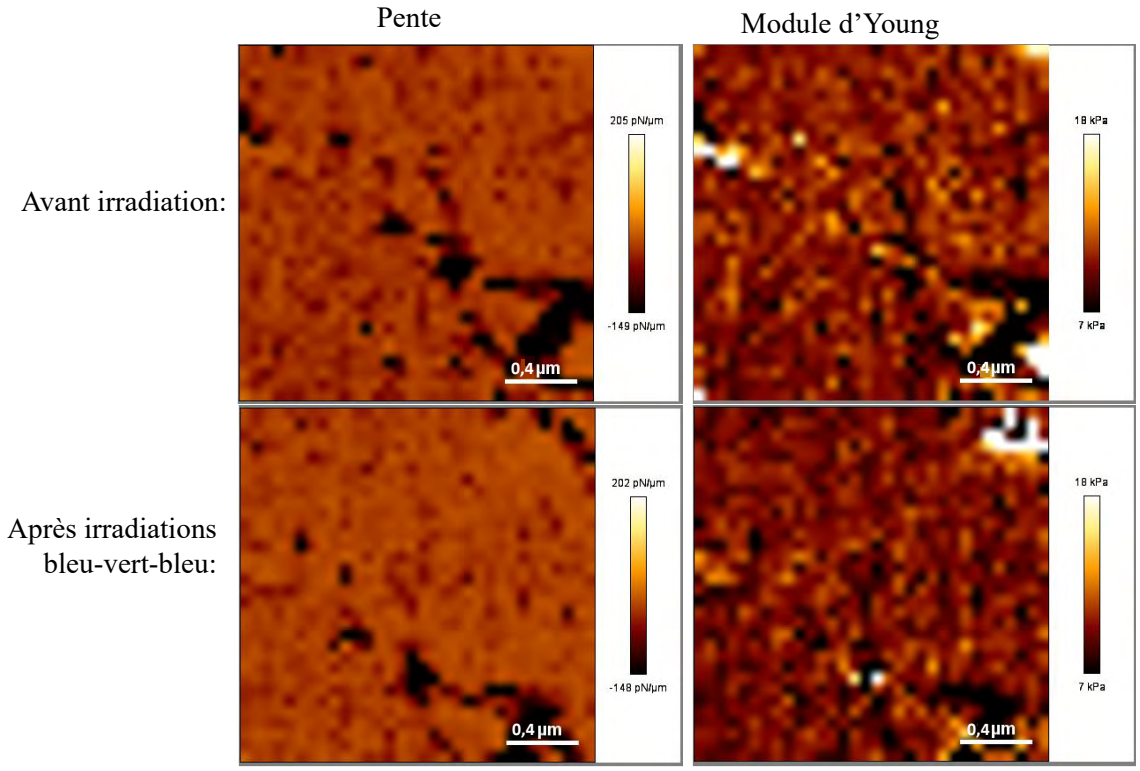


Figure 148 : Résultats des analyses par cartes de force sur le gel F3. Les cartes de gauche représentant la pente de l'échantillon et les cartes de droite représentent le module d'Young. Les cartes sont enregistrées sur une surface de 2x2 µm^2 divisée en 32x32 pixels, avant et après exposition aux irradiations.

Selon la même tendance, les cartes enregistrées en début et fin semblent presque identiques. Le module moyen mesuré sur 4 µm^2 (1024 mesures) n'a pas varié au cours des irradiations, il est passé de 10 kPa à 9,7 kPa.

II.5.2.3.Discussion et limites du modèle

La microscopie par AFM, et notamment des expériences d'indentation et de courbes de forces, se sont révélées de bons instruments pour la mesure de rigidité de matériaux mous comme les hydrogels. Elle a notamment permis, dans cette étude, la mesure des propriétés mécaniques de gels macromoléculaires au cours du temps sous irradiation *in situ*, ainsi que l'acquisition de cartes de forces sur ces matériaux. Cependant, il existe des limites aux expériences menées ici, essentiellement relatives à la valeur du coefficient de Poisson ainsi qu'à la pointe utilisée.

Lors d'une déformation en compression, le coefficient de poisson quantifie l'expansion du matériau dans les directions orthogonales à l'axe de compression[248]. Dans cette étude, la valeur

de 0,5 a été considérée pour des gels macromoléculaires à base de POE. Cette valeur est valide dans le cas de gels modèles incompressibles et elle est le plus souvent juste pour de faibles déformations, comme c'est le cas lors des expériences de nanoindentation. Cependant, des études ont montré que cette valeur était sujette à diminuer dans le cas de gel de POE[248], et ce phénomène est d'autant plus marqué que le gel possède un taux de gonflement important[249]. Le modèle de Hertz adapté à une pointe conique a été décrit par Lin *et coll.*[250] tel que :

$$F = \frac{E.2tan\alpha.\delta^2}{(1-\nu^2).\pi}$$

avec F la force appliquée par la pointe sur le matériau

E le module d'Young du matériau

α l'angle de demi-ouverture du cône

δ la profondeur d'indentation

ν le coefficient de Poisson du matériau

En conservant tous les paramètres de ce modèle constants, cette formule montre que pour une variation de ν de 0,5 à 0,3 (matériau incompressible à matériau compressible), le module d'Young calculé par le modèle varie d'environ 20%. Il est donc possible que l'écart de module d'Young observé entre la compression et les mesure en AFM sur le gel 5 très mou, soient dues à un coefficient de Poisson imprécis car ce gel possède un taux de gonflement élevé. Une seconde limite de l'AFM dans la caractérisation des propriétés mécaniques de matériaux mous est le choix de la pointe AFM utilisée pour déformer le gel pendant la mesure. L'utilisation de pointes coniques peut poser problème avec des gels très mous dans la mesure où elles risquent de traverser l'échantillon plutôt que de le déformer. Pour limiter cette difficulté, l'utilisation de microsphère de verre en bout de pointe AFM a été employée dans la littérature et a montré de bons résultats pour la mesure de propriétés mécaniques d'hydrogels[242,251]. Un défaut de ces microsphères est qu'elles sont soumises à de plus grandes forces d'adhésion au moment du retrait que des pointes coniques. Les gels synthétisés avec de la β-CD montrent déjà une grande adhésion à la pointe, l'utilisation d'une pointe qui exacerbe ce phénomène n'est pas souhaitable ici. Les choix expérimentaux doivent donc être le résultat du meilleur compromis. Pour des matériaux mous de type hydrogel, il peut donc être délicat de corréler les valeurs de rigidité trouvées en compression avec celle déterminées en AFM. Dans notre cas, qui plus est, les mesures de compression sont réalisées à l'air alors que les échantillons AFM sont immergés dans l'eau ou le PBS.

Malgré ces limitations, au cours d'une même expérience, tous paramètres étant égaux, il a été

possible d'observer le comportement de gels macromoléculaires soumis à la lumière. Le protocole a été optimisé, notamment par l'utilisation d'un module BioCell® et de l'expérimentation en milieu thermostaté. Il apparaît cependant, que, lors de ces expériences, l'irradiation n'entraîne pas de changement des propriétés mécaniques des hydrogels ; cela malgré l'isomérisation des azobenzènes qu'ils contiennent. En effet, l'association physique entre β-CD est azobenzène aurait dû permettre au matériau de gagner en mobilité, se ramollir, avec un 4F-AZO sous forme *trans* alors que son isomère *cis* aurait dû créer des interactions physiques conditionnant la maille. Il ne semble pas que cela soit ce qu'il se produise ici. Il avait été déterminé dans le Chapitre 2 que les constantes d'association entre les isomères du 4F-AZO dans la β-CD étaient non nulles et différentes, plus élevées pour la forme *cis*. Que pourrait-il se passer qui empêche le complexe de se faire, ou se défaire, menant ainsi aux propriétés souhaitées ?

Une hypothèse a été développée au cours des observations par AFM et de leur comparaison au système développé par Royes-Mir *et coll.* pour expliquer l'absence de réponse du système étudié ici. Une différence majeure entre ces deux systèmes, hormis la nature de l'azobenzène, est la présence d'un système polymère comme support du gel. Les fonctions azobenzènes et maléimides du terpolymère sont présentes en bout de branches pendantes sur un squelette méthacrylate (Figure 149a.). La présence de cette matrice polymère apporte probablement beaucoup de mobilité au système global. A l'inverse, le gel développé par Jorge Royes-Mir schématisé Figure 149b. possède plus de cohésion. Il semblerait que, dans un tel matériau, les associations et décomplexations successives entre azobenzènes et cyclodextrines soient à l'origine d'une déformation se propageant de proche en proche dans la masse du gel, en le déformant. Dans le cas du système étudié dans cette thèse, le support polymère limite probablement la propagation d'une déformation, car ses chaînes déformables ont la capacité d'absorber les déformations, résultant en un effet macroscopique moindre, voire absent. Dans la littérature, déjà répertoriée dans le premier chapitre de cette thèse, le groupe de Wu a développé un hydrogel photo-stimulable basé sur les interactions entre un tétra-méthoxy-AZO et une β-CD, tous deux greffés sur un PAA[145] alors que Yan *et coll.* ont développé un gel basé sur ces mêmes interactions mais sous forme de dimères capables de s'autoorganiser par l'intermédiaire de liaisons hydrogènes[166]. Ce deuxième gel a la capacité de passer d'une solution, avec le tétra-méthoxy-AZO sous forme *cis*, à un gel au module de stockage pouvant aller jusqu'à100 kPa lorsque le tétra-méthoxy-AZO sous forme *trans* se complexe à la β-CD. De telles amplitudes en rigidité n'ont, à ma connaissance, pas été publiées avec des systèmes

AZO/CD supportés par des polymères. Cet exemple met en perspective le rôle que peut jouer le support des molécules hôtes et invitées dans la conception d'un matériau aux propriétés macroscopiques stimulables. Il souligne la réflexion nécessaire sur le type de support à choisir en fonction de l'application visée. Pour un système réversible rapidement, aux propriétés répondant à la lumière, le gel de Jorge Royes-Mir est idéal.

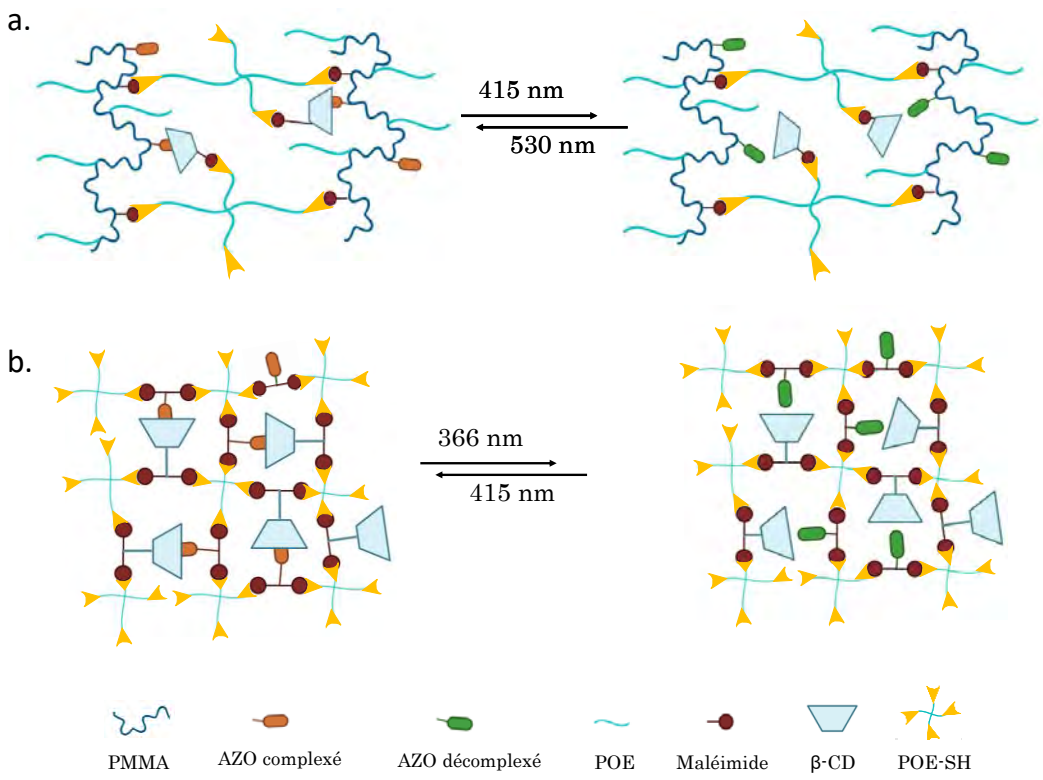


Figure 149 : Comparaison schématique du système gel utilisé dans cette thèse (a.) et de celui utilisé par Jorge Royes-Mir[165] (b.).

Afin de connaître le phénomène qui empêche les gels synthétisés de répondre à la lumière comme attendu, nous avons étudié par la suite le comportement du terpolymère en solution dans l'eau et dans certains solvants organiques, seul et en présence de β-CD ou de dérivés de β-CD.

III.Etude des propriétés du terpolymère et de son interaction avec la β-CD

Les résultats obtenus en AFM peuvent être reliés aux observations de cryo-MEB pour lesquelles nous avions émis cinq hypothèses (II.2). Ils nous permettent de conserver deux de ces hypothèses quant à l'absence de réponse mécanique à la lumière.

Nous avons premièrement montré par UV-Visible que la lumière déclenchait bien l'isomérisation des 4F-AZOs. Ensuite, une supposition formulée dans ce paragraphe concernait

la possibilité que l'isomère *trans* se lie mieux que le *cis* au 4F-AZO à la β-CD au sein du gel. Les résultats d'AFM nous permettent de conclure que cela n'est visiblement pas le cas puisqu'aucune des isomérisations directe ou retour n'a semblé entraîner de changement dans les propriétés mécaniques locales des gels analysés. Il est donc possible que les observations en cryo-MEB soient liées à une inhomogénéité du gel échantillonné. Il reste donc à étudier les deux hypothèses restantes face au constat « le gel ne change pas de rigidité avec la lumière », à savoir :

- il est possible que le complexe ne se forme pas entre le 4F-AZO-terpolymère et la β-CD-m
- il est également possible que la complexation et décomplexation n'induise pas de contraintes assez fortes pour réorganiser le matériau et entraîner des modifications de ses propriétés mécaniques.

Pour déterminer la validité de la première hypothèse, nous avons étudié la complexation entre le terpolymère et la β-CD commerciale très soluble dans l'eau par des méthodes spectroscopiques, UV-Visible et RMN. Des analyses en diffusion de la lumière viendront étoffer l'étude du comportement du terpolymère en solution aqueuse. Cette étude a été réalisée en collaboration avec le laboratoire de l'IMMM, au Mans. Certaines analyses comme la RMN NOESY (*Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY*) et la diffusion de la lumière ont été faites par ces collaborateurs, les résultats ayant été discutés de concert et font l'objet d'un article en cours d'écriture.

III.1.Complexation de 4F-AZO-terpolymère avec la β-CD ?

La première étape de cette partie a consisté à étudier la complexation entre le 4F-AZO porté par le terpolymère et la β-CD commerciale puisqu'il s'agit du système le plus simple à étudier dans un premier temps, et puisque l'on a déjà montré que le 4F-AZO-POE libre pouvait se complexer avec cette β-CD dans l'eau.

III.1.1.Propriétés spectrales du terpolymère en contact avec la β-CD

En solution, la formation d'un complexe entre azobenzène et β-CD peut être suivie par le déplacement des bandes d'absorption de l'azobenzène en UV-Visible, comme utilisé précédemment pour déterminer la constante d'association du 4F-AZO-POE avec la β-CD (Figure 150a.). Une solution de terpolymère protégé majoritairement *trans* est préparée dans une solution de NaCl à 0,15 mol.L^{-1} afin d'imiter les conditions expérimentales utilisées en

biologie. La β-CD également solubilisée est ajoutée en quantité croissante selon un protocole de dosage. La Figure 150b. ne montre aucun déplacement des bandes de l'AZO du terpolymère avec l'ajout de β-CD alors que le 4F-AZO-POE en interaction avec celle-ci montrait clairement un déplacement de la bande d'absorption n→π*. Il semble donc que, comme présupposé, le complexe ne se forme pas en solution aqueuse.

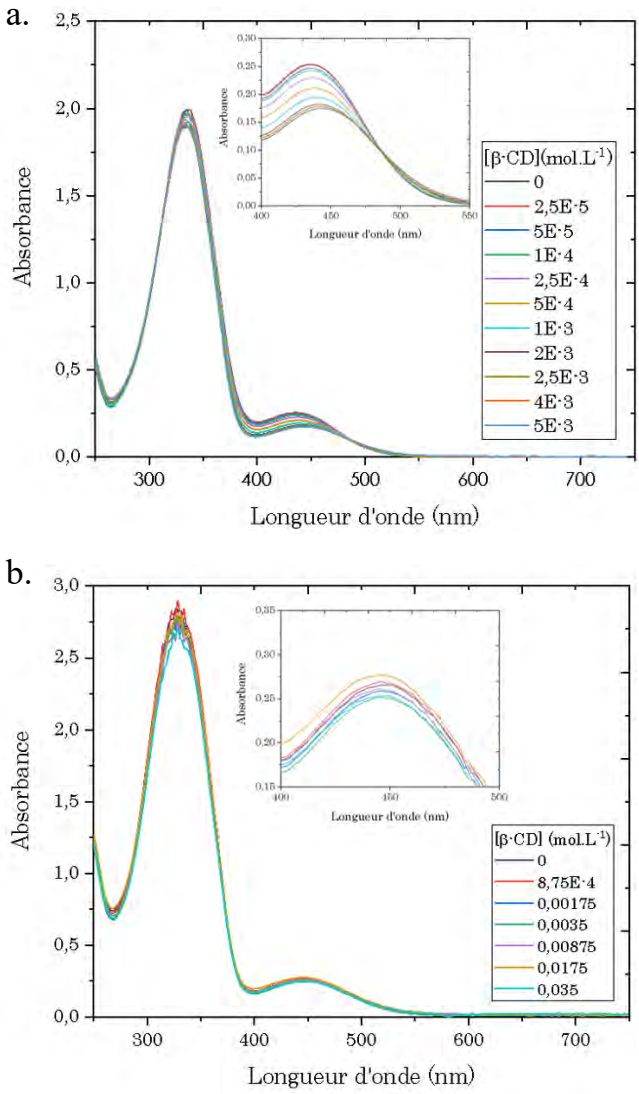


Figure 150: Spectres d'absorbance UV-Visible et zoom sur la zone de la bande n→π* des différentes solutions des dosages par la β-CD commerciale des a. 4F-AZO-POE-T dans l'eau et b. 4F-AZO-terpolymère protégé majoritairement trans en solution saline [NaCl]=0,15 mol.L^{-1}.

De la même façon que pour étudier la stœchiométrie des complexes 4F-AZO-POE / β-CD, la RMN peut permettre d'attester la complexation du 4F-AZO du terpolymère avec la β-CD en suivant le déplacement chimique des signaux aromatiques de la molécule invitée avec l'ajout de molécule hôte. Cette expérience est réalisée dans D_2O et les échantillons sont analysés par RMN ^{1}H et ^{19}F.

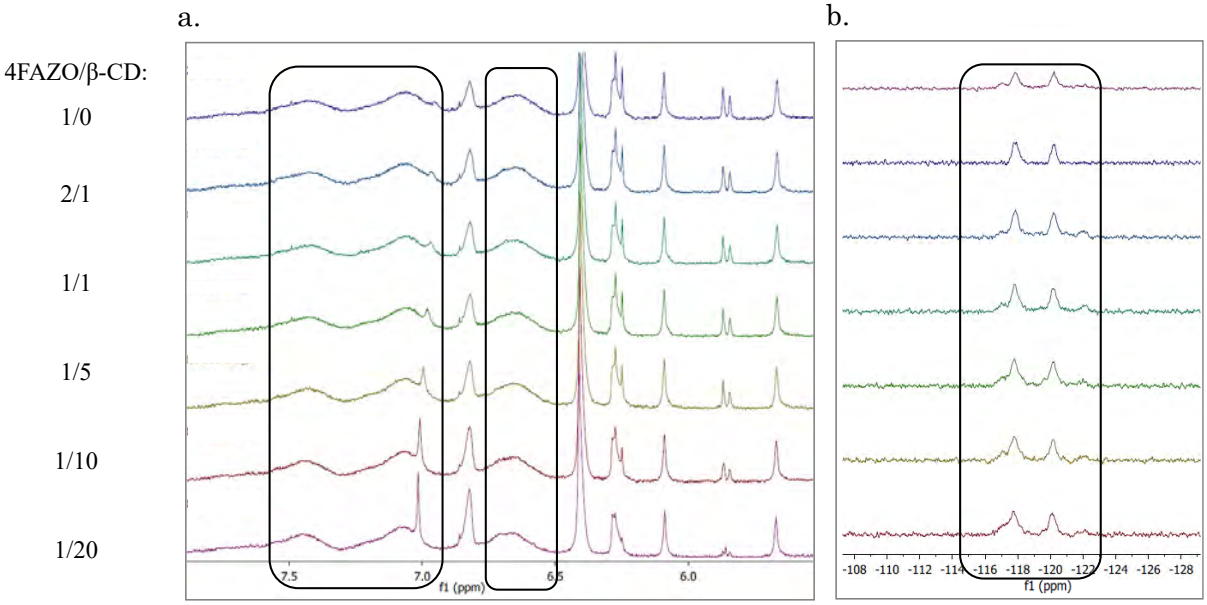


Figure 151 : Spectre RMN de dosage du 4F-AZO greffé sur le terpolymère par ajouts de β-CD dans D_2O en suivant la position des signaux des a. protons aromatiques de l'azobenzène en RMN ^{1}H et b. fluors portés par l'azobenzène en RMN ^{19}F.

Dans l'eau, les protons aromatiques du 4FAZO génèrent des signaux extrêmement larges, signe d'une interaction, agrégation[252] ou π-stacking[253] par exemple, qui induit une perte de mobilité du bout de chaine. Il est donc difficile d'évaluer avec précision un déplacement chimique. Les signaux des fluors, en revanche, sont clairement visibles et ne bougent pas avec l'ajout de cyclodextrine. Cette deuxième méthode confirme l'absence de complexe, ce qui explique l'absence de réponse à la lumière du matériau sous l'AFM. Par la suite nous avons voulu comprendre pourquoi le 4F-AZO du terpolymère ne peut pas être complexé par la β-CD.

III.2.Auto-organisation du terpolymère dans l'eau

En RMN ^{1}H, la présence de signaux très larges correspondant aux protons azobenzènes laisse penser que les 4F-AZO sont soumis à des interactions et ne sont pas bien solvatés en solution dans l'eau. Différentes techniques nous ont permis d'élucider cette question, à savoir la fluorescence, la RMN NOESY, et la diffusion de la lumière.

III.2.1. Agrégation

Il est bien connu que les azobenzènes sous forme *trans* peuvent former du π-stacking entre leurs deux cycles phényles plans[254,255]. Il existe des exemples dans la littérature où les azobenzènes greffés sur des polymères génèrent de l'émission induite par agrégation (AIE pour *aggregation-induced emission*) en solution aqueuse[256,257]. Cette fluorescence, peu commune aux

azobenzènes, est permise par le confinement dans l'espace des photochromes, dans le cœur de micelles par exemple. Dans ces conditions, la cinétique de photoisomérisation des AZOs est significativement réduite. Ainsi, lors d'une excitation dans l'UV, les AZOs *trans* ne pouvant s'isomériser ont la possibilité de se désexciter par l'émission de fluorescence. Cela se traduit par une augmentation de la fluorescence, très faible chez l'azobenzène libre, lors de la mise en solution du polymère dans l'eau. Des expériences ont été menées sur le 4F-AZO-terpolymère. Solubilisé dans un bon solvant, le DMSO, de l'eau est ajoutée en quantité croissante dans la solution et sa fluorescence est analysée à chaque ajout.

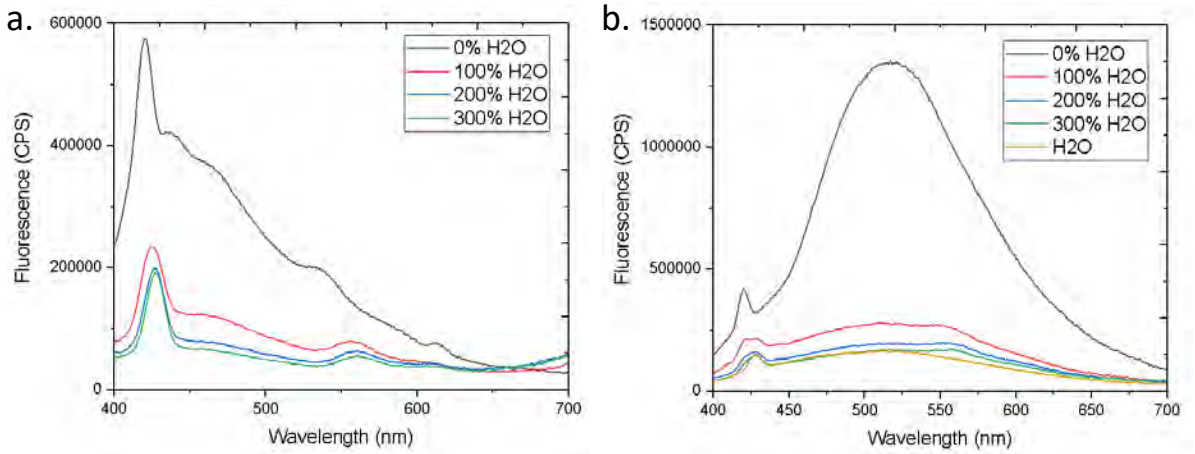


Figure 152 : Spectres de fluorescence en émission (ouverture de fente : 6 nm, λ_{ex} = 373 nm) du a. 4F-AZO-POE *trans* et du b. terpolymère (4F-AZO *trans*) en solution dans différents solvants.

Le 4F-AZO comme le terpolymère montre de la fluorescence initialement dans le DMSO (courbe noire « 0% H_2O » Figure 152), puis l'ajout d'eau l'éteint. Le terpolymère ne montre donc pas de signe d'un caractère d'AIE. Peut-être que la présence d'atomes de fluor empêche la formation de π-stacking. L'extinction de la fluorescence peut être due à une agrégation non organisée des groupements azobenzènes en présence d'eau. Le 4F-AZO est en effet un groupement très hydrophobe.

III.2.2.Repliement

L'utilisation du mode d'analyse NOESY en RMN (expérience réalisée par Inès Hamouda à l'IMMM) permet de faire visualiser la corrélation des protons proches entre eux dans l'espace. Il est donc possible d'accéder à des indices sur la morphologie du polymère et d'obtenir des informations quant aux interactions qui parasitent la liberté des bouts de chaines photo-sensibles dans l'eau. Le protocole utilisé est le suivant, on compare la NOESY du terpolymère dans le DMSO-d_6 qui solvate bien les chaînes à celle d'une solution de terpolymère dans le DMSO-d_6

à laquelle de l'eau deutérée est additionnée lentement sous agitation (voie DMSO). On voit que dans le cas du DMSO-d_6 pur (Figure 153a.), les signaux des protons aromatiques sont plus fins qu'en présence d'eau. Ce qui apparaît ensuite clairement est la présence de tâches de corrélation entre les protons du 4F-AZO et ceux du squelette de méthacrylate (Figure 153b.). Cette observation laisse penser que les bouts de chaines 4F-AZO très hydrophobes[258] ont tendance à se replier sur le squelette du terpolymère en présence d'eau. Cela expliquerait l'élargissement des signaux aromatiques en RMN ainsi que l'absence de complexation avec la β-CD très soluble dans l'eau.

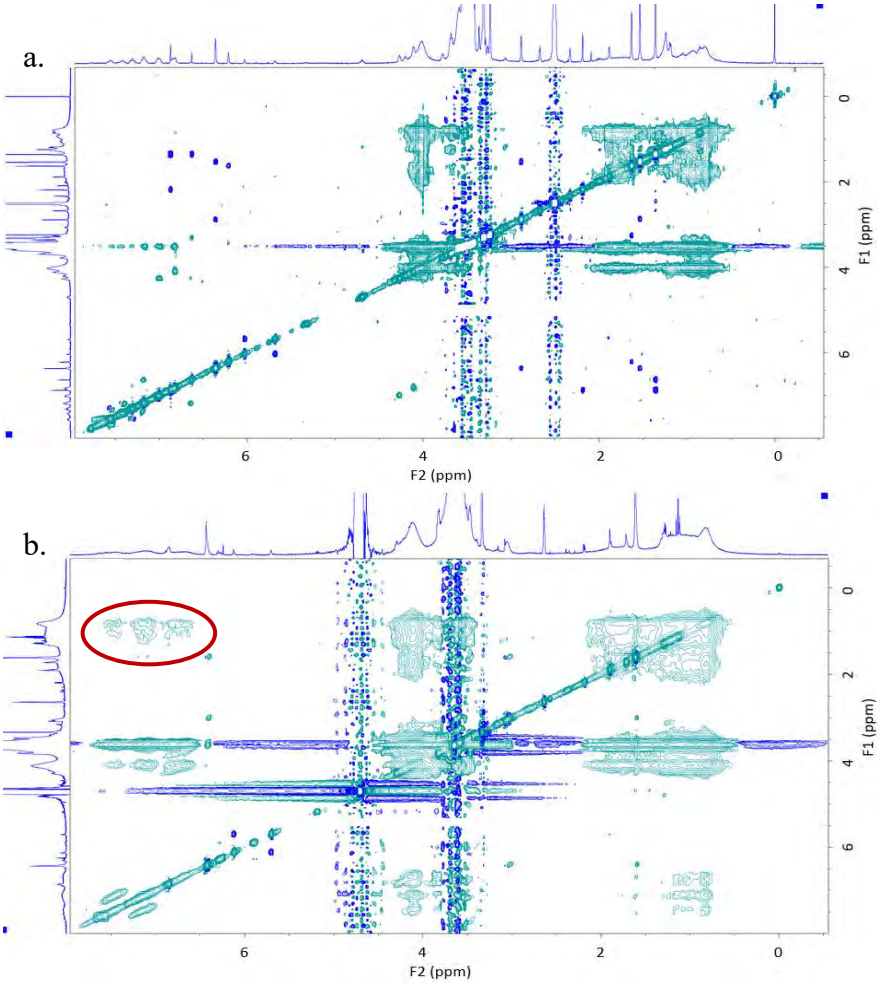


Figure 153 : Carte NOESY du terpolymère sous forme cis dans a. le DMSO-d6 et b. le D_2O par la voie DMSO.

III.2.3. Micelle unimoléculaire

Afin d'avoir une meilleure connaissance des propriétés du terpolymère dans l'eau, des analyses en diffusion dynamique et statique de la lumière (DLS/ SLS pour *Dynamic/Static Light Scattering*) ont été réalisées à l'IMMM sur le terpolymère dans sa version protégée.

La Figure 154a. et b. montre une masse molaire apparente trouvée en diffusion de la lumière d'environ 40 000 g.mol^{-1} et un rayon hydrodynamique de 6 nm pour le polymère dispersé dans l'eau sous forme *trans* (ronds vides) comme sous forme *cis* (ronds pleins). Ces valeurs correspondent à celle du polymère seul et ne tendent pas vers la conclusion d'autoassemblages intermoléculaires. L'imagerie par microscopie électronique en transmission (TEM pour *Transmission Electron Microscopy*) confirme la présence d'objets de très petites tailles (<10 nm) dans une dispersion du terpolymère dans l'eau (Figure 154c.). Cependant, la petite taille des objets ainsi que la qualité limitée du contraste n'ont pas permis d'extraire une distribution de tailles à partir des résultats de TEM.

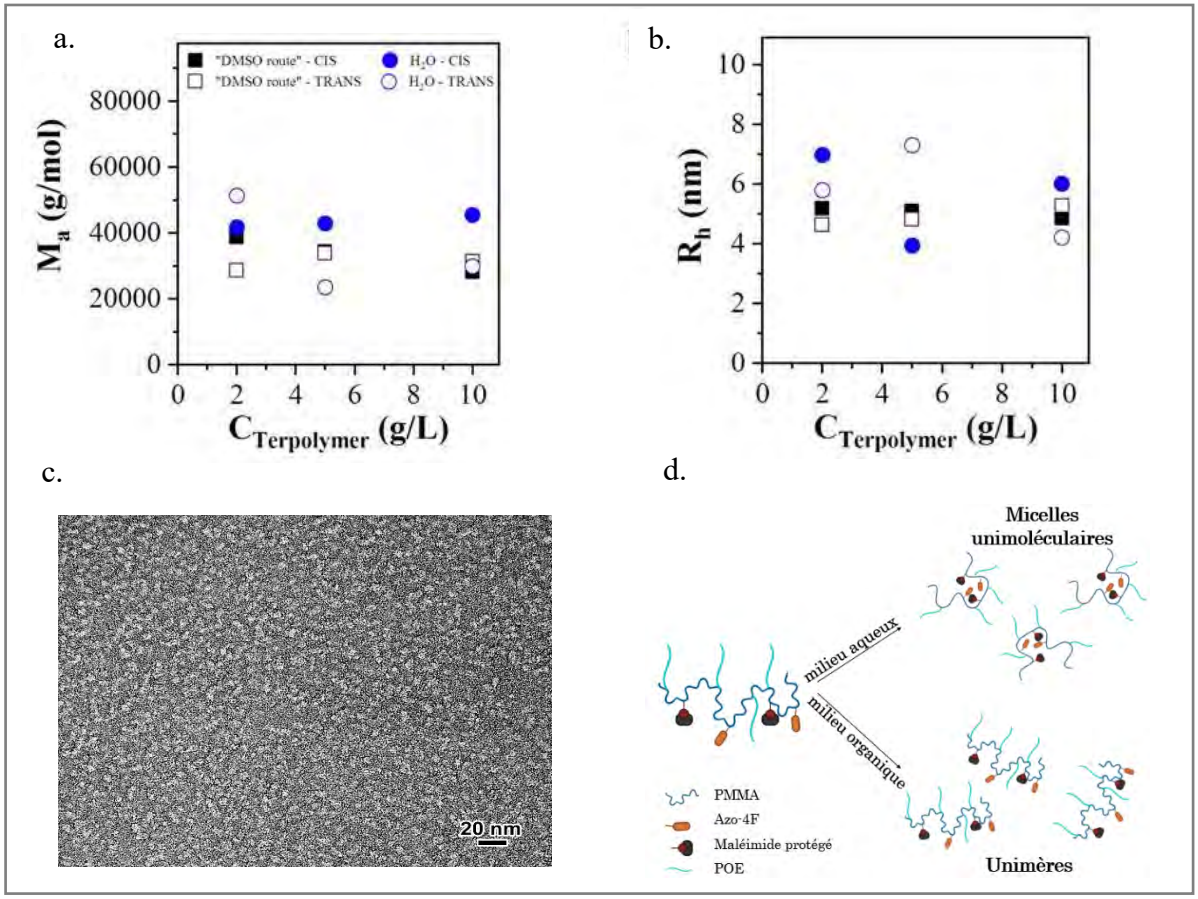


Figure 154 : Caractérisation du comportement dans l'eau du terpolymère protégé. Dépendance en concentration de a. la masse molaire apparente du terpolymère, de b. son rayon hydrodynamique en fonction de la méthode de solubilisation utilisée et de l'isomérisation de l'azobenzène. c. Image TEM du terpolymère dans l'eau à 1 g.L^{-1}. d. Schéma du comportement du terpolymère en milieu organique et aqueux.

Il est connu que certains systèmes appelés « cinétiquement gelés » n'ont pas la capacité de s'organiser thermodynamiquement par simple dissolution dans l'eau[259]. De nouvelles mesures ont été réalisées en solubilisant le terpolymère dans du DMSO lors d'une première étape puis en y ajoutant de l'eau sous agitation (voie DMSO). Par cette méthode, on retrouve des masses molaires et rayons hydrodynamiques très similaires à ceux de la simple dissolution dans l'eau (Figure 154a. et b. carrés). Il en est de même en variant la concentration en terpolymère. Dans l'eau, il n'y a donc pas de formation d'objets contenant plusieurs chaînes de polymère mais plus certainement une organisation intra-moléculaire de chaque molécule afin d'exposer le moins possible les groupements hydrophobes à l'eau, tandis que les chaines POE permettent la solubilisation du composé (Figure 154d.).

Synthétiser l'hydrogel dans un système 100% aqueux, ne semble pas être une méthode permettant de créer les complexes AZO/CD désirés. Nous nous sommes donc intéressés à des méthodes auxiliaires qui pourraient permettre d'atteindre cet objectif.

III.3.Alternatives envisagées pour forcer la complexation

III.3.1.Complexation dans un solvant organique

Différents exemples de la littérature utilisent un solvant organique comme solvant ou cosolvant afin de créer des complexes hôte-invité[260]. Le DMSO solubilise bien le terpolymère comme la β-CD, on a donc commencé par étudier la présence ou non de complexation par RMN dans le DMSO-d_6. Plusieurs échantillons contenant du terpolymère et des quantités croissantes de β-CD sont étudiés en RMN ^{1}H et RMN ^{19}F (Figure 155). Dans ce cas, les signaux des protons aromatiques du 4F-AZO sont clairs mais ne se déplacent pas avec l'ajout de β-CD. Il en va de même des signaux des fluors.

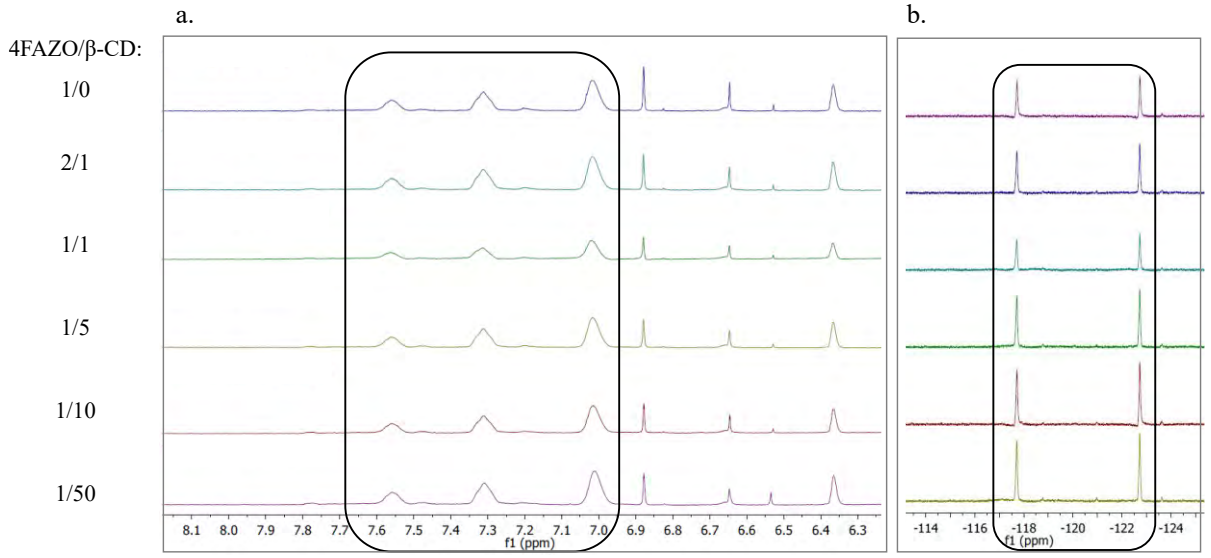


Figure 155 : Spectres RMN de dosage du 4F-AZO greffé sur le terpolymère par ajouts de β-CD dans DMSO-d_6 en suivant la position des signaux des a. protons aromatiques de l'azobenzène en RMN ^{1}H et b. fluors portés par l'azobenzène en RMN ^{19}F.

Des analyses en RMN DOSY (pour *Diffusion Ordered SpectroscopY*) ont été réalisées dans le DMSO-d_6 et dans le DMF-d_7. La DOSY permet de mesurer les coefficients d'autodiffusion translationnelle des molécules dans une solution. Il devient donc possible de distinguer différentes molécules d'un mélange car elles n'auront pas les mêmes coefficients de diffusion apparents. Ici, dû à leurs masses molaires différentes, la β-CD et le terpolymère devraient avoir des coefficients de diffusion différents. Une association hôte-invitée entre les deux molécules devrait rapprocher le coefficient de la β-CD de celui du terpolymère. D'après le Tableau 31, les deux molécules libres ont des coefficients très similaires dans le DMSO donc il n'est pas possible de conclure dans ce solvant. En revanche, dans le DMF, le mélange des deux molécules ne modifie en rien l'ordre de grandeur du coefficient de diffusion de la β-CD, assez différents de celui du polymère. Changer de solvant n'apparait pas comme une solution pour forcer l'interaction entre le 4F-AZO du terpolymère et la β-CD.

		DMSO-d_6	**DMF-d_7**
Espèce libre	Terpolymère	$3\cdot10^{-10}m^2.s^{-1}$	$5\cdot10^{-11}m^2.s^{-1}$
	β-CD	$3{,}3\cdot10^{-10}m^2.s^{-1}$	$3\cdot10^{-10}m^2.s^{-1}$
Mélange	Terpolymère	$3{,}4\cdot10^{-10}m^2.s^{-1}$	$6\cdot10^{-11}m^2.s^{-1}$
	β-CD	$2{,}9\cdot10^{-10}m^2.s^{-1}$	$2{,}8\cdot10^{-10}m^2.s^{-1}$

Tableau 31 : Coefficients de diffusion apparents du terpolymère et de la β-CD seuls et mélangés dans deux solvants différents mesurés par la RMN DOSY.

Il est possible que, dans ces deux solvants, la bonne solubilisation des extrémités AZO les empêche de chercher un environnement hydrophobe dans la cavité de la β-CD, ce qui ne favorise pas la complexation.

III.3.2.Complexation sans solvant

La β-CD est très connue pour son rôle de solubilisant de molécules organiques très hydrophobes dans l'eau. Or, comment ces molécules insolubles dans l'eau sont-elles insérées dans la cavité de la β-CD ? Une méthode employée depuis longtemps dans la littérature est celle de broyage à sec, ou à l'état pâte, dans un minimum de solvant[261].

III.3.2.1.Broyage manuel

A l'aide d'un mortier, le terpolymère est broyé avec un polymère commercial fonctionnalisé à 60 %m en β-CD (β-CD-polymère) pendant 1h avant. Le broyat est analysé en UV au cours du temps, à 15, 30 et 60 min. En spectroscopie UV-Visible il apparaît que, avec le 4F-AZO sous forme *trans*, la longueur d'onde du maximum d'absorbance varie de 442 nm pour 15 et 30 min de broyage à 446 nm après 1h. Ce décalage vers le rouge pourrait suggérer une complexation des AZOs *trans*. Dans le cas où l'azobenzène est isomérisé en *cis* avant le début du broyage, le maximum d'absorbance de la bande n→π*, très aplatie, passe de 424 nm à 426 nm. Cela ne permet pas de conclure de façon fiable à la présence d'un complexe. Le mélange broyé est mis en solution puis laissé reposer à température ambiante pendant plusieurs jours ; le mélange des deux polymères en solution n'a pas conduit à la formation de gel physique. Il semble donc que le broyage n'ait pas permis la formation d'un gel physique par interactions hôte-invité.
Une seconde expérience est réalisée avec broyage du terpolymère-4F-AZO-cis et de la β-CD-2m pendant 30 min suivi de leur solubilisation dans l'eau. A cette solution est ajoutée une solution de POE-tétrathiol pour former un gel. L'analyse de ce gel en AFM par cartographie au cours du temps sous irradiations bleues puis vertes ne montre pas de modification du comportement mécanique avec l'irradiation. Le broyage permet peut-être de complexer une partie des AZOs dans la β-CD, mais, si c'est le cas, l'isomérisation de l'AZO ne suffit pas à modifier les propriétés mécaniques d'un gel.

III.3.2.2.Mécanochimie

Dans l'optique de tester un protocole de « broyage » plus reproductible que le broyage manuel mais aussi plus puissant, nous avons utilisé un vibro-broyeur MM400 pour essayer de forcer l'inclusion des 4F-AZOs du polymère dans la cavité de la β-CD. Il s'agit de mettre les espèces

à faire réagir dans une jarre tapissée de téflon, d'y insérer des billes en oxyde de zirconium et d'activer le broyeur à vibration à la fréquence souhaitée. Trois jarres ont été préparées avec A. le terpolymère seul, B. le terpolymère et de la β-CD-m-POE et C. le terpolymère et de la β-CD-polymère. Les deux produits n'occupant pas assez de place dans la jarre, il est nécessaire d'apporter un diluant, nous avons choisi le sable de Fontainebleau pour son inertie chimique. Les jarres sont agitées 30 min pour A. et 1h pour B. et C. à 24 Hz. Après le broyage, chaque mélange a été analysé en spectroscopie UV-Visible.

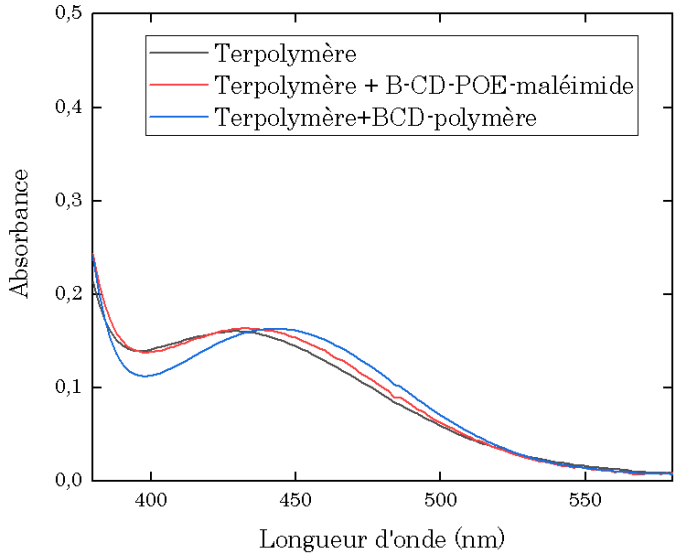


Figure 156 : Agrandissement sur la zone 370-570 nm du spectre d'absorption des surnageants extraits des réacteurs A (noir), B (rouge) et C (bleu). Les spectres sont standardisés pour mieux voir le décalage de la longueur d'onde du maximum d'absorbance vers 440 nm.

De la même façon qu'avec le broyage manuel, la mécanochimie en présence de β-CD semble décaler légèrement la longueur d'onde du maximum d'absorbance de la bande n→π* vers les hautes longueurs d'onde. Cependant, les spectres RMN dans le DMSO-d_6 n'indiquent pas de décalage des signaux des AZOs et le mélange avec la β-CD-polymère ne conduit pas à la formation d'un gel physique, ce que l'on aurait pu attendre si la reconnaissance entre cyclodextrines et azobenzènes avait lieu.

IV.Conclusion

A la fin du Chapitre 2, le 4F-AZO-POE avait été choisi pour être greffé sur un terpolymère pour la synthèse de gels photo-stimulables. Le Chapitre 3 a présenté les différentes briques de constructions choisies pour la synthèse de tels hydrogels à savoir :

- un terpolymère à base d'un squelette méthacrylate possédant des greffons

fonctionnalisés 4F-AZO, des greffons POE et des greffons fonctionnalisés maléimides,
- des β-CD fonctionnalisés maléimides,
- des POE-thiols commerciaux

Les fonctionnalités de ces briques élémentaires ont été calculées et ce travail a soulevé la difficulté à quantifier de façon fiable les fonctions maléimides présentes sur les dérivés de β-CD. Des hydrogels ont ensuite été formulés à partir de ces briques et des calculs de plans d'expériences. Les lots successifs de gels synthétisés dans différentes conditions ont permis de soulever plusieurs paramètres à optimiser au cours de ces synthèses. Plus particulièrement, la cinétique de la réaction maléimide-thiol a été très rapide dans les conditions des expériences et des alternatives ont été trouvées pour la ralentir, notamment, l'utilisation d'un peptide chargé s'est avéré très efficace à cette fin. Les gels synthétisés au cours des optimisations ont ensuite été étudiés à l'état gonflé dans un milieu aqueux. On a montré que le spectre d'absorbance de ces gels était modifié lors d'irradiations vertes et bleues, signe que les azobenzènes incorporés dans le matériau ont pu être stimulés. Les propriétés mécaniques ont été étudiées en compression montrant que les gels synthétisés possèdent des modules d'Young compris entre 5 et 25 kPa, correspondant à la gamme visée pour l'étude de cellules et tissus cardiaques. Enfin la tenue mécanique de différents gels a été étudiée sous l'influence d'irradiation lumineuse verte et bleues par AFM et les gels ont été imagés par MEB. Ces expériences ont fait état de l'absence de modification des propriétés mécaniques des gels sous irradiation. Or, dans la littérature, les associations hôte/invité entre azobenzènes et cyclodextrines ont plusieurs fois été utilisées pour modifier, grâce à la lumière, les propriétés rhéologiques et mécaniques d'hydrogels.

Ce constat nous a poussés à nous interroger sur la nature du phénomène nous empêchant d'observer les modifications attendues. Nous avons mis en lumière que le 4F-AZO porté par le polymère n'avait pas la capacité à complexer la β-CD, ce qui était plutôt inattendu. En effet, plusieurs hydrogels photo-stimulables ont déjà été synthétisés avec succès par le groupe d'Anseth à partir d'AZO et de β-CD greffées sur un polymère[164]. Cependant, le polymère utilisé dans ce cas était un acide hyaluronique soluble dans l'eau, la présence d'un squelette méthacrylate pourrait changer les propriétés du matériau final, en introduisant des repliement parasites.

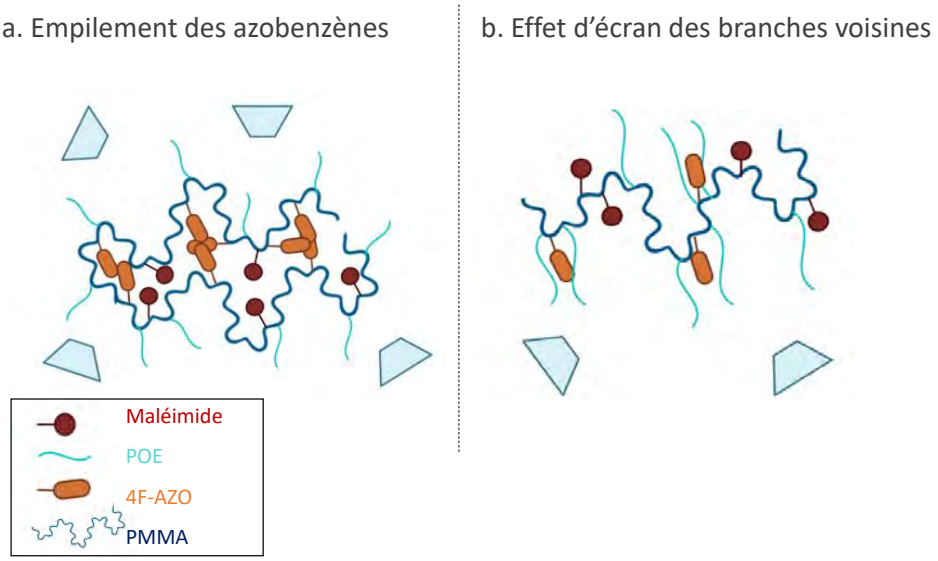


Figure 157 : Représentation schématique des hypothèses empêchant les azobenzènes fluorés greffés sur le terpolymère de complexer la β-CD dans l'eau.

Deux hypothèses ont pu être stipulées quant au fait que l'azobenzène ne puisse pas complexer la β-CD en milieu aqueux (Figure 157). D'abord les azobenzènes sont connus pour avoir la capacité de s'empiler par interactions π, lorsque leur géométrie est plane. Plusieurs azobenzènes ne pouvant pas complexer la β-CD, cela pourrait expliquer l'absence d'interaction. Une autre hypothèse a été que les longues chaines POE greffées au terpolymère pour lui procurer sa solubilité dans l'eau, puissent agir comme un « écran », entre les azobenzènes, greffés au bout de chaines plus courtes, et les cyclodextrines. Des expériences de NOESY ont montré que le terpolymère avait tendance à se replier dans l'eau en micelles unimoléculaires, permettant d'exposer le moins possible les groupements hydrophobes au solvant. C'est donc la présence d'un azobenzène très hydrophobe ainsi que d'un squelette polymère hydrophobe qui promeut l'auto-organisation du polymère dans l'eau et inhibe la complexation des azobenzènes par les β-CD solubles dans l'eau.

L'étape suivante de ce travail a été d'attester des propriétés de biocompatibilité et de ces hydrogels et de tester leur potentiel pour des applications en tant que porte-échantillon pour la microscopie photonique.

CHAPITRE 4

Propriétés de biocompatibilité d'hydrogels photo-stimulables

Des hydrogels aux caractéristiques mécaniques variées et proches de celles de la matrice extra-cellulaire cardiaque ont été synthétisés dans le chapitre précédent. Ils ont été conçus afin de servir de support à la culture cellulaire et l'encapsulation de tissus. Dans la dernière partie de ce manuscrit, nous nous sommes intéressés aux prérequis nécessaires à l'utilisation de ces gels pour des applications en biologie ainsi qu'à leur observation par les microscopies confocale et à feuille de lumière. L'utilisation d'hydrogels comme porte-échantillons implique que les gels eux-mêmes soient biocompatibles, car la présence de molécules cytotoxiques risquerait de provoquer de la souffrance cellulaire ou tissulaire non causée par la mécanique de l'hydrogel. Avant de pouvoir étudier l'influence des gels macromoléculaires sur un tissu, leur biocompatibilité a donc dû être évaluée. Tout d'abord, les protocoles d'évaluation de la biocompatibilité ont été mis au point avec des gels modèles d'agarose. Dans un deuxième temps, ce chapitre s'intéresse à l'évaluation de la biocompatibilité des hydrogels en présence de deux types cellulaires, dont des cellules cardiaques. L'encapsulation de tissus cardiaques de souris dans les gels et l'observation de ceux-ci par différentes techniques de microscopie ont ensuite été traitées. La microscopie confocale a permis d'imager des tissus marqués mais non fixés, et d'en visualiser la construction. La microscopie à feuille de lumière (SPIM) permet en général d'obtenir une image en trois dimensions d'échantillons épais, avec des temps d'analyses réduits. Les expériences présentées dans cette partie ont été réalisées en collaboration avec l'Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC, INSERM) pour la préparation de cellules, de biopsies, les tests de biocompatibilité et la microscopie confocale. L'imagerie au microscope à feuille de lumière est réalisée dans l'équipe STROMALab du laboratoire RESTORE.

I. Etude de gels modèles d'agarose

Cette partie décrit dans un premier temps l'influence de la rigidité de gels modèles d'agarose sur la biocompatibilité de cellules cardiaques. Deux lignées cellulaires distinctes ont été utilisées pour les protocoles d'évaluation de la biocompatibilité. La première lignée est celle des HEK 293T (cellules de rein embryonnaire humain), choisies pour leur disponibilité et pour leur robustesse, ces cellules sont beaucoup utilisées en recherche car elles sont faciles à cultiver et à transfecter[262]. La seconde lignée choisie est celle des H9C2 (cardiomyoblastes de rat) car elles sont issues du myocarde du tissu cardiaque, d'intérêt particulier dans ce travail. Cette seconde lignée a été utilisée dans un deuxième temps, pour évaluer la biocompatibilité des hydrogels macromoléculaires.

I.1. Sensibilité des cellules à la rigidité de la matrice extra-cellulaire

Dans le cœur, les protéines de la MEC entourent et protègent les cellules qui composent le tissu cardiaque. La matrice cardiaque est une structure dynamique qui subit synthèse et dégradation, modifiant sa composition dans l'espace et le temps en réponse à des stimuli. La rigidité du tissu cardiaque subit d'importantes modifications pendant le début de la vie. Notamment, pendant son développement embryonnaire, la matrice cardiaque humaine se rigidifie, d'un module d'Young inférieur à 0,2 kPa, sa rigidité physiologique atteint les 20 kPa à la naissance[263]. Le modèle de la souris est pertinent pour l'étude de l'influence de la rigidité sur le comportement du tissu cardiaque. En effet, les propriétés mécaniques du tissu murin sont tout à fait similaires à celles des tissus humains. Il a été montré que la rigidité de surface de ce tissu cardiaque sain est centrée autour de 18 kPa alors qu'un infarctus du myocarde entraîne son augmentation jusqu'à des valeurs centrées autour de 28 kPa[264].

Les conséquences de la rigidité de la matricielle sur les comportements de cellules cardiaques ont déjà été mises en évidence. Par exemple, Shapira-Schweitzer *et coll*. ont étudié l'organisation de cardiomyocytes néonatals de rats à l'intérieur de gel de fibrine-POE de module en cisaillement compris entre 8 et 340 Pa (soit un module d'Young entre 20 et 1000 Pa environ, comparable à la rigidité d'un tissu cardiaque néonatal)[265]. Après quatre semaines de culture sur ces gels mous, les auteurs ont remarqué que lorsque la rigidité matricielle augmentait, le nombre de cellules contractiles diminuait. De même, Jacot *et coll*. ont montré que la rigidité de gels de polyacrylamide pouvait influencer le développement de myocytes ventriculaires néonatal de rat[266]. Ce groupe a mis en évidence que les cellules évoluaient normalement sur des substrats aux propriétés mécaniques similaires à celle de la matrice cardiaque (E=10 kPa). En revanche, sur des substrats plus rigides ou plus mous, les cellules génèrent des forces contractiles plus faibles avec des transitoires calciques (impliquées dans la génération du rythme cardiaque) également plus faibles. L'étude de cellules et tissus cardiaques dans des matrices de synthèse dont la rigidité se situe dans les ordres de grandeurs mentionnés ici serait donc particulièrement intéressante. Certains travaux ont développé des hydrogels à gradient de rigidités, comprises entre 1 et 40 kPa, pour l'étude de celluleuse adipocytaires ou cardiomyocytaires humaines avec l'ambition d'apporter de nouveaux éléments à la compréhension des mécanismes liant rigidité matricielle et comportements des cellules souches[267,268].

Une étude de viabilité de cellules en fonction du module mécanique de la matrice environnante

a été menée en utilisant tout d'abord un gel modèle. Pour cela nous avons choisi l'agarose car il est utilisé depuis longtemps en biologie pour sa perméabilité à l'oxygène et aux nutriments ainsi qu'à sa biocompatibilité[269,270]. L'agarose a notamment été utilisé dans des applications de thérapie cellulaire pour la cardiomyopathie. Mayfield *et coll*. ont développé des gels d'agarose pour l'encapsulation de cellules souches cardiaques. Ils montrèrent que, comparé à l'injection de cellules en suspension, les capsules d'agarose à 3% massique, enrichies avec des protéines clés de la MEC amélioraient la viabilité, la prolifération et la conservation des mécanismes de survie des cellules souches cardiaques lors de leur injection *in vivo* [271]. Le contrôle de la gélation de l'agarose par la température, sans agent de réticulation cytotoxique ainsi que le contrôle de ces propriétés mécaniques par sa concentration sont d'autres avantages de ce polysaccharide, qui l'ont désigné pour cette étude.

L'idée de tester la biocompatibilité de cellules en présence de gels d'agarose aux rigidités croissantes a été réfléchie. Cette expérience devait initialement être effectuée en 3D en étudiant le comportement de sphéroïdes de H9C2 encapsulés dans ces gels d'agarose. Les aléas du projet ont empêché la mise en place de cette expérimentation. Mettre les cellules au contact des gels d'agarose en 2D a également été envisagé. Cependant, le modèle s'écarterait trop de la réalité *in vivo*. De plus, l'agarose étant un polysaccharide auquel les cellules n'adhèrent pas, elles n'auraient certainement pas été sensibles à un changement de rigidité de ce support. La relation entre pourcentage massique d'agarose (« low melting ») en solution et le module d'Young du gel résultant a cependant été étudié afin d'en savoir plus.

I.2. Caractérisation mécanique de gels d'agarose de différentes rigidités

L'agarose est déjà un système bien connu, biocompatible et souvent utilisé pour l'imagerie du vivant. Il a été montré que plus la quantité d'agarose était élevée en solution, plus le gel était rigide[272]. Deux gammes de modules d'Young sont en particulier recherchées pour ces études : autour de 5kPa et supérieur 15kPa. De nombreuses études ont déjà étudié l'effet de la rigidité matricielle variant de 10 à 100 kPa sur les phénotypes cellulaires. Cependant, plusieurs types cellulaires sont sensibles à des variations de module de bien plus faible amplitude lorsqu'elles sont cultivées en 3D. Plusieurs gels d'agarose à différentes concentrations en agarose (« low melting ») ont été préparés par dissolution à 70 °C de l'agarose dans de l'eau ou dans du PBS. Après refroidissement et gélification, les modules d'Young de ces gels sont mesurés en compression.

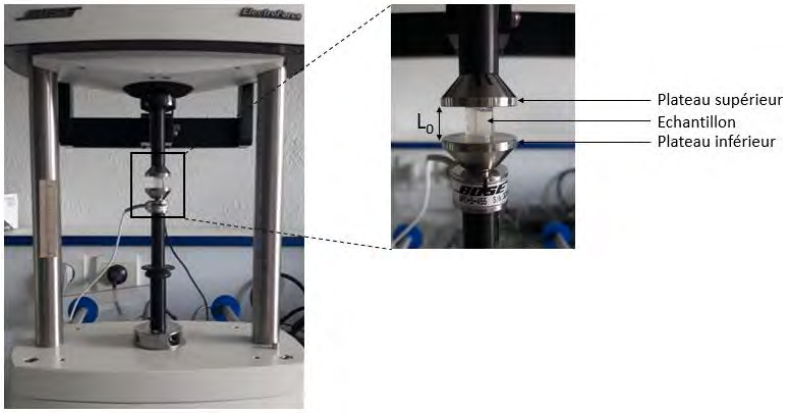


Figure 158 : Photographie de la machine de test en compression avec montage d'un échantillon entre les deux plateaux.

Des gels entre 0,5% et 1,75% en masse d'agarose dans l'eau et dans le PBS sont synthétisés et testés en compression (Figure 158). La courbe de la contrainte appliquée à l'échantillon en fonction de sa déformation σ=f(ε) est tracée pour chaque gel. Le module d'Young est obtenu comme la pente à l'origine de cette courbe (Figure 159).

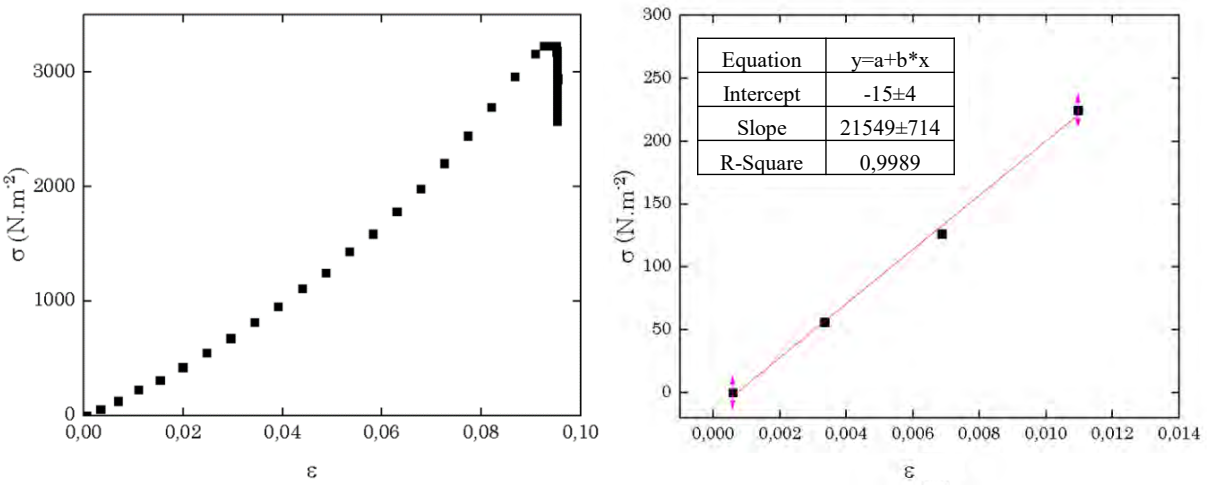


Figure 159 : Courbe contrainte-déformation pour un gel d'agarose dans le PBS et détermination du module d'Young comme la pente de la régression linéaire faite sur les quatre premiers points de cette courbe.

La Figure 160 montre les résultats obtenus pour le module d'Young en compression de gels 1) synthétisés dans l'eau puis laissés gonfler dans l'eau après leur complète gélification et 2) synthétisés dans le PBS et mesurés au démoulage. Les valeurs moyennes de modules de ces gels en fonction du pourcentage massique en agarose sont en accord avec la littérature[233,272], il y a bien une augmentation du module avec la concentration massique en agarose.

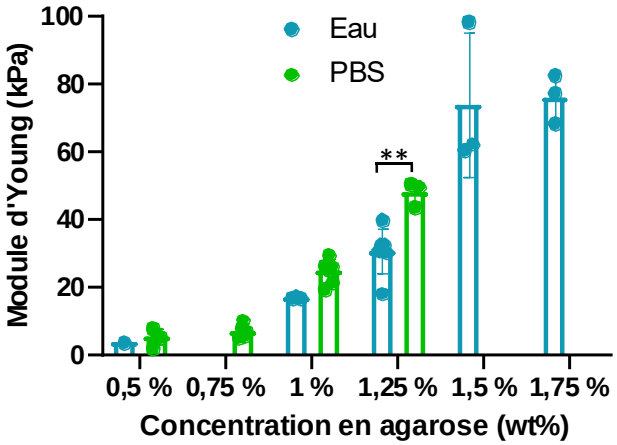


Figure 160 : Module d'Young (E) évalué en compression de gels d'agarose à différents pourcentages massiques synthétisés dans l'eau et laissés gonfler dans l'eau ou synthétisé dans le PBS et mesurés au démoulage. Les barres d'erreur représentent l'écart type sur la distribution des valeurs.

Normand *et coll*. ont par exemple fait une étude similaire avec deux types d'agarose, l'un à haute viscosité et l'autre à faible viscosité[233]. Leurs résultats en compression pour des gels compris entre 0 et 2,5% massique d'agarose sont renseignés dans le Tableau 32. Ils soulignent que le type d'agarose, essentiellement sa masse molaire, utilisé influence de façon non négligeable les propriétés mécaniques de ces gels, pour une même concentration massique en agarose. Par exemple, pour un gel à environ 1,10% d'agarose, les auteurs ont mesuré un module de 14 kPa pour un gel d'agarose à faible viscosité et à 76 kPa pour un gel d'agarose à haute viscosité. Dans notre cas, les gels d'agarose à 1% synthétisés dans l'eau ont des modules aux alentours de 17 kPa, qui augmente avec la concentration en agarose, ce qui est cohérent avec l'étude de Normand *et coll.*

% massique	Haute viscosité	Faible viscosité
0,48	-	1,5
0,79	-	5,3
1,08	76	-
1,12	-	14
1,60	-	38
2,18	235	-

Tableau 32 : Modules élastiques de gels d'agarose exprimés en kPa et mesurés en compression par Normand et al. en fonction du pourcentage massique et du type d'agarose sur 8 réplicats au moins[233].

Des gels avec un pourcentage massique d'agarose entre 0,5 et 1,25% sont également synthétisés

dans le PBS et mesurés en compression directement après leur démoulage. Sur la Figure 160, il semble que les gels synthétisés dans le PBS soient plus rigides que leurs homologues du premier lot. Par exemple, un gel à 1% synthétisé dans le PBS a un module de 25 kPa environ ce qui est toujours en accord avec les valeurs trouvées par Normand *et coll*. cependant plus élevées que les valeurs trouvées dans l'eau, d'après un test de Student réalisé sur les résultats à 1,25%. Pour ce pourcentage massique, la différence entre gel synthétisé et gonflé dans l'eau est significative par rapport aux gels synthétisés dans le PBS. Ce phénomène peut trouver son explication dans l'effet du gonflement car les gels d'agarose peuvent gonfler (Q≈35%) en solution[240]. Cette augmentation de rigidité peut aussi être due à un effet « salting-out ». Il s'agit du fait que la présence de sels en solution diminue le nombre de molécules d'eau disponibles pour solubiliser l'agarose. La concentration apparente en agarose se trouve alors plus élevée que celle calculée sans la présence de sels.
Il semble ainsi que des gels entre 0.5% et 1,25%, dans l'eau et dans le PBS, soient adaptés à l'étude de cellules dans des milieux de rigidité 5kPa et 15kPa. Dès 1,25%, les gels synthétisés dans le PBS atteignent des modules supérieurs à 40 kPa, ces valeurs correspondent à la rigidité de tissus cardiaques atteints de fibrose. On a montré ici l'importance du solvant sélectionné et mis en avant que la présence de sels ont tendance à rigidifier la matrice d'agarose alors que le gonflement du gel dans l'eau a, lui, tendance à le ramollir.

Les propriétés mécaniques d'un gel d'agarose à 1% ont également été mesurées par AFM. Les mesures ont été réalisées avec un gel d'agarose à 1wt% dans l'eau sur une lame de verre. Un fin morceau de gel est découpé et fixé sur une lame de verre avec du vernis transparent. Un anneau de vernis est tracé autour du gel afin que l'eau ajoutée pour immerger le gel ne s'écoule pas sur la surface du verre. L'échantillon de gel est ensuite analysé par AFM en mode contact intermittent avec un levier MLCT-D (Brüker, Etats-Unis) k autour de 0,03 $N.m^{-2}$, portant une pointe pyramidale. Des courbes de forces sont enregistrées en dix zones afin d'avoir une vue d'ensemble de la rigidité du matériau. Plusieurs mesures sont réalisées sur chaque zone, soit en un seul point, soit sous forme de cartes de force. Programmer une carte de force permet de réaliser le nombre de mesures désiré sur une zone de dimensions définies, ici 256 mesures sur 10x10 μm^2.

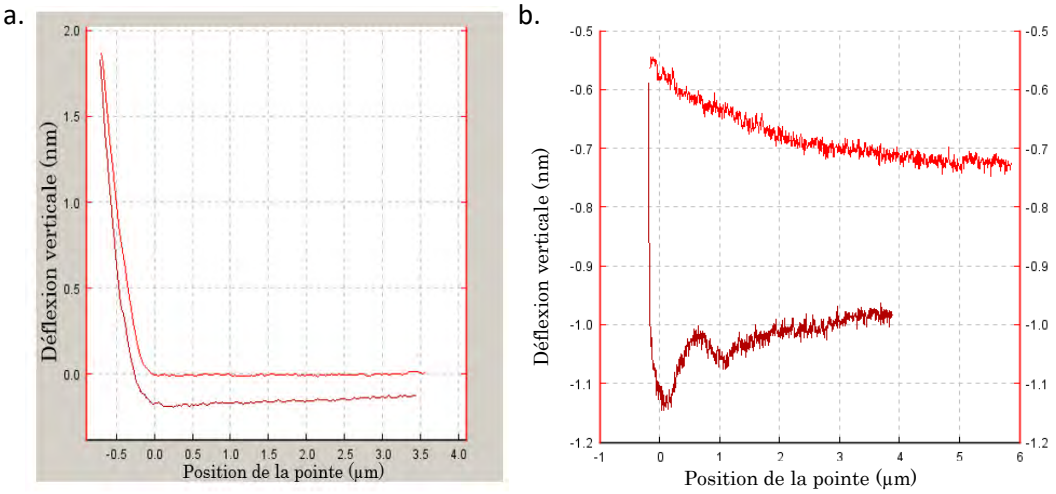


Figure 161 : Exemple d'une courbe de force traitée par le logiciel JPK Data processing représentant la déflexion verticale du levier au cours de l'approche de la surface du gel par la pointe dans a. de bonnes conditions de mesure et b. des conditions de forte adhésion.

Afin de remonter aux valeurs de modules d'Young du gel, les courbes de forces (Figure 161a.) sont modélisées en fonction de la géométrie de la pointe, du levier utilisé et de sa calibration. Certaines zones ne permettent pas de mesurer un module élastique à cause de la grande adhésion du gel à la pointe. Ce phénomène peut être également dû à la non planéité de l'échantillon, il empêche la pointe de se décoller du gel entre chaque mesure ce qui conduit à des courbes à l'allure de la Figure 161b. Ces zones ne sont pas prises en compte pour la détermination des propriétés mécaniques du gel d'agarose.

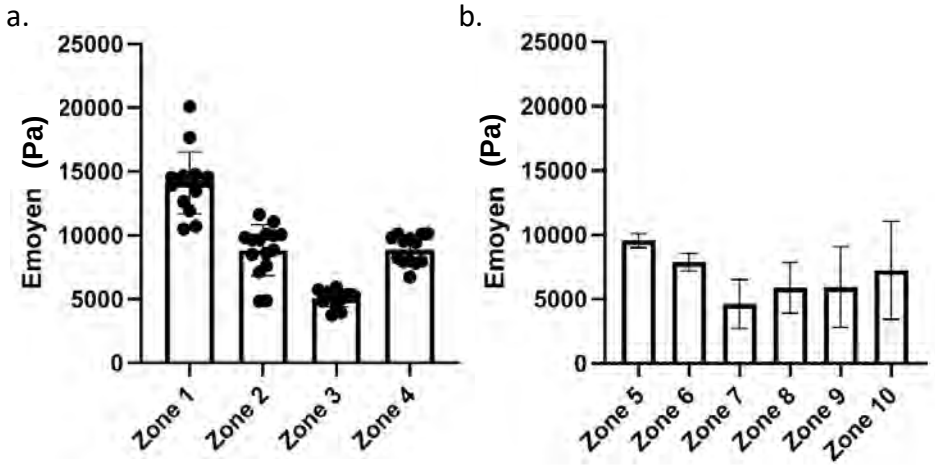


Figure 162 : Résultats de mesures du module d'Young d'un gel d'agarose à 1% par courbe de forces en AFM sur différentes zones du gel a. en prenant plusieurs mesures en un seul point de la zone choisie (entre 11 et 15 points expérimentaux par zone) et b. en réalisant une carte de force de 16x16 pixels sur 10x10 µm (entre 95 et 256 points expérimentaux par zone). Les barres d'erreurs représentent l'écart type standard de la distribution.

Les courbes de forces d'une même zone sont modélisées ensemble, en excluant les valeurs aberrantes (sur les cartes 7 et 9), et le module moyen en fonction de la zone est tracé Figure 162. Le gel semble posséder des zones de rigidité un peu différentes. Il est possible que ce gel possède des inhomogénéités, dans le cas ou des cristaux d'agarose solide ne se seraient pas bien dissouts avec le chauffage, entraînant la présence de zones plus rigides que d'autres. La modélisation de courbes de force de matériaux mous peut être particulièrement source d'imprécisions. En effet, lors de l'enregistrement de courbes de force sur des matériaux mous, on observe que celle-ci ont des courbures moins nettes que sur des matériaux plus rigides. Un choix doit être fait au moment de la modélisation quant à la partie de la courbe qui permet d'extraire le module du matériau. La Figure 163 montre l'exemple d'une courbe extraite de la zone 4, où l'on peut constater qu'au cours de l'indentation, la pointe AFM rencontre un matériau de plus en plus rigide. On peut repérer 3 portions de rigidité différentes modélisées par les segments noir, bleu et vert représentant respectivement les portions, très molle en surface du matériau, intermédiaire entre 400 et 600 nm de profondeur et plus rigide au-delà de 700 nm de profondeur. Une attention sera portée à essayer de modéliser au mieux les portions intermédiaires et en profondeur, lorsque cela est possible. Il n'est cependant pas aisé de sélectionner la même section pour chaque courbe de force et cela peut mener à d'importantes incertitudes.

La mesure de trois gels d'agarose à 1% en compression a donné un module d'Young moyen de 17 kPa. Il semble donc que le module de compression mesuré corresponde plutôt à la valeur de E dans la masse de l'échantillon. Le fait que la pointe AFM ne pénètre qu'une faible épaisseur d'un échantillon gonflé d'eau sous évalue peut-être la valeur de E par rapport à la mesure en compression.

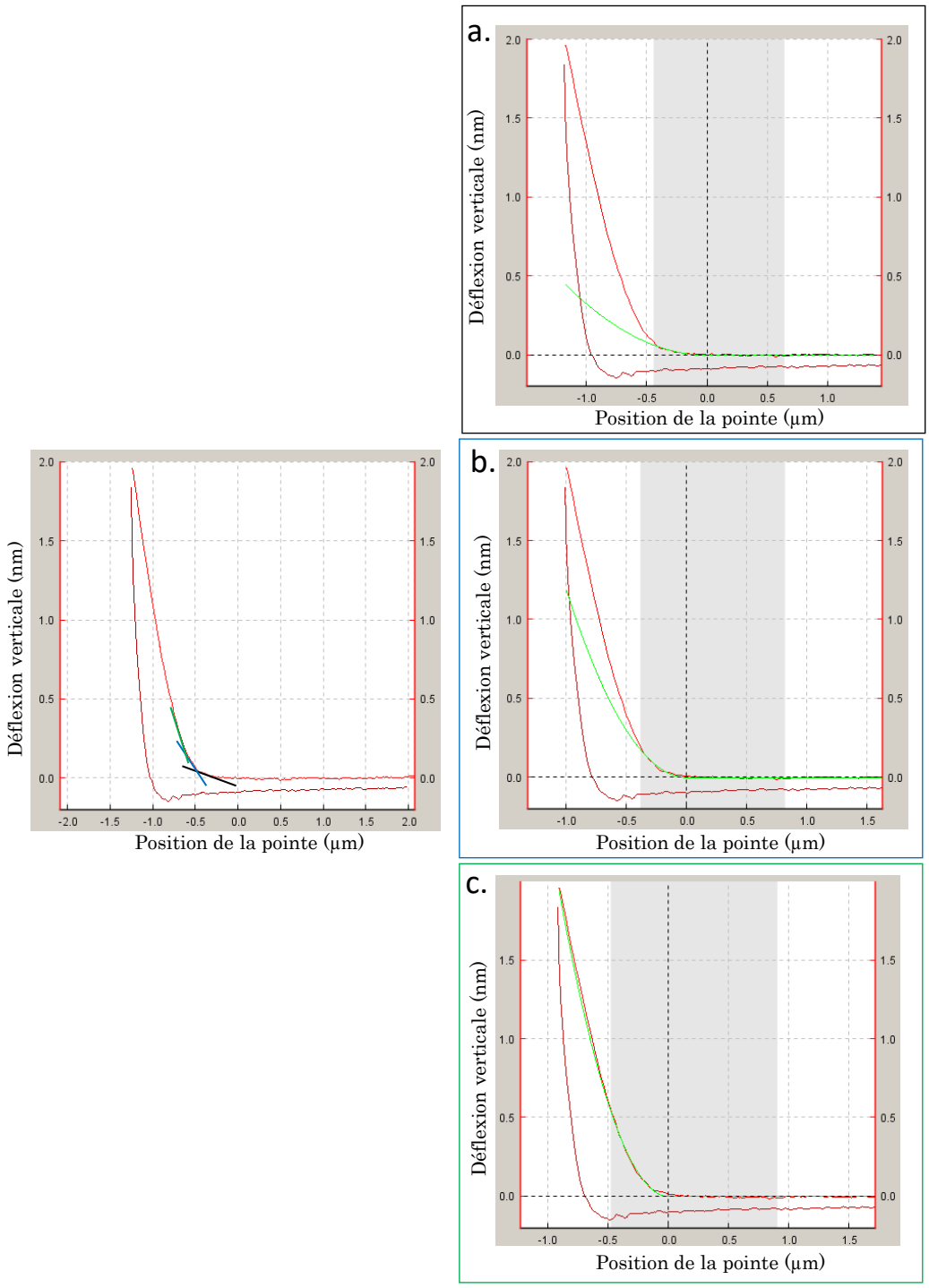


Figure 163 : Captures d'écran du logiciel JPK Data processing montrant comment une courbe de force de la zone 4 peut être modélisée de plusieurs manières en fonction de la profondeur d'indentation regardée. Dans les trois cas, la courbe d'approche est modélisée, la courbe d'adhésion n'étant pas prise en compte. Le cas a. modélise la rigidité de la surface de l'échantillon à environ 400 nm de profondeur, elle vaut 1,2 kPa. Le cas b. modélise la rigidité entre les profondeurs 400 et 600 nm qui vaut 4,4 kPa. Enfin le cas c. modélise la rigidité lorsque l'indentation dépasse les 700 nm de profondeur dans le gel, elle vaut 8,8 kPa.

L'agarose est connue pour son caractère biocompatible. Celui-ci a été testé avec un gel d'agarose « low-metling » au contact de cellules HEK 293T.

I.3. Agarose au contact de HEK 293T

Un test d'incubation a été réalisé mettant en contact un gel d'agarose à 1% et les cellules HEK 293T dans des puits de plaques de culture 6 puits. Après 24 et 48h, le contenu des puits est observé en microscopie à champs clair et comparé à des contrôles sans gel.

L'agarose n'est pas un matériau auquel les cellules adhèrent. La lignée de HEK 293T est incubée avec un gel d'agarose pour évaluer leur prolifération en présence d'un gel aux propriétés mécaniques proches de celles de nos hydrogels macromoléculaires. L'observation à 48h du puits de culture, en Figure 164, montre bien que les cellules n'adhèrent pas au gel d'agarose. En revanche, leur prolifération n'est pas affectée par la présence du gel d'agarose.

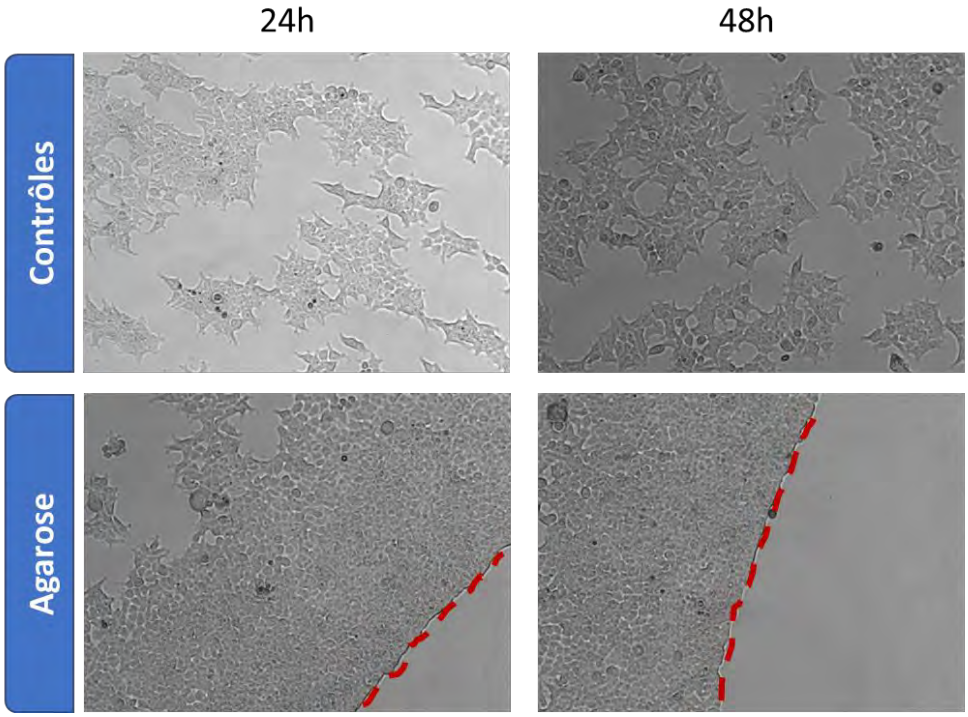


Figure 164 : Résultat des expériences de biocompatibilité d'un hydrogel d'agarose 1% lavé selon le protocole de « lavage long » observé par microscopie à champs clair. Lignée cellulaire : HEK 293T (50 000 cellules.mL^{-1}). Les tirets rouges représentent la limite de l'hydrogel dans le milieu de culture.

Ce gel d'agarose peut être considéré comme biocompatible et nono-toxique puisqu'il ne perturbe pas le comportement des cellules par rapport au contrôle.

I.4. Conclusion

L'agarose est un biopolymère capable de former un hydrogel physique en refroidissant.

L'agarose est biocompatible et a été utilisé comme support à la biologie dans de très nombreuses études, notamment au service de l'ingénierie tissulaire des cartilages[240,269]. Les propriétés mécaniques des hydrogels d'agarose dépendent de plusieurs paramètres. La concentration en agarose est le paramètre qui affecte le plus les propriétés mécaniques du gel final. Cependant, pour une même concentration, des écarts de propriétés ont été observés en comparant des gels d'agarose de masses molaires différentes[233], aux vitesses de réticulation ou à l'histoire thermique[273] différentes. Nous avons observé ici que la présence de sels dans le solvant pouvait également jouer un rôle dans les propriétés mécaniques finales des gels d'agarose.

L'étude de ces gels modèles a permis la mise en lumière de biais inhérents aux mesures de propriétés mécaniques des hydrogels. On soulignera l'importance de la géométrie de l'échantillon, autant pour les mesures de compression où les faces supérieures et inférieures des gels doivent être planes et parallèles, qu'en AFM où l'échantillon doit être plan. En AFM, des incertitudes peuvent également survenir sur un même échantillon en fonction de la méthode de modélisation. L'utilisation d'une même procédure automatisée pour analyser un même lot de courbes aura donc été préféré pour ces analyses. L'utilisation de gel d'agarose a également permis de mettre au point un premier protocole pour les études de biocompatibilité. L'étape suivante a été de déterminer la biocompatibilité des gels macromoléculaires contenant 4F-AZO et β-CD.

II. Biocompatibilité des gels macromoléculaires

Dans un premier temps, l'objectif fixé a été la synthèse de deux gels de rigidité respectives de 5 kPa et supérieure à 15 kPa afin de mimer les conditions néonatales et physiologiques du tissu cardiaque. On envisage également l'étude future d'échantillons cardiaques dans un environnement très rigide, type fibreux. Nous avons vu dans le chapitre précédent, qu'il était possible d'obtenir des hydrogels macromoléculaires aux propriétés mécaniques variables dans cette gamme de rigidité. Même si ces gels ne répondent pas à la lumière par un changement dans leurs propriétés mécaniques, il reste néanmoins intéressant d'aller au bout du travail et de voir s'il est possible d'utiliser ces gels comme capsules pour l'observation ou la conservation de tissu cardiaque. La première étape a été d'évaluer la compatibilité avec deux lignées cellulaires. Des hydrogels macromoléculaires inspirés de la formulation 12 du second plan d'expériences et contenant toutes les composantes décrites dans le chapitre 3 sont synthétisés à pH4,2 afin de réduire la cinétique de prise du gel et d'obtenir un matériau homogène. Le module

de compression de gels de cette formulation une fois gonflée dans l'eau a été mesuré et vaut 8,3 kPa. Les gels sont formés directement au fond de plaques 6 puits par mélange d'une solution mère de mélange terpolymère/β-CD et d'une solution mère de thiol. Les gels sont laissés prendre jusqu'à ce qu'ils ne s'écoulent plus puis sont lavés selon deux protocoles de lavage, un « lavage court » et un « lavage long » (cf Partie Expérimentale). Afin d'évaluer le relargage potentiel de molécules toxiques venant des gels, les milieux de lavage ont été récupérés et utilisés pour l'incubation de cellules HEK 293T et H9C2. Puis, des cellules de ces deux mêmes lignées sont mises en contact de l'hydrogel lavé et sont incubées pendant 4 jours. Les cellules dans le milieu de lavage conditionné puis au contact des gels sont observés au microscope à champs clair toutes les 24h et comparés au puits témoin ne contenant pas de gel.

II.1.Incubation avec le milieu de lavage conditionné

Une fois les gels préparés au fond de plusieurs puits d'une plaque 6 puits, ils sont incubés dans le PBS puis dans le milieu de culture, selon les deux protocoles de lavage, long (4,5h) et court (2,25h). Le milieu de lavage conditionné est ensuite utilisé comme milieu de culture de H9C2 et HEK 293T. Le développement des deux lignées est observé dans le milieu conditionné est comparé au développement des mêmes cellules dans du milieu vierge pendant 4 jours.

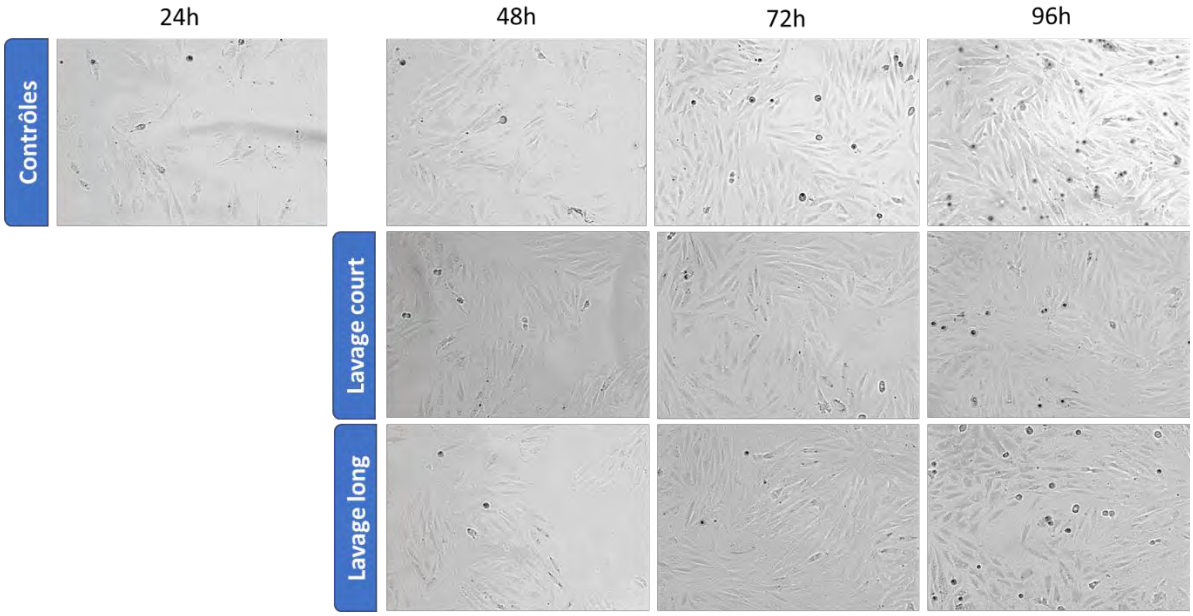


Figure 165 : Résultats des expériences de biocompatibilité du milieu conditionné après les protocoles de « lavage court » et de « lavage long » observé par microscopie à champ clair. Lignée cellulaire : H9C2 (45 000 cellules.mL^{-1}).

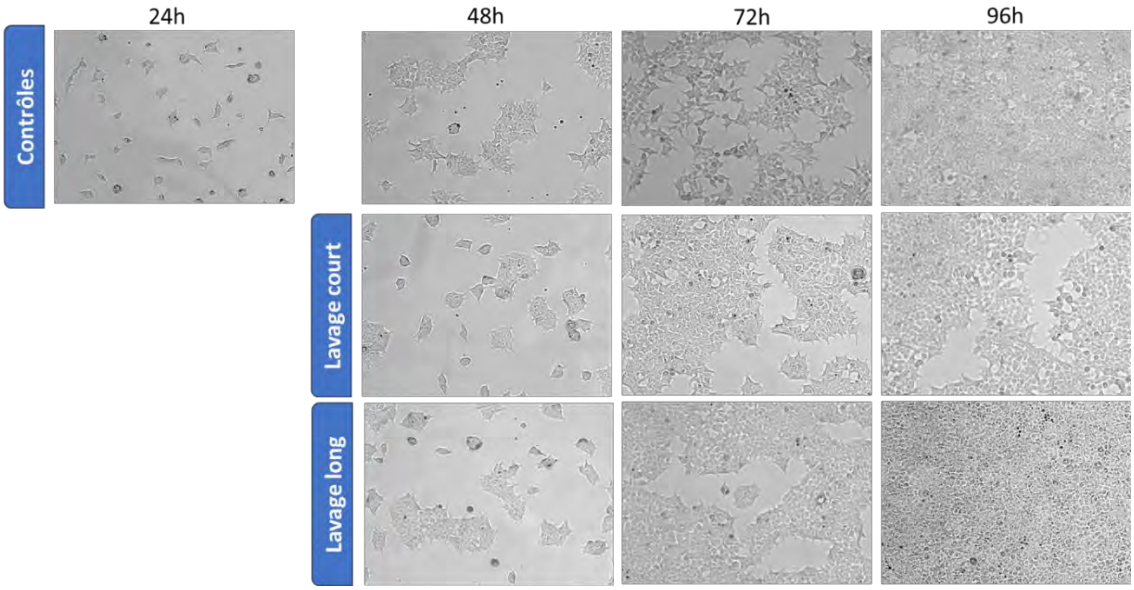


Figure 166 : Résultats des expériences de biocompatibilité du milieu conditionné après les protocoles de « lavage court » et de « lavage long » observé par microscopie à champ clair. Lignée cellulaire : HEK 293T (50 000 cellules.mL^{-1}).

En comparant aux contrôles, on remarque que la présence de milieu de lavage des hydrogels ne perturbe pas le comportement de H9C2 en culture (Figure 165), ni des HEK 293T (Figure 166). On peut donc conclure, qu'au cours de leurs lavages, les hydrogels ne relâchent pas de molécules cytotoxiques dans le milieu.

II.2.Incubation directe au contact de l'hydrogel après lavage

Une fois lavés, les gels dont le milieu de lavage a été précédemment utilisé, sont immergés dans du milieu contenant des cellules des deux lignées cellulaires déjà mentionnées.

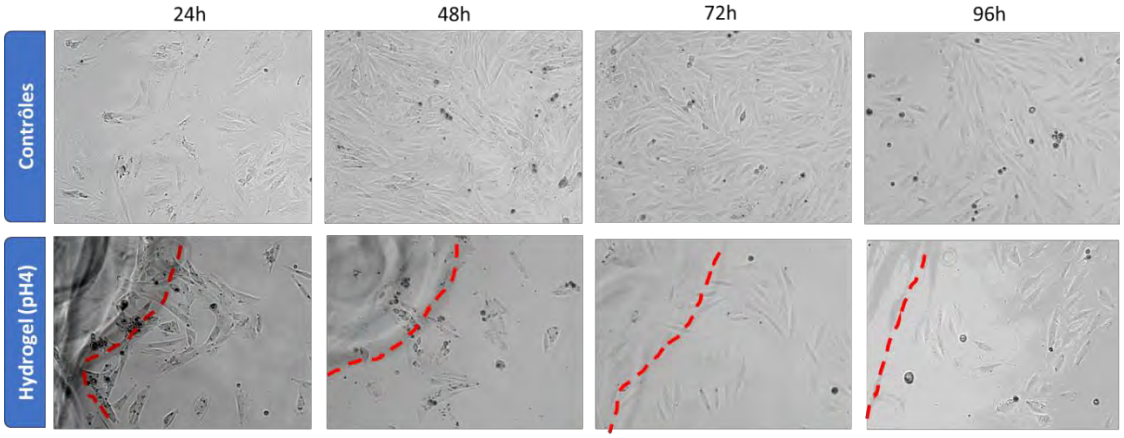


Figure 167: Résultats des expériences de biocompatibilité d'un hydrogel formulé à pH=4,2 puis lavé selon le protocole de « lavage court » observé par microscopie à champ clair. Lignée cellulaire : H9C2 (45 000 cellules.mL^{-1}). Les tirets rouges représentent la limite de l'hydrogel dans le milieu de culture.

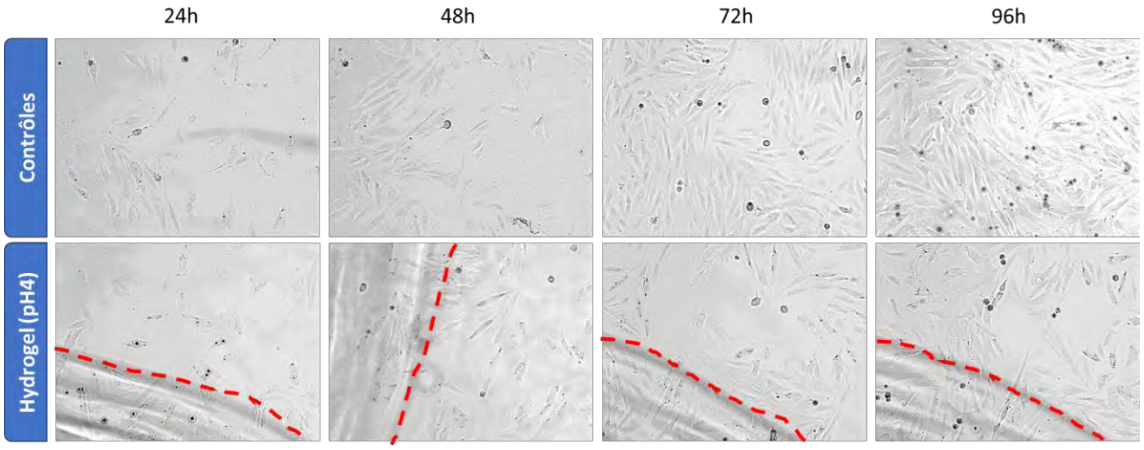


Figure 168: Résultats des expériences de biocompatibilité d'un hydrogel formulé à pH=4,2 puis lavé selon le protocole de « lavage long » observé par microscopie à champ clair. Lignée cellulaire : H9C2 (50 000 cellules.mL^{-1}). Les tirets rouges représentent la limite de l'hydrogel dans le milieu de culture.

Avec la lignée H9C2, les résultats du protocole « lavage court » (Figure 167) montrent un développement de cellules autour du gel. Par rapport au contrôle, il semblerait que 1) la prolifération soit ralentie ou 2) que la mort cellulaire soit accélérée au contact de l'hydrogel. Ce phénomène ne peut pas être dû à la présence de molécules cytotoxiques relarguées par le gel car nous avons montré dans la partie précédente que la composition du milieu de lavage n'entrainait pas de différence par rapport au contrôle. De plus, un deuxième protocole contenant plus de lavages a été mis en place et permet d'observer le même phénomène. On remarque de plus, que la morphologie de ces cellules en présence de gel est aplatie et allongée similaire au contrôle, signe d'une prolifération saine[274]. L'hypothèse d'une accélération de la mort cellulaire est donc écartée. Les résultats du second protocole de lavage sont rassemblés en Figure 168. Il semble que la prolifération des cellules soit meilleure à 96 h dans le protocole de « lavage long » par rapport au contrôle que dans le protocole de « lavage court ». Ce protocole de « lavage long » est donc validé. Il semble finalement que, sans être cytotoxique, la présence de gel non-adhérent dans le fond du puits, ralentisse légèrement la croissance des H9C2.

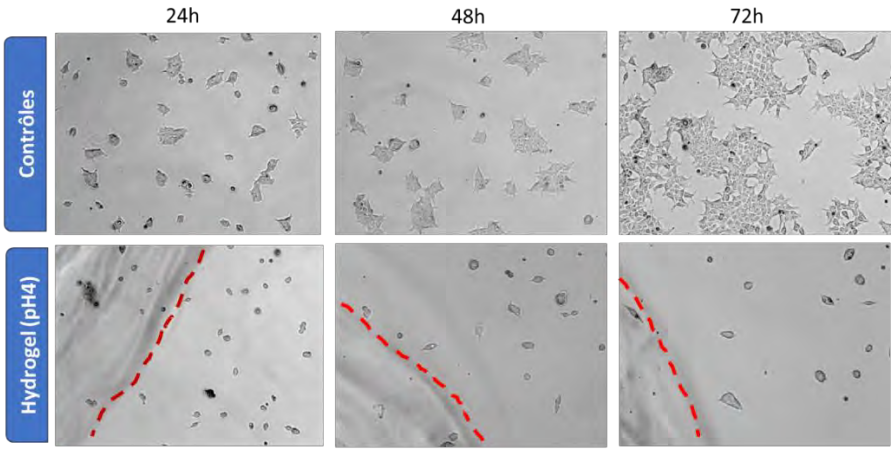


Figure 169 : Résultats des expériences de biocompatibilité d'un hydrogel formulé à pH=4,2 puis lavé selon le protocole de « lavage court » observé par microscopie à champ clair. Lignée cellulaire : HEK 293T (50 000 cellules.mL^{-1}). Les tirets rouges représentent la limite de l'hydrogel dans le milieu de culture.

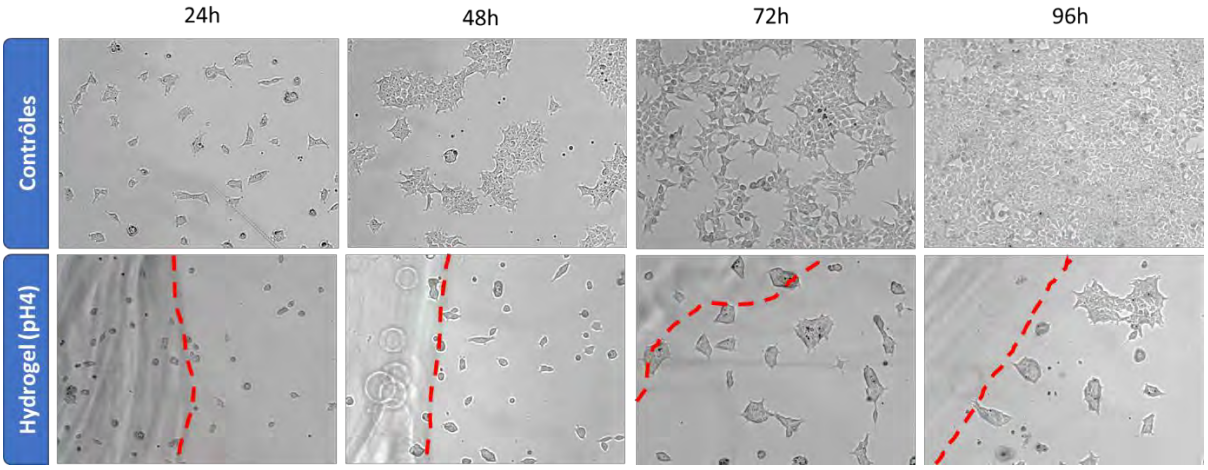


Figure 170 : Résultats des expériences de biocompatibilité d'un hydrogel formulé à pH=4,2 puis lavé selon le protocole de « lavage long » observé par microscopie à champ clair. Lignée cellulaire : HEK 293T (50 000 cellules.mL^{-1}). Les tirets rouges représentent la limite de l'hydrogel dans le milieu de culture.

Dans le cas de la lignée HEK 293T, la présence d'hydrogel semble induire une cytotoxicité au contact du gel à 24 et 72h dans le cas du lavage court. Avec le protocole de « lavage long », les cellules semblent reprendre une croissance ralentie après 72 et 96h. Comme pour les H9C2, cette toxicité ne peut pas provenir de molécules présentes dans le milieu de lavage. En revanche, peut-être que l'inhibition de la croissance est due au propriétés mécaniques et non adhérentes du gel. Cependant, la présence d'un gel d'agarose à 1% n'avait pas affecté la croissance des HEK 293T dans une expérience précédente.

Notre gel est composé très majoritairement de POE qui a été largement utilisé pour la synthèse de polymères thermosensibles[84], de surfaces[275], ou d'hydrogels biocompatibles[155]. On s'attend

donc à ne pas trouver de toxicité induite par ces hydrogels. Notamment, Fu et Kao ont étudié le comportement de trois types cellulaires au contact de gel à base de POE formés par réaction maléimide-thiol[66]. Ils observèrent une conservation de la morphologie ainsi que l'absence d'adhérence des monocytes, des fibroblastes et des kératinocytes au contact avec l'hydrogel et des taux de viabilité à 48h d'environ 100%, 95% et 75 % respectivement par rapport au contrôle sans hydrogel. Ces résultats montrent bien que la viabilité des cellules au contact de ce type de gel peut être relative au type de cellule utilisé. De même, Zuluaga-Vélez *et coll.* ont montré que la culture de HEK 293 dans des puits contenant un hydrogel d'agarose rigide (E>200 kPa) endiguait complètement la croissance de ces cellules[276]. Les auteurs ont émis l'hypothèse que, l'agarose ne possédant pas les caractéristiques favorisant l'adhérence de ces cellules adhérentes, elles n'auraient pas la capacité à se développer normalement sur ce substrat. Dans notre cas, le gel n'occupe qu'une faible place au fond du puits, les cellules semblent d'ailleurs se développer normalement en périphérie éloignée de l'hydrogel. Il est donc possible que, la biocompatibilité d'hydrogels non-adhérent soit dépendante du type cellulaire étudié.

II.3.Conclusion

Les expériences d'incubation de cellules avec le milieu de lavage des gels puis directement à leur contact permettent de conclure que les hydrogels ne relarguent pas de molécules cytotoxiques dans le milieu de lavage. Les hydrogels macromoléculaires développés dans ce travail réticulent extrêmement rapidement et ne relâchent pas de molécules cytotoxiques dans leur milieu d'incubation. Ils peuvent donc être des candidats intéressants dans l'élaboration d'hydrogels injectables par exemple. Cependant, leur présence dans le milieu de culture de cellules en 2D semble inhiber la croissance des HEK 293T et ralentir la prolifération des H9C2. Le fait que ces gels non-adhérents soient en compétition avec le fond du puits qui est adhérent peut expliquer la différence de densité de cellules observée au contact du gel par rapport au contrôle. La culture en 2D est cependant très différente de la culture en 3D, l'étape suivante a donc été d'inclure un tissu cardiaque non fixé dans de tels hydrogels et d'imager son organisation par deux techniques de microscopie.

III.Imagerie de tissus cardiaques de souris encapsulés dans un hydrogel macromoléculaire

L'objectif de ce projet de thèse est le développement d'hydrogels permettant l'étude d'échantillons biologiques au cours de temps. Cela implique que les échantillons ne soient pas

fixés, afin qu'ils aient la capacité de détecter un stimulus extérieur et d'y répondre en adaptant leur comportement. Les gels doivent également être des portes-échantillons adaptés aux différentes techniques d'imagerie du vivant. Il existe peu d'exemples dans la littérature de telles études sur tissus vivants, non fixés. On se propose, dans cette partie, d'étudier le tissu cardiaque d'une souris encapsulé dans un hydrogel macromoléculaire, afin de déterminer si ces gels sont pertinents pour l'imagerie d'échantillons biologiques.

III.1.Organisation du tissu cardiaque

Le cœur est un organe compact, dont le fonctionnement dépend de la forte cohésion de son architecture tissulaire et de ses interactions cellulaires étroites. La structure de son tissu assure le fonctionnement mécanique et électrochimique de l'organe dans son ensemble. Les cellules musculaires du cœur, ou cardiomyocytes, schématisées en Figure 171, sont constamment exposés à des stimulations mécaniques, causées par la contraction du cœur[277]. Ces cellules diffèrent des autres cellules musculaires car elles sont mononuclées, plus courtes et liées entre elles par un disque intercalaire. L'inconvénient majeur de l'organisation du tissu cardiaque est qu'elle ne permet pas la régénération des cellules endommagées.

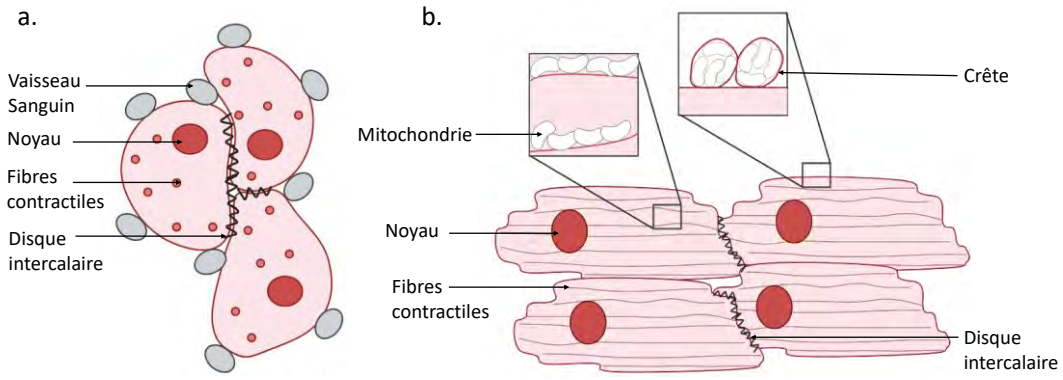


Figure 171 : Représentation schématique de a. une coupe transversale et b. une coupe longitudinale de cardiomyocytes voisins dans un tissu cardiaque. Réalisé avec BioRender.

Les cardiomyocytes sont remplis de fibres contractiles ou myofibrilles permettant leur contraction. Entre ces fibres se trouvent de très nombreuses mitochondries. L'activité contractile demande beaucoup d'énergie, apportée par une importante vascularisation du tissu.

III.2.Imagerie en microscopie confocale

La microscopie confocale est une technique de microscopie largement utilisée en biologie. Elle a été utilisée afin d'imager des biopsies de ventricule gauche de souris en absence et en présence de gels.

III.2.1.Principe de la microscopie confocale

La microscopie confocale est une technique de microscopie largement utilisée en biologie car sa très faible profondeur de champ (400 nm) lui permet de diviser un échantillon en tranches optiques de haute qualité. Les échantillons doivent être marqués par des fluorophores dont l'émission après excitation est captée par un photomultiplicateur. Pendant l'observation, la totalité de l'échantillon est soumise à l'illumination par la source de lumière. Contrairement à la microscopie à fluorescence, qui recueille la lumière émise par l'ensemble de l'échantillon, la microscopie confocale ne sélectionne que la fluorescence provenant du plan focal, ce qui limite considérablement le bruit et donne une très bonne résolution selon l'axe z[278].

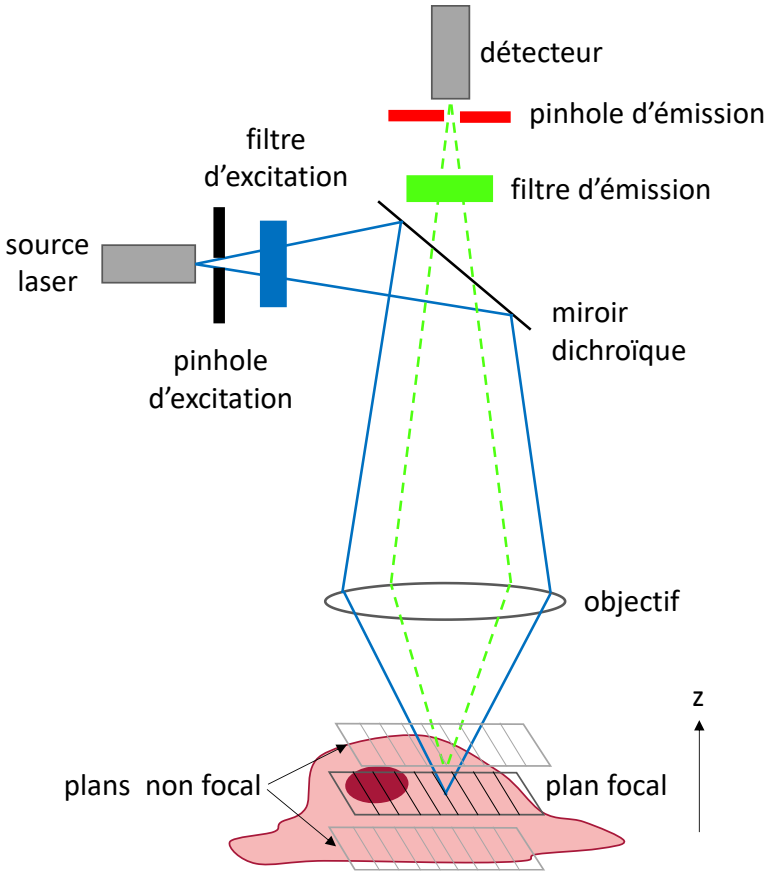


Figure 172 : Représentation schématique d'un microscope confocal.

L'observation de signaux fluorescents en microscopie confocale a lieu grâce aux éléments suivants : une source de lumière responsable de l'excitation (laser), un fluorophore sensible à la longueur d'onde d'excitation, des filtres qui séparent les photons d'émission des photons d'excitation et un détecteur qui enregistre l'émission et transforme ce signal lumineux en un signal électrique ou en une image photographique. Le détecteur peut être une caméra CCD haute sensibilité ou bien des photomultiplicateurs. Le microscope confocal utilise donc une

longueur d'onde qui excite directement un fluorophore présent dans l'échantillon à visualiser. De cette façon, de la fluorescence est émise depuis toute l'épaisseur de l'échantillon traversée par le faisceau laser. L'élément clé de ce microscopie confocal est la présence d'un pinhole d'émission, ou iris confocale, placé devant le détecteur. C'est cet élément qui permet d'éliminer la fluorescence provenant des plans non focaux et de donner à cette technique une aussi bonne résolution. L'image de microscopie confocale est construite point par point par illumination et détection de la fluorescence émise. L'obtention d'images fines et nettes peut donc demander des temps d'acquisition très longs. Ceci impose de longues expositions à la lumière, ce qui peut avoir des conséquences néfastes sur les échantillons biologiques, générant, soit de la cytotoxicité, soit la photo-dégradation des fluorophores[278].
La microscopie confocale a été utilisée dans cette étude afin d'observer un échantillon de biopsie de tissu cardiaque de souris encapsulé dans une goutte d'hydrogel macromoléculaire.

III.2.2.Résultats

Des biopsies de cœur battant de souris ont été prélevées et préparées comme décrit dans la partie expérimentale. Elles sont marquées avec trois marqueurs différents pour l'observation au microscope confocal. Les marqueurs choisis sont les suivants :

- le dichlorhydrate de dimidino-4',6-phénylindole-2 (DAPI, intercalant de l'ADN), excité par l'UV il émet du bleu au niveau des noyaux marqués,
- le Wheat Germ Agglutin (WGA), Alexa Fluor ™, excité à 488 nm, il marque les lectines des membranes plasmiques dont la membrane des cardiomyocytes par une fluorescence verte,
- Le Mitotracker™, excité dans le jaune, il marque les mitochondries des cellules vivantes en émettant dans le rouge.

Des solutions mères de terpolymère déprotégé et β-CD-m-POE et thiol sont préparées dans le PBS à 4°C. Après un temps dédié aux marquages, les biopsies conservées à froid sont déposées dans le puits d'une lame de verre. La formulation utilisée pour l'enrobage du tissu contient 1,5%m de peptide permettant de ralentir la réaction maléimide-thiol. Plusieurs gels sont ainsi coulés sur les biopsies avant la prise. Sur une seconde plaque, deux gels d'agarose sont coulés sur des biopsies également marquées. Il faut noter que lorsque l'agarose est déposée sur les biopsies, celle-ci est à une température avoisinant les températures biologiques, autour de 37-40 °C.

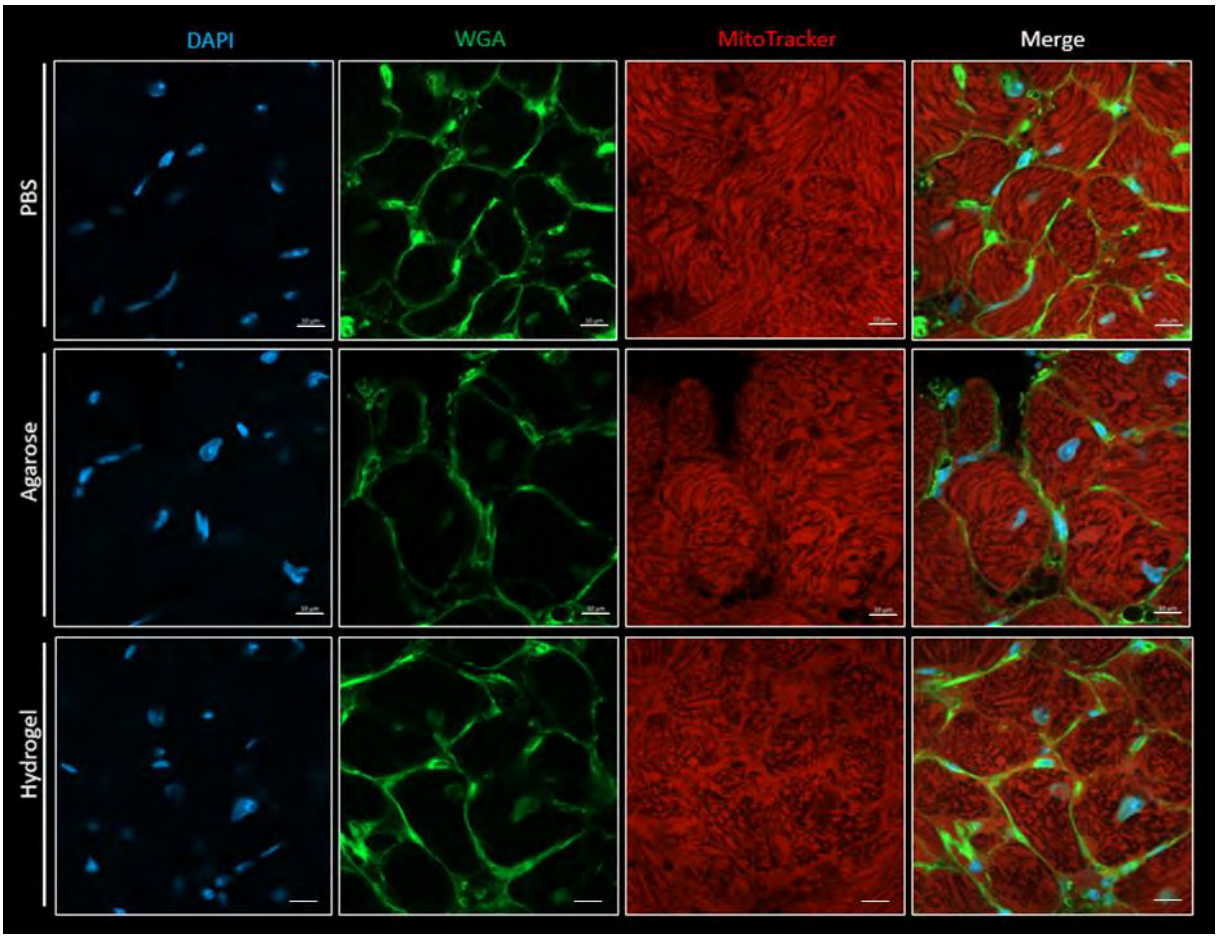


Figure 173 : Visualisation du ventricule gauche d'une biopsie cardiaque (coupe transversale) d'une souris C57Bl/6J vieille de 209 jours, après deux jours de marquage et son encapsulation dans un hydrogel synthétique à base de POE versus dans un gel d'agarose 1%. Visualisation par microscopie confocale LSM900, objectif 63X à huile, pinhole 46 µm, gain digital 1.0, taille d'image 1024 x 1024 pixels. Echelle : 10 µm.

La Figure 173 montre trois images de biopsies imagées depuis une solution de PBS (contrôle), un gel d'agarose et un hydrogel macromoléculaire. En comparant au contrôle, la présence de gels n'altère pas la qualité des images obtenues suite aux marquages et à l'observation au confocal. Les résultats montrent de très beaux marquages sur les biopsies vues au travers des gels. Les hydrogels ne sont donc pas un frein à l'observation de tissus cardiaques en microscopie confocale.

On peut remarquer sur les images de la biopsie contenue dans l'agarose que certaines cellules perdent le contact. Certaines membranes semblent être altérées, comme le montrent les trous noirs visibles entre les cellules, signe d'une souffrance tissulaire. De tels dommages ne sont pas visibles sur les biopsies contenues dans les gels à base de terpolymère/β-CD-m-POE. Le caractère biocompatible de l'agarose étant reconnu, il semble raisonnable de penser que c'est le contact à chaud avec la solution d'agarose qui a endommagé le tissu, à moins qu'il ne s'agisse

d'un dommage causé lors de la découpe de la biopsie. Il est possible que le réchauffement du tissu ait accéléré son processus de dégradation. Il est donc avantageux d'avoir développé un gel qui peut réticuler rapidement à froid.

L'utilisation d'hydrogel pour l'encapsulation de biopsies cardiaques de souris permet donc d'imager la structure du tissu en microscopie confocale sans altération ni aberrations optiques. Des images en trois dimensions ont également été enregistrées grâce à la microscopie confocale (Figure 174). L'image du tissu est de qualité similaire à celle obtenue en l'absence de gel mais le modèle est plus proche de l'environnement naturel du tissu, rigide en trois dimensions. La comparaison avec un hydrogel qui gélifie par refroidissement montre que pouvoir former un hydrogel rapidement, à froid, est un réel avantage afin de prolonger la cohésion tissulaire.

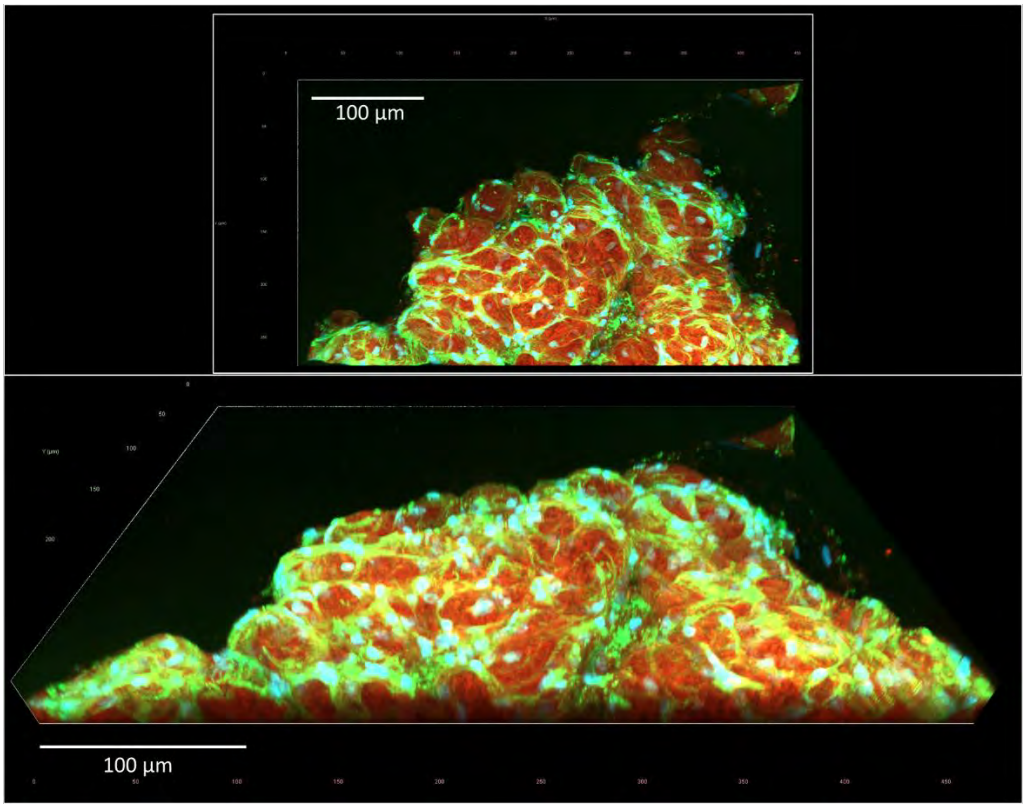


Figure 174 : Visualisation du ventricule gauche d'une biopsie cardiaque (coupe transversale) d'une souris C57Bl/6J vieille de 209 jours, après 2 jours de marquage et son encapsulation dans un hydrogel synthétique à base de POE. Visualisation par microscopie confocale LSM900, objectif 63X à huile, pinhole 46 µm, gain digital 1.0, taille d'image 4711 x 2867 pixels

La microscopie confocale a cependant certains désavantages pour l'imagerie d'échantillons vivants et sensibles. En effet, comme la majeure partie de la lumière réémise par l'échantillon est bloquée avant d'arriver sur l'analyseur, l'échantillon doit être exposé à une radiation très

intense. Une telle intensité lumineuse peut entrainer du photoblanchiment et une phototoxicité importante. La microscopie à feuille de lumière s'est peu à peu distinguée comme une méthode de choix pour l'imagerie d'échantillons biologiques en 3D. En particulier, cette méthode n'induit pas de photodégradation et ses temps d'acquisitions sont plus courts que pour la microscopie confocale.

III.3.Imagerie en microscopie à feuille de lumière (SPIM)

La microscopie à feuille de lumière ou SPIM (« Selective Plane Illumination Microscopy ») est une technique puissante permettant l'imagerie en 3D d'échantillons de grande taille pendant des temps longs. Elle a été utilisée ici pour l'observation d'une biopsie de tissu cardiaque de souris encapsulé dans un hydrogel à 17%m de polymère contenant du terpolymère, de la β-CD-m-POE et du tétrathiol, préparé dans le PBS comme décrit en partie expérimentale.

III.3.1.Principe et histoire du SPIM

Le principe de la microscopie à feuille de lumière est l'illumination d'un échantillon avec un faisceau, en forme de feuille mince, tel que seule une section plane de même épaisseur que la feuille de lumière soit excitée (Figure 175). La fluorescence émise par cette section de l'échantillon est collectée par un objectif de détection orthogonal à la feuille de lumière et enregistrée par une caméra. L'échantillon est ensuite déplacé sur son axe vertical et l'accumulation des images collectées à plusieurs hauteurs permet la reconstruction d'une image en trois dimensions de l'échantillon. Avec cette méthode, aucun plan non focal n'est stimulé et donc aucune lumière émise n'a besoin d'être filtrée. Cela permet d'atteindre des rapports signal sur bruit très élevés, gage d'une bonne qualité de l'image, et limite la phototoxicité[279].

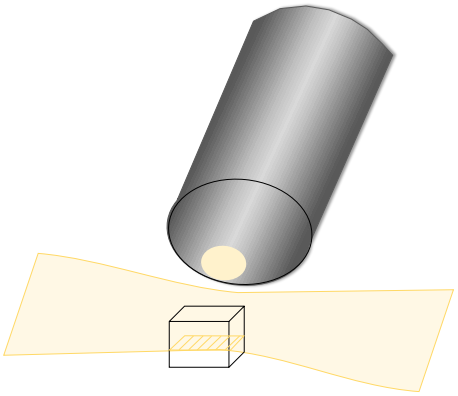


Figure 175 : Schéma d'une feuille de lumière traversant un échantillon sur une section plane.

Le premier microscope utilisant l'excitation par feuille de lumière a été mis au point par Voie *et coll*. en 1993[280], mais le SPIM est né en 2004, développé par Huisken *et coll*. pour l'imagerie

in vivo de muscles chez le poisson Medaka génétiquement modifié[281]. Les auteurs montrèrent aussi la pertinence du SPIM pour l'observation *in vivo* de l'embryogénèse de la *Drosophila melanogaster*, pourtant relativement opaque. Depuis lors, la communauté scientifique a cherché à développer des technologies toujours plus poussées afin d'augmenter la résolution ainsi que la vitesse qu'acquisition.

III.3.2.Résolution et vitesse d'analyse du SPIM

Dans l'optique d'étudier des phénomènes rapides ayant lieu à petite échelle, la recherche s'est intéressée à la conception de systèmes permettant d'atteindre de hautes résolutions et des temps d'analyses les plus courts possibles.

Un problème typique dans la conception d'instrument de haute résolution est la contrainte technique du placement de l'objectif. Les objectifs ayant la meilleure résolution travaillant à courte distance, ils doivent être placés très près de l'échantillon. Les objectifs d'illumination et de détection étaient placés de façon orthogonale l'un à l'autre, il était souvent impossible de les placer trop près des échantillons. Travailler avec des objectifs à plus longues focales a longtemps limité la résolution axiale, souvent critique, ce qui a forcé de nombreux groupes à trouver des alternatives, notamment en modifiant la géométrie de leurs systèmes. Par exemple, Gebhart *et coll*. ont développé un système à feuille de lumière réfléchie permettant l'agencement des objectifs l'un face à l'autre, grâce à un système de miroirs (Figure 176)[282].

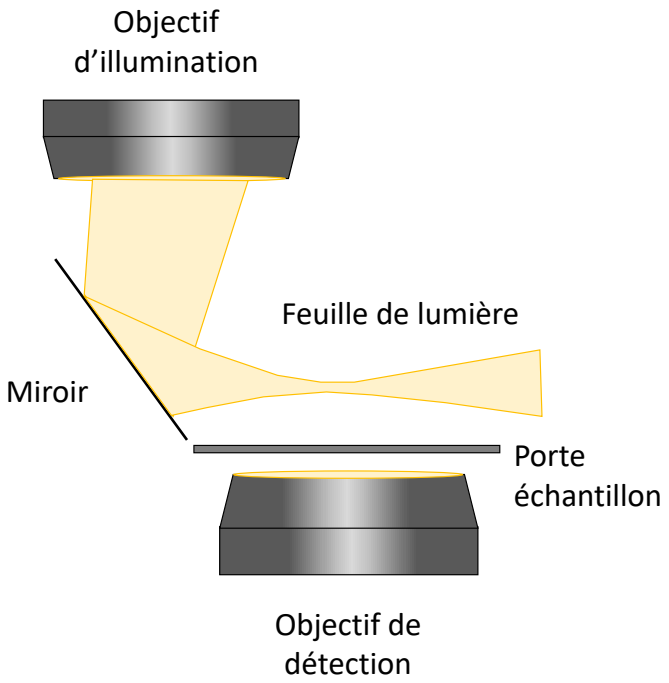


Figure 176 : Schéma du principe d'illumination à feuille de lumière réfléchie.

L'introduction de feuille de lumière oblique a ainsi gagné en notoriété. Cependant, elle introduit une perte de résolution puisqu'une partie de la zone illuminée n'est plus dans le plan focal du détecteur. Ce phénomène a pu être limité par l'introduction d'un second microscope oblique permettant la conservation de l'image dans le plan focal, ou bien en créant une feuille de lumière oblique à l'objectif d'illumination et en plaçant l'objectif de détection perpendiculairement à cette feuille de lumière. Ces travaux successifs poussèrent les microscopes à feuille de lumière aux limites de la résolution spatiale.

Le second paramètre particulièrement intéressant à optimiser a été le temps d'analyse d'un échantillon en 3D. Ce paramètre est essentiellement dépendant de la vitesse de mouvement de l'échantillon car, en premier lieu, c'est l'échantillon qui a été amené à être déplacé puisque la feuille de lumière devait rester dans le plan focal du détecteur. Or, les échantillons biologiques ne peuvent pas être déplacé avec une trop grande rapidité au risque de les endommager. Une solution a été de conserver l'échantillon en place et de le scanner en déplaçant la feuille de lumière. Les systèmes de microscopie ont donc été adaptés dans ce sens, afin de conserver la feuille de lumière, mobile, toujours dans le plan focal. Notamment, translater les objectifs en même temps que la feuille de lumière par l'intermédiaire de cellules piézoélectriques a été envisagé par Holekamp *et coll*. afin d'augmenter drastiquement la vitesse d'analyse[283]. D'autres groupes ont eu recours à des lentilles et miroirs afin d'éviter le déplacement des objectifs tout en bougeant la feuille de lumière. Finalement, la vitesse d'analyse de tels systèmes a été limitée non plus par l'optique mais par la capacité des caméras

III.3.3.Pénétration lumineuse d'échantillons inhomogènes au SPIM

Dans le cas de l'imagerie d'échantillons biologiques aux volumes importants, le problème de la dégradation de la qualité de l'image est inévitable. Il est dû à la présence d'inhomogénéités dans l'échantillon, qui perturbent le trajet optique de la lumière en induisant des aberrations et une diminution du rapport signal sur bruit. Retirer physiquement l'élément de l'échantillon qui dévie le trajet optique ou homogénéiser l'indice de réfraction de l'échantillon grâce à un agent chimique sont deux voies possibles pour limiter la diffusion. Cependant cela n'est pas toujours possible ou désiré, l'utilisation d'un agent chimique ne permettant pas l'imagerie d'échantillons vivants par exemple. L'utilisation de lumière à des longues longueurs d'onde rouges ou dans le proche infra-rouge, limite la diffusion et a permis d'atteindre des pénétrations de l'ordre de 2 mm pour l'observation de tissus cérébraux de souris[284].

Modifier le système d'illumination ne pourra cependant jamais empêcher la présence

d'aberrations optiques sur l'image finale puisque la fluorescence émise par la tranche d'échantillon excitée devra traverser une masse d'échantillon inhomogène. C'est pour corriger la qualité de l'image en aval de sa détection que l'optique adaptative a été développée. Elle permet de compenser les aberrations optiques induites par l'échantillon en améliorant le signal optique par manipulation de sa phase à l'aide de miroirs déformables. Le SPIM utilisé dans ce travail pour imager une biopsie cardiaque de souris dans un hydrogel macromoléculaire est équipé d'un module d'optique adaptative devant permettre de réduire les aberrations créées par la présence du gel autour de l'échantillon biologique.

III.3.4.Résultats

Dans un premier temps, nous avons voulu déterminer si l'hydrogel était adéquat pour la microscopie à feuille de lumière. Pour cela, un gel à base de terpolymère et de thiol est préparé à 10% dans du PBS contenant des microbilles fluorescentes (Ø = 0,5 µm). 1% massique de peptide est ajouté à la formulation afin de ralentir la réaction très rapide entre les thiols et les maléimides. Les composantes du gel sont mélangées puis versés dans plusieurs tubes capillaires en verre pour former des carottes d'hydrogels. Dans ces conditions, les gels ont un temps de prise de 10 à 20 min et peuvent être observés au SPIM.

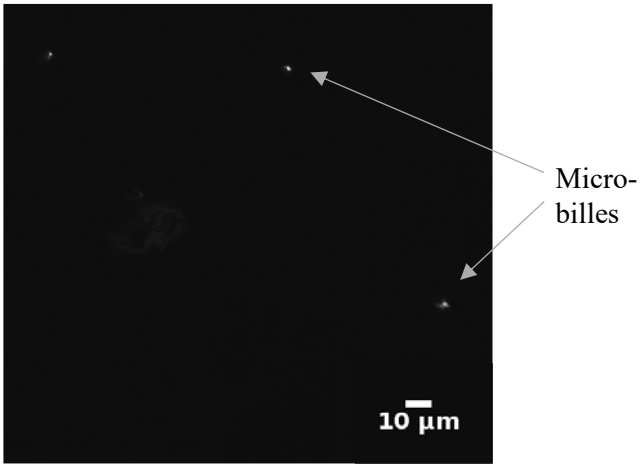


Figure 177 : Image de microscopie SPIM de microbilles encapsulées dans un hydrogel macromoléculaire. Les points lumineux représentent les billes. Les images sont enregistrées avec une caméra Hamamatsu Orca Flash 4.0 2048 x 2048 pixels dont l'objectif a un grossissement de 20. Le temps d'exposition es de 100ms.

Les billes fluorescentes sont bien visibles au SPIM. Ce résultat est encourageant et nous pousse à croire qu'un tissu marqué pourrait tout à fait être visible également en microscopie à feuille de lumière.

Des expériences d'imagerie de biopsie encapsulée par microscopie à feuille de lumière ont été programmées mais de contraintes temporelles et techniques n'ont pas permis de réaliser à ce jour cette expérience.

IV.Conclusion

Le dernier chapitre de ce manuscrit est tourné vers les applications des hydrogels synthétisés dans ce travail, dans le cadre de la biologie cellulaire et tissulaire. Nous nous sommes tout d'abord intéressés à la fabrication d'hydrogels modèles d'agarose de différentes rigidités dans le but initial d'étudier l'influence de la rigidité de ces gels sur le développement de cellules cardiaques H9C2. La littérature a en effet déjà montré que sur de nombreux support, en fonction des types cellulaires, les cellules adoptaient des morphologies et croissances différentes en fonction de la rigidité du substrat. Il serait intéressant de mener à bout cette idée en cultivant des sphéroïdes de H9C2 encapsulées dans des hydrogels de rigidité différentes afin de modéliser un environnement rigide en trois dimensions. Dans un second temps nous avons voulu attester de la possibilité d'imager un tissu biologique inclus dans un échantillon d'hydrogel macromoléculaire contenant du photochrome. Nous sommes parvenus à mettre au point un protocole de préparation d'échantillon et avons observé des biopsies de cœur de souris au travers du gel au microscope confocal avec succès à J+2 après les marquages. Il serait intéressant de poursuivre ce travail et d'étudier l'effet de la conservation de la biopsie dans le gel sur l'intégrité tissulaire comparé à celle observée dans le PBS. Enfin nous avons envisagé l'imagerie de microscopie à feuille de lumière de biopsies marquées, des optimisations sont cependant encore nécessaires afin d'observer correctement, sans trop d'aberrations otiques, la structure du tissu. Ces premiers essais restent néanmoins encourageants. Les hydrogels développés dans ce travail semblent donc être de bons candidats pour la préparation de supports à la culture cellulaire et tissulaire puisqu'ils sont biocompatibles et ne parasitent pas l'observation en microscopie photonique.

CONCLUSION GENERALE

Au cours de ce projet de thèse, réalisé dans le cadre du projet ANR Gellight, nous avons cherché à développer des hydrogels dont les propriétés mécaniques pourraient être contrôlées par la lumière visible. Dans ce but, un « cahier des charges » regroupant les caractéristiques désirées pour ces hydrogels a été établi et peut être représenté comme schématisé sur la Figure 178.

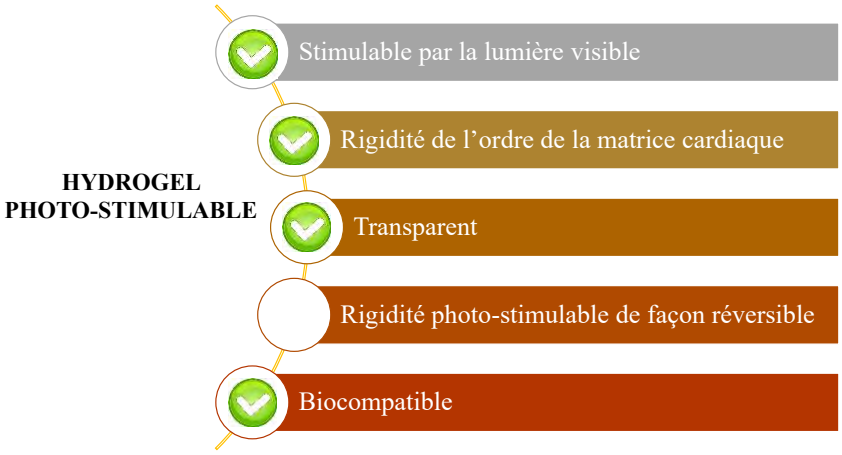


Figure 178 : Cahier des charges d'un hydrogel photo-stimulable pour la biologie.

Ces hydrogels étant voués à servir de plateforme stimulable pour l'étude d'échantillons biologiques, nous n'avons pas souhaité nous servir de lumière UV à cause des risques de cytotoxicité. C'est pourquoi nous nous sommes tournés vers un système répondant à la lumière visible. Les laboratoires de l'INSERM partenaires de ce projet, I2MC et StromaLab disposent d'une expertise dans le domaine de la culture de cellules cardiaques ainsi que l'imagerie de tissus cardiaques. Nous nous sommes donc donnés pour objectif de synthétiser des hydrogels dont les modules de rigidité seraient de l'ordre de grandeur de la rigidité de la matrice cardiaque. Les propriétés mécaniques de l'environnement des cellules ont une grande influence sur leur devenir. Nous avons souhaité développer un gel dont les propriétés mécaniques pouvaient être modifiées de façon réversible afin qu'il puisse un jour servir comme support d'échantillons biologiques en mécanobiologie. Dans l'optique de travailler au contact d'échantillons biologiques, ces hydrogels devaient également être biocompatibles, c'est-à-dire ne pas causer de dommages aux cellules.

Afin de se rapprocher de ce cahier des charges, plusieurs choix ont dû être faits, et peuvent maintenant être discutés. En premier lieu, l'utilisation d'un support polymère pour la molécule photo-sensible devait permettre de faciliter la synthèse et permettre la formation de gel sans solvant organique, par rapport au travail de postdoctorat précédemment réalisé au laboratoire, où la synthèse d'azobenzènes et β-CD fonctionnalisées maléimides s'était montrée complexe et chronophage. L'utilisation du terpolymère contenant des POE a effectivement permis de

réaliser des synthèses de gels sans solvant organique. Cependant ce choix ne s'est pas avéré pertinent pour la synthèse efficace de gels aux propriétés mécaniques photo-stimulables. En effet, la synthèse du terpolymère n'a pas été triviale à mettre en place, ni à contrôler et la présence d'un squelette polymère de type méthacrylate a conduit à la formation de micelles unimoléculaires du terpolymère dans l'eau, isolant les groupes photochromes. Un second choix a été de simplifier la synthèse de la β-CD-maléimide, quitte à fonctionnaliser plus de deux maléimides par oligosaccharide. Cette méthode s'est avérée efficace mais la présence de trop de fonctions maléimides en surface de la β-CD l'a rendue très hydrophobe et à peut-être contribuer à une accessibilité des β-CD moindre par les molécules invitées. Le greffage de chaine POE par maléimide thiol a tout de même rendu possible sa solubilisation dans l'eau et son utilisation pour la synthèse d'hydrogels en milieu aqueux. Un troisième choix a été de favoriser le 4F-AZO-POE plutôt que le 2Cl2F-AZO-POE afin de pouvoir obtenir des matériaux répondant à la lumière visible. L'étude sur les molécules libres en solution nous a permis de faire un choix pertinent par rapport aux propriétés photochimiques et de complexation avec la β-CD. Cependant, l'hydrophobicité marquée du 4F-AZO a sans doute été un facteur favorisant le repliement du terpolymère dans l'eau le rendant incapable de complexer la β-CD.

Les hydrogels synthétisés dans ce travail remplissent le cahier des charges en ce qui concerne leurs propriétés de biocompatibilité, de transparence et gamme de rigidité. Seule la modification des propriétés mécaniques en réponse à un stimulus lumineux n'a pas été atteinte. Cela nous a mené à nous interroger sur ce que l'on ferait autrement si l'expérience était à refaire. Afin d'obtenir un matériau aux propriétés stimulables, on pourrait envisager le greffage de fonctions azobenzènes et maléimides sur un autre squelette polymère, plus soluble dans l'eau afin d'éviter le repliement des azobenzènes fluorés. Une deuxième alternative serait le retour à un système plus compact en synthétisant un nouvel 4F-AZO bismaléimide et en l'utilisant avec une β-CD bismaléimide et des thiols pour la synthèse d'hydrogels. La littérature sur les hydrogels comme matrice extra-cellulaires de synthèse, et la difficulté rencontrée ici à obtenir un système stimulable dans le visible, nous pousse à nous demander si l'utilisation de lumière UV doit vraiment être proscrite de ce type d'applications. En effet, l'immense majorité des hydrogels dont la rigidité peut être photo-contrôlable nécessite un rayonnement UV, qui, la plupart du temps n'est pas considéré comme toxique par les auteurs de ces études, pour des raisons de toxicité négligeable à courts termes dans les conditions de l'expérience. Il semble tout de même que l'innovation dans ce domaine se trouve dans la conception de matériaux stimulables par des lumières biocompatibles comme le bleu ou le vert, voire le rouge, qui traverse aisément les

tissus et peut être envisagé pour des études ou de la thérapie *in vivo*.

Ce travail nous a permis d'envisager les perspectives suivantes pour ce projet, dans le contexte de la synthèse de matériaux stimulables par la lumière visible pour la biologie. Tous d'abord, il serait intéressant de réussir à imager un tissu biologique marqué par microscopie à feuille de lumière. Pour cela, il est nécessaire de déterminer, dans un premier temps, les paramètres optimaux pour visualiser de façon nette un échantillon encapsulé dans un gel. Puis dans un second temps, il faut préparer un gel contenant une biopsie dans un porte échantillon du microscope. Ensuite, l'étape à mettre en œuvre afin d'obtenir un matériau capable de stimuler les organismes vivants aurait d'y incorporer un peptide d'adhésion. En effet, le gel synthétisé ne permet pas aux cellules d'y adhérer. Sans cela, leurs récepteurs mécanosensibles risquent de ne pas être stimulés par des changements de rigidité en trois dimensions.

En conclusion, ce travail a confirmé que les hydrogels à base de POE et réticulés par la réaction maléimide-thiol sont de bons candidats comme modèles de matrice extra-cellulaire. Il a mis en évidence que les propriétés de complexation entre hôte et invité peuvent être fortement modifiées lors du passage d'une molécule en solution à un système macromoléculaire plus complexe. Il a ainsi souligné l'importance de la compréhension des interactions mises en jeu lors du passage de la petite molécule à la macromolécule pour la synthèse de matériaux innovants et photo-stimulables permettant de répondre aux défis de demain.

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL :

Les solvants employés pour les réactions ont été achetés avec un degré de pureté « analytique » et utilisés sans purification préalable ni séchage sauf si spécifié.
Sauf si spécifié, PBS désigne une solution de tampon phosphate (PBS) préparée à partir d'une tablette (Sigma Aldrich, Etats-Unis) dissoute dans 200 mL d'eau ultra pure. La solution possède les concentration en sels suivantes : [NaCl]= 137.10^{-3} mol.L^{-1}, [KCl]= $2,7.10^{-3}$ mol.L^{-1} et une solution de phosphate à 10.10^{-3} mol.L^{-1} (pH 7,4 à 25 °C).

Purificateur d'eau

L'eau ultra pure d'une résistivité de 18.2 MΩ.cm utilisée dans ce travail est obtenue grâce à l'appareil PURELAB flex 1 Dispenser (ELGA LabWater, Royaume-Uni).

Système d'irradiation

Les sources lumineuses sont des LEDs (Mightex, Canada) de longueurs d'onde 365 nm (WLS-LED-0365-03), 420 nm (WLS-LED-0420-03), 415 nm (WLS-LED-0415-03), 470 nm (WLS-LED-0470-03) et 530 nm (WLS-LED-0530-03) montées sur le châssis WLS-22-A du même fournisseur. La lumière est menée depuis la LED jusqu'à l'échantillon par une fibre optique de 2 mm de diamètre dont l'extrémité est placée au contact de la cuve de quartz. L'intensité de ces LEDs est contrôlable par un interrupteur rotatif. Pour la reproductibilité des expériences, les LEDs seront toujours utilisées avec le bouton l'interrupteur tourné sur la position délivrant une puissance lumineuse maximale.

Puissance-mètre

Les mesures de puissance lumineuses sont réalisées à l'aide d'un puissance-mètre MAESTRO équipé d'une cellule de photodétection (Gentec-EO, Canada).

Spectrophotométrie UV-Visible

Les mesures d'absorbance UV-Visible ont été faites à 21°C (si non spécifié) avec soit le spectrophotomètre à barette de diode HP 8452A (Hewlett-Packard, USA) piloté par le logiciel SpectralWork (Olis, USA), soit le spectrophotomètre UV-Visible Cary 100 Bio (Varian, Etats-Unis) équipé d'un contrôleur de température Cary (Varian, Etats-Unis) et piloté par le logiciel CaryWin UV (Varian, Etats-Unis).

Dichroïsme circulaire

Les mesure de dichroïsme circulaire ont été exécutées avec un spectromètre à dichroïsme circulaire J-815 (Jasco, Etats-Unis) équipé d'un contrôleur de température pelletier PTC-423S/15 (Jasco, Etats-Unis).

Spectrométrie RMN

Les spectres RMN ont été enregistrés sur les spectromètres Bruker (Etats-Unis) suivants : AVANCE 300 MHz, AVANCE 400 MHz et AVANCE 500 MHz équipé d'une cryosonde TCI à gradient-Z de 5mm et d'une cryosonde PRODIGY à gradient-Z de 5mm. Les déplacements chimiques sont exprimés en partie par million (ppm) par rapport au triméthylsilane pour les RMN ^{1}H et ^{13}C et par rapport au trichlorofluorométhane pour les RMN ^{19}F et ^{19}F-{^{1}H}. Les abréviations suivantes ont été utilisées pour exprimer la multiplicité des signaux : s (singulet), sl (singulet large), d (doublet), dd (doublet dédoublé), dl (doublet large), t (triplet), tl (triplet large), q (quadruplet), m (multiplet non résolu). L'acquisition des spectres a été réalisée à 298 K sauf si spécifié.

Appareil Karl Fischer

Le dosage de l'eau dans les cyclodextrines commerciales a été exécuté avec un titrateur TitroLine KF trace (Schott Instruments, Allemagne). La présence d'eau est détectée par titrage coulométrique avec une solution de Hydranal™ - Coulomat AD (Honeywell, Etats-Unis).

Logiciel SA

Un programme fait-maison, SA(http://cinet.chim.pagesperso-orange.fr/tele_sa/install_Sa_Eng.html), a été utilisé pour modéliser/prévoir les données aux équilibres et les cinétiques des expériences réalisées. Dans ce programme, les équations cinétiques de l'expérience sont intégrées en chaque point jusqu'à ce que l'équilibre soit atteint. Pour un jeu de paramètres donnés, les valeurs calculées à l'équilibre sont ensuite comparées aux données obtenues expérimentalement. Les équations différentielles sont intégrées numériquement en utilisant une méthode Runge-Kutta semi-implicite. Les paramètres inconnus sont calculés grâce à un algorithme itératif de type Powel conçu pour minimiser l'erreur quadratique résiduelle telle que,

$$E = \sum_{i} \sum_{j} \frac{(c_{ij} e_{ij})^2}{(n.N)}$$

Avec cij et eij sont respectivement les concentrations modélisée et expérimentale, n le nombre

de points de l'expérience et N le nombre d'essais (neuf dans ce cas). L'erreur résultant des constantes de vitesse et des ratios de constantes de vitesse sont obtenues en supposant une variation de 10% de l'erreur résiduelle.

Chromatographie liquide couplée à la Spectromètre de masse :

Les analyses HPLC-MS ont été réalisées sur l'appareil XEVO-G2QTOF de chez Waters.
Les analyses MALDI ont été réalisées sur l'appareil MALDI MICROMX de chez Waters.

Machine d'essai en compression :

Les tests de compression uni-axiaux ont été réalisés avec une machine d'essai en compression ElectroForce 3100 (Bose, Etats-Unis) équipée d'une cellule de charge de 20 N (Bose, Etats-Unis) pilotée par le logiel WinTest® PCI Control (Bose, Etats-Unis).

Microscopie à Force Atomique (AFM) :

L'appareil utilisé pour les expériences d'AFM est un NanoWizard 3 AFM (JPK Instruments, Allemagne) monté sur un microscope à fluorescence (Axiovert 200, Carl Zeiss MicroImaging, Allemagne). Les LEDs Mightex sont utilisées comme sources lumineuses à 415 et 530 nm, guidées par une fibre optique intégrée au microscope.

Fluorimètre

Les mesures en fluorescence ont été faites à 21 °C avec le spectromètre de fluorescence Fluorolog 3-2 iHR 320 (Horiba, Japon).

Analyse élémentaire

Les analyses élémentaires CHN ont été effectuées sur un analyseur PerkinElmer 2400 II à partir d'échantillons conservés sous atmosphère inerte.

Diffusion statique et dynamique de la lumière

Les analyses en diffusion de la lumière ont été réalisées par diffusion statique et dynamique de la lumière avec un corrélateur digital complet ALV-5000 multibit (ALV-GmbH, Allemagne), multitau en combinaison avec un laser Spectra-Physics (émettant une lumière polarisée verticalement à k = 632,8 nm) et un bain thermostatique contrôlé à 20 ± 0,2 ° C.

Vibro-Broyeur

Les expériences de mécanochimie ont été réalisées avec un vibro-broyeur MM400 (Retsch GmbH, Allemagne) à la fréquence de 24 Hz dans des jarres en acier inoxydable intérieur téflon de 10 mL avec des billes en oxyde de zirconium de 10 mm de diamètre.

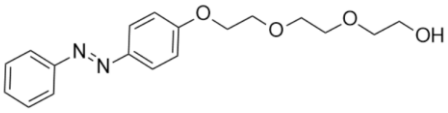
MODES OPERATOIRES

Dans les protocoles suivants, les concentrations de solutions de molécules bien définies seront données en mol.L^{-1} et les concentrations de solutions de polymères, polydisperses, seront données en mg.mL^{-1}.

Les expériences de spectrophotométrie UV-Visibles ont été réalisées avec le spectromètre HP 8452A si non spécifié.

Caractérisation par spectroscopie RMN des composés reçus

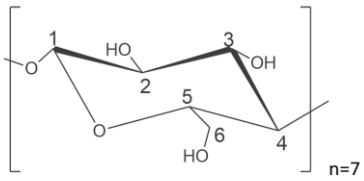
AZO-POE :



L'AZO-POE (IMRCP, UMR5623, Université Paul Sabatier Toulouse 3) a été synthétisé comme décrit dans la littérature[165]. Il se trouve sous la forme d'une poudre orange.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : 7,85 – 7,98 (m, 4H), 7,41– 7,70 (m, 3H), 7,02 – 7,10 (m, 2H), 4,25 (t, J = 4,7 Hz, 2H), 3,93 (t, J = 4,7 Hz, 2H), 3,71 – 3,81 (m, 6H), 3,63 – 3,67 (m, 2H), 2,04 (s, 1H).

β-CD :



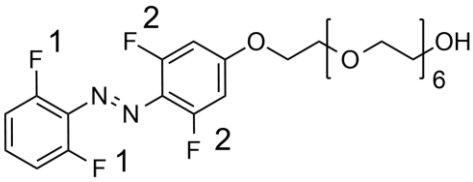
La β-CD (Fluka, Allemagne) commerciale a été utilisée. Elle se présente sous la forme d'une poudre blanche.

RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm) : 5,66-5,78 (m, OH(2) et OH(3)), 4,90 (s, H(1)), 4,55 (m, OH(6)), 3,50-3,70 (m, H(3), H(5), H(6)), 3,25-3,40 (m, H(2) , H(4)).

RMN ^{1}H (300 MHz, D_2O) δ (ppm) : 5,00 (d, H(1), J = 5 Hz), 3,90 (t, H(3), J = 9,8 Hz), 3,76-

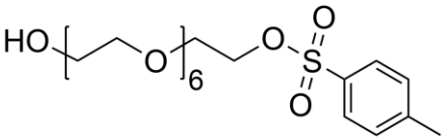
3,85 (m, H(5), H(6)), 3,58 (dd, H(2), ^3J = 3,7 Hz , ^5J = 10,2 Hz), 3,60 (t, H(4), J = 9,6 Hz).

4F-AZO-POE :



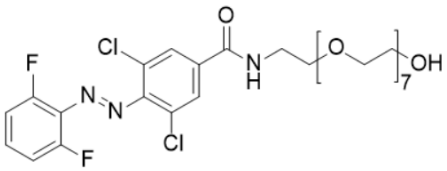
Le 4F-AZO-POE a été synthétisé par A. Comte (ICBMS, UMR5246, Université Claude Bernard Lyon 1) et utilisé tel que reçu. Il se trouve sous la forme d'une huile rouge sombre.
RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : 7,29-7,39 (m, 1H), 7,06 (t, 2H, J = 8,7 Hz), 6,65 (d, 2H, J = 11,1 Hz), 4,16-4,25 (m, 2H), 3,90 (t, 2H, J = 4,7 Hz), 3,58-3,80 (m, 25H).
RMN ^{19}F (376 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): -117,9 (s, $2F_2$, cis form), -118,6 (s, $2F_2$, *trans* form), -120,6 (s, $2F_1$, cis form), -124,0 (s, $2F_1$, *trans* form).

POE-OTs:



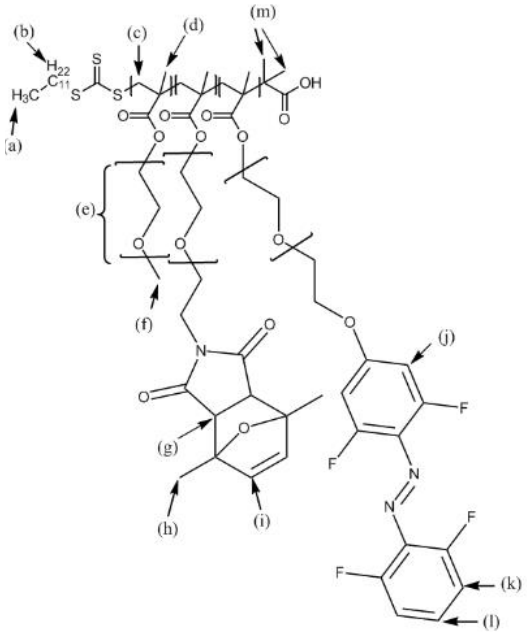
Le poly(oxyde d'éthylène) tosylate (ICBMS, UMR5246, Université Claude Bernard Lyon 1) a été utilisé tel que reçu. Il se présente sous la forme d'une poudre blanche.
RMN ^{1}H (300 MHz, D_2O) δ (ppm) : 7,80 (dl, 2H), 7,45 (dl, 2H), 4,20 (m, 2H), 3,00-4,00 (m, 24H), 2,34 (s, 3H).

2Cl2F-AZO-POE :



Le 2Cl2F-AZO-POE (INM, Leibniz-Institut für Neue Materialien gGmbH, Allemagne) se présente sous la forme d'une huile rouge sombre.
RMN ^{1}H (300 MHz, CD_2Cl_2) δ (ppm) : 8,00 (s, 2H), 7,46-7,60 (m, 1H), 7,20 (t, 2H, J = 8,8 Hz), 3,53-3,77 (m, 36H), 2,7 (s, 1H).
RMN ^{19}F-{^{1}H} (376 MHz, CD_2Cl_2) δ (ppm) : -117,0 (s, 2F, cis form), -120,2 (s, 2F, *trans* form).

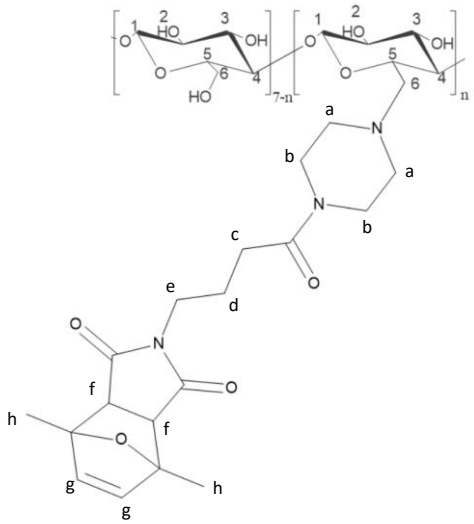
Terpolymère protégé :



Le terpolymère (Specific Polymers) protégé reçu se présente sous la forme d'une gomme rouge. RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : 7,34 (m, H(l)), 7,05 (tl, H(k)), 6,72 (sl, maléimide déprotégé), 6,65 (dl, H(j)), 6,32 (sl, H(i) exo), 6,22 (sl, H(i) endo), 3,43-4,32 (m, H(e)), 3,39 (s, H(f)), 3,22 (sl, H(g) endo), 2,84 (sl, H(g) exo), 2,10 (m, H(c)), 1,79 (s, H(h) endo), 1,71 (s, H(h) exo), 1,22-1,4 (m, H(b), H(m)), 0,6-1,22 (m, H(a), H(m)). $M_{n,NMR}$=20,000 g/mol

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl3) δ (ppm) : 177.41, 175.10, 174.69, 170.67, 161.92, 158.41, 158.35, 156.47, 156.33, 156.27, 154.41, 140.91, 138.02, 135.77, 130.47, 112.63, 112.47, 99.85, 99.67, 99.65, 99.46, 87.91, 87.58, 71.93, 70.56, 70.04, 69.86, 69.25, 69.14, 68.63, 68.45, 67.83, 67.21, 64.12, 63.88, 69.14, 68.63, 68.45, 67.83, 67.21, 64.12, 63.88, 59.03, 53.46, 52.47, 44.85, 37.98, 37.57, 37.12, 34.22, 31.90, 29-29.8, 22.68, 19.59, 18.63, 15.89, 14.16.

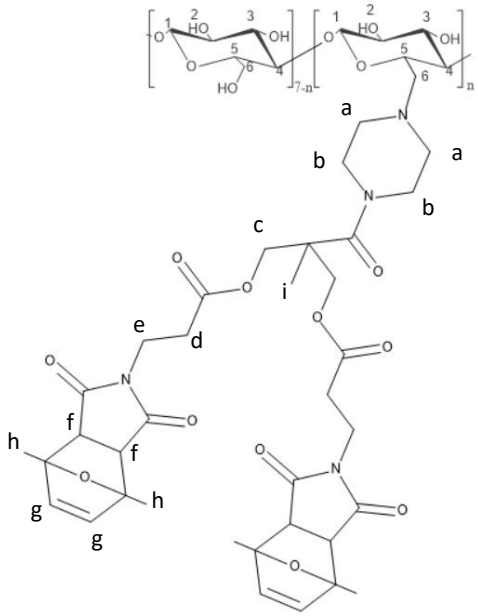
β-CD-m_p :



La β-CD-m_p (Specific Polymers) reçue se présente sous forme d'une fine poudre beige.

RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm) : 6,90-7,05 (sl, -C<u>H</u>=C<u>H</u>- maléimide déprotégé), 5,35 (sl, H(g) exo), 6,15-6,30 (sl, H(g) endo), 5,60-6,15 ((m, OH(2) et OH(3)), 4,70-5,30 (m, H(1)), 4,20-4,70 (m, OH(6)), 3-4 (m, H(2), H(3), H(4), H(5), H(6), H(a), H(b), H(e)), 2-3 (m, H(f) endo et exo, H(c), H(d)), 1,6 (sl, H(h) endo), 1,5 (H(h) exo).

β-CD-2m :



La β-CD-m_p se présente sous forme d'une fine poudre beige.

RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm) : 7,00 (s, -<u>H</u>C=C<u>H</u>- maléimide déprotégé), 6,40 (s, H(g) exo), 6,22 (s, H(g), endo), 5,50-6,00 (m, H(2)), 4,75-5,0 (m, H(1)), 4,25-4,75 (m, H(6)),

4,00-4,25 (m, H(c)), 3,10-4,00 (m, H(4), H(b) H(e)), 3,9 (s, H(f)), 2,25-2,7 (m, H(d), H(i)), 1,60 (s, H(h) endo), 1,50 (s, H(h) exo), 1,2 (s, H(i)).

Dosage de l'eau par la méthode de Karl-Fischer

Le DMSO utilisé est séché pendant 24h sur tamis moléculaire 4Å préalablement activé 15 min à 400 °C sous vide. Pour l'α-cyclodextrine (Wacker Chemie, Allemagne), la β-cyclodextrine (Fluka, Allemagne), la γ-cyclodextrine (Fluka, Allemagne) et l'AZO-POE, entre 8 et 20 mg de solide sont pesés dans un tube à hémolyse et dissout dans environ 1 mL de DMSO anhydre puis la solution est soumise 2 min aux ultra-sons. En parallèle, dans un second tube à hémolyse, 1 mL de DMSO « témoin » est également soumis 2 min aux ultra-sons. Une fois que l'appareil Karl-Fischer est stabilisé, le DMSO « témoin » est injecté dans l'appareil pour doser son contenu en eau. Le DMSO contenant le composé à analyser est ensuite injecté. Pour chaque mesure, 3 injections d'environ, 0,2 ; 0,3 et 0,4 mL sont réalisées. La masse d'eau contenue dans l'échantillon est donnée en ppm. En retranchant le contenu en eau du DMSO seul, la mesure de l'échantillon permet d'accéder à la masse d'eau contenue dans le solide d'intérêt.

Spectroscopie UV-Visible et de dichroïsme circulaire

Les spectres d'absorption UV-Visible et de dichroïsme circulaire sont enregistrés dans des cuves en quartz, de chemin optique l= 1cm, suivant un protocole classique. Rapidement, les solutions sont préparées par solubilisation du composé dans un bon solvant, et les mesures sont corrigées automatiquement par les caractéristiques du solvant (blanc), mesurées en amont de la mesure. Les mesures sont faites à 21 °C.

Actinométrie

Toutes les expériences d'actinométrie sont réalisées dans l'eau distillée 18,2 MΩ.cm à 23 °C. L'actinomètre utilisé dans ce travail est le ferrioxalate de potassium synthétisé au préalable comme décrit dans la littérature[285]. Une solution mère à 10.10^{-3} mol.L^{-1} et une solution fille à $1,0.10^{-3}$ mol.L^{-1} en actinométre sont préparées à l'abri de la lumière pour les actinométries à 420 nm et 365 nm respectivement. Le temps d'intégration est toujours laissé à 0,2 s et en fonction des cinétiques, le temps total d'acquisition et le nombre de scans total sont modifiés. Le Tableau 33 renseigne les paramètres cinétiques entrés dans le logiciel d'acquisition de données Olis pour les deux actinométries. L'acquisition est faite entre 320 nm et 540 nm.

Expérience	Temps total d'analyse (s)	Nombre de scans
Actinométrie 420 nm	3600	120
Actinométrie 366 nm	3600	180

Tableau 33 : Programme Olis utilisé pour suivre la cinétique des actinométries.

La réaction photochimique est réalisée en irradiant, avec des LEDs, les solutions d'actinomètre dans une cuve de quartz de largeur 1 cm équipée d'un barreau aimanté. L'intensité de ces LEDs est contrôlable par un interrupteur rotatif. L'irradiation est réalisée par le côté de la cuve de façon à ce que le chemin optique valle toujours l=1 cm (Figure 179). Un filtre UV qui coupe les longueurs d'onde inférieures à 350 nm est placé devant la source lumineuse du spectrophotomètre afin d'éviter qu'elle ne participe à la réaction photochimique. Une grille métallique qui filtre 95,6% de l'intensité lumineuse incidente est placée entre le bout de la fibre optique et la cuve et les LEDs sont utilisées à leur puissance maximale.

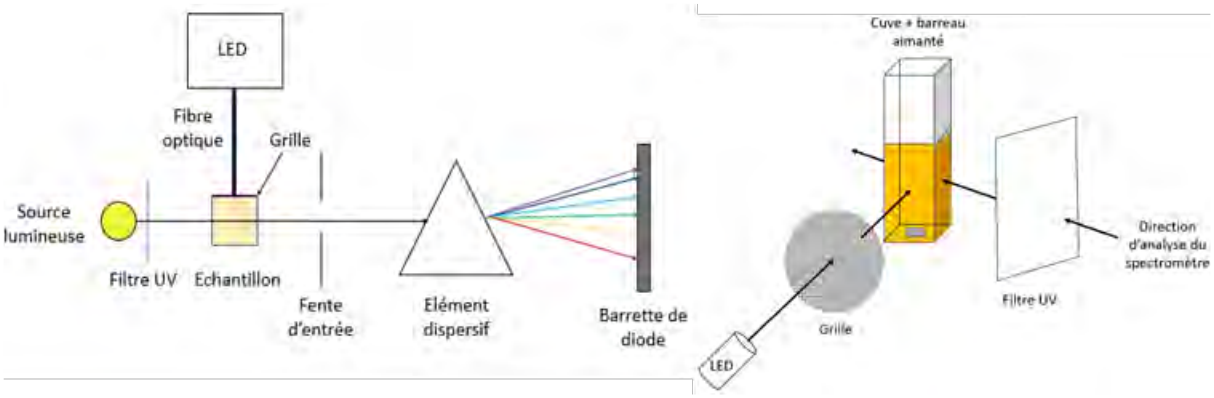


Figure 179 : Schéma du montage des actinométries et cinétiques d'isomérisation. Vue d'ensemble (gauche) et zoom sur la cuve (droite).

Mesure de puissances lumineuses au puissance-mètre

Les mesures de puissance lumineuse sont réalisées dans une salle sombre et le blanc est pris pour la cellule photovoltaïque à éclairage ambiant. La fibre optique prolongeant le système LED est placée au-dessus de la cellule à 2 mm environ de sa surface de sorte que la totalité de la lumière émise soit réceptionnée par le capteur. Les acquisitions sont ensuite réalisées en irradiant la cellule photo-sensible pendant 1min à la puissance maximale pouvant être délivrée par la LED. Le puissance-mètre mesure la puissance moyenne reçue pendant 1 min. L'expérience est répétée trois fois pour chaque LED.

Détermination de la stœchiométrie des complexes par spectroscopie UV-Visible et dichroïsme circulaire (Job Plot)

Une solution d'AZO-POE et une solution de cyclodextrine à $1{,}0.10^{-4}$ mol.L^{-1} sont préparées. Les solutions sont soumises aux ultrasons pendant 10 min. Elles sont préparées le jour précédant les manipulations et conservées à température ambiante dans le noir. Treize mélanges sont préparés et tour à tour analysés en spectroscopie UV-Visible et dichroïsme circulaire dans une cuve en quartz. Leur spectre d'absorbance est ensuite relevé entre 190 nm et 800 nm. Pour chaque point, le mélange eau/cyclodextrine est d'abord versé dans la cuve en quartz. Un blanc de CD dans l'eau à la concentration de chaque mesure est réalisé afin de supprimer l'effet éventuel de la cyclodextrine qui absorbe légèrement dans l'UV. Le tableau suivant donne la composition de chacun des mélanges analysés, où X_{CD} est la fraction molaire de cyclodextrine.

Solutions	XCD	[CD] (mol.L^{-1})	[AZO] (mol.L^{-1})	V_{AZO} (mL)	V_{CD} (mL)
0	0	0,0	$1{,}0.10^{-04}$	2,0	0,0
1	0,1	$1{,}0.10^{-05}$	$9{,}0.10^{-05}$	1,8	0,2
2	0,2	$2{,}0.10^{-05}$	$8{,}0.10^{-05}$	1,6	0,4
3	0,3	$3{,}0.10^{-05}$	$7{,}0.10^{-05}$	1,4	0,6
4	0,4	$4{,}0.10^{-05}$	$6{,}0.10^{-05}$	1,2	0,8
5	0,45	$4{,}5.10^{-05}$	$5{,}5.10^{-05}$	1,1	0,9
6	0,5	$5{,}0.10^{-05}$	$5{,}0.10^{-05}$	1,0	1,0
7	0,55	$5{,}5.10^{-05}$	$4{,}5.10^{-05}$	0,9	1,1
8	0,6	$6{,}0.10^{-05}$	$4{,}0.10^{-05}$	0,8	1,2
9	0,7	$7{,}0.10^{-05}$	$3{,}0.10^{-05}$	0,6	1,4
10	0,8	$8{,}0.10^{-05}$	$2{,}0.10^{-05}$	0,4	1,6
11	0,9	$9{,}0.10^{-05}$	$1{,}0.10^{-05}$	0,2	1,8
12	1	$1{,}0.10^{-04}$	0,0	0,0	2,0

<u>Pour l'UV-Visible :</u> la propriété choisie pour tracer le graphique de Job est ΔA. Elle sera calculée comme suit : $\Delta A = \left| A_{mes}^{\lambda} - [\text{Azo}].\varepsilon_{Azo}^{\lambda}.l \right|$

Avec A_{mes}^{λ} : absorbance mesurée pour le mélange à la longueur d'onde d'étude.

[Azo] : concentration en azobenzène dans la solution

$\varepsilon_{Azo}^{\lambda}$: coefficient d'extinction molaire de l'azobenzène à la longueur d'onde d'étude.

l : trajet optique 1 cm.

<u>Pour le dichroïsme circulaire :</u> La propriété choisie pour tracer le graphique de Job est la

différence de DC entre l'AZO seul et le complexe formé dans chaque solution à une longueur d'onde d'intérêt pondérée par la fraction d'azobenzène. On l'appellera $\Delta DC^{\lambda}.X_{azo.}$

Détermination de la stœchiométrie des complexes par spectrométrie RMN (Job Plot)

AZO-POE/β-CD :

Une solution mère d'azobenzène à $6{,}0.10^{-3}$ mol.L^{-1} est préparée dans l'éthanol absolu. 250 µL de cette solution sont prélevés et placés dans une fiole de 5 mL. L'éthanol est évaporé à environ 70°C au pistolet thermique sous flux d'argon. La fiole est placée dans une étuve sous vide pendant plusieurs heures afin d'évaporer toutes traces d'éthanol. Une solution à $3{,}0.10^{-4}$ mol.L^{-1} est préparée en complétant la fiole avec D_2O. Une solution mère de cyclodextrine à $6{,}0.10^{-3}$ mol.L^{-1} est préparée dans D_2O. 250 µL de cette solution sont dilués dans une fiole jaugée de 5 mL de D_2O pour obtenir une solution fille à $3{,}0.10^{-4}$ mol.L^{-1}. Les solutions sont soumises aux ultrasons pendant 10 min. Elles sont préparées le jour précédant les manipulations et conservées à température ambiante dans le noir. Si l'AZO-PEG doit être analysé sous sa forme *cis*, la solution à $3{,}0.10^{-4}$ mol.L^{-1} est irradiée 5 min à 366 nm le jour de l'analyse.

Onze tubes RMN ambrés sont ensuite préparés à partir de ces solutions filles à $3{,}0.10^{-4}$ mol.L^{-1}. Le tableau suivant donne la composition de chaque mélange analysé, où $X_{\beta\text{-CD}}$ est la fraction molaire de cyclodextrine.

Solutions	$X_{\beta\text{-CD}}$	[CD] (mol.L^{-1})	[azo] (mol.L^{-1})	V_{azo} (mL)	V_{CD} (mL)
0	0	0,0	$3{,}0.10^{-4}$	0,6	0
1	0,1	$3{,}0.10^{-5}$	$2{,}7.10^{-4}$	0,54	0,06
2	0,2	$6{,}0.10^{-5}$	$2{,}4.10^{-4}$	0,48	0,12
3	0,3	$9{,}0.10^{-5}$	$2{,}1.10^{-4}$	0,42	0,18
4	0,4	$1{,}2.10^{-4}$	$1{,}8.10^{-4}$	0,36	0,24
5	0,5	$1{,}5.10^{-4}$	$1{,}5.10^{-4}$	0,3	0,3
6	0,6	$1{,}8.10^{-4}$	$1{,}2.10^{-4}$	0,24	0,36
7	0,7	$2{,}1.10^{-4}$	$9{,}0.10^{-5}$	0,18	0,42
8	0,8	$2{,}4.10^{-4}$	$6{,}0.10^{-5}$	0,12	0,48
9	0,9	$2{,}7.10^{-4}$	$3{,}0.10^{-5}$	0,06	0,54
10	1	$3{,}0.10^{-4}$	0,0	0	0,6

Un douzième tube contenant un rapport AZO:CD égal à 1:100 est préparé.

Pour chaque tube RMN préparé, une première analyse permettant d'enregistrer le déplacement chimique du pic de l'eau (référence) est réalisée. Ensuite, le mélange est analysé par un

programme irradiant le pic résiduel du solvant afin que son abondance ne gêne pas la lecture du déplacement chimique d'intérêt.

4F-AZO-POE/β-CD et 2Cl2F-AZO-POE/β-CD :

Deux solutions à $3{,}0.10^{-4}$ mol.L^{-1}, de 4F-AZO-POE et de β-CD sont préparées dans D_2O. Les solutions sont soumises aux ultrasons pendant 10 min. Elles sont préparées le jour précédant les manipulations et conservées à température ambiante dans le noir. Pour l'analyse sous forme *cis*, la solution à $3{,}0.10^{-4}$ mol.L^{-1} est irradiée 5 min à 366 nm pour le 4F-AZO-POE et 530 nm pour le 2CL2F-AZO-POE le jour de l'analyse.
Onze tubes RMN ambrés sont ensuite préparés à partir de ces solutions filles à $3{,}0.10^{-4}$ mol.L^{-1}. Les mélanges sont réalisés selon le même tableau que pour l'AZO-PEG ci-dessus. Un douzième tube contenant un rapport AZO:CD égal à 1:100 est préparé pour le 4F-AZO-POE.

Détermination de constantes d'association des complexes par spectroscopie UV-Visible (expérience de dosage)

Les expériences de dosage sont exécutées de la manière suivante : une solution aqueuse d'azobenzène à $1{,}0.10^{-4}$ mol.L^{-1} est préparée. La solution est soumise aux ultrasons pendant 10 min et laissée une nuit à température ambiante dans le noir. Une solution de cyclodextrine à 10.10^{-2} mol.L^{-1} est préparée dans l'eau. Le mélange est soumis aux ultra-sons pendant 15 min à température ambiante pour finaliser la dissolution. Une deuxième solution à $1{,}0.10^{-3}$ mol.L^{-1} est préparée par dilution de la première. Onze solutions de concentration identique en AZO mais de plus en plus concentrées en cyclodextrine sont ensuite analysées par spectrophotométrie UV-Visible. Les détails de ces solutions sont renseignés dans le tableau suivant.

Solutions	[CD] (mol.L^{-1})	V_{azo} (mL)	$V_{CD,1\ mM}$ (mL)	$V_{CD,10\ mM}$ (mL)	V_{EAU} (mL)
1	0,0	1,5	0,0	0,0	1,5
2	$2{,}5.10^{-05}$	1,5	0,07	0,0	1,43
3	$5{,}0.10^{-05}$	1,5	0,15	0,0	1,35
4	$1{,}0.10^{-04}$	1,5	0,3	0,0	1,2
5	$2{,}5.10^{-04}$	1,5	0,7	0,0	0,8
6	$5{,}0.10^{-04}$	1,5	1,5	0,0	0
7	$1{,}0.10^{-03}$	1,5	0	0,3	1,2
8	$2{,}0.10^{-03}$	1,5	0	0,6	0,9
9	$2{,}5.10^{-03}$	1,5	0	0,75	0,75
10	4,00E-03	1,5	0	1,2	0,3
11	5,00E-03	1,5	0	1,5	0

Les spectres entre 190 nm et 800 nm sont relevés pour chacune des solutions. La courbe A(λ)=f([CD]) est ensuite tracée en choisissant λ la longueur d'onde où les dérivés d'azobenzène seuls et complexés ont des coefficients d'absorption molaire différents. Cette courbe est modélisée avec le logiciel SA, selon la procédure décrite plus loin dans la partie « Modélisation avec le logiciel SA », et les constantes d'association entre dérivés d'azobenzène et cyclodextrine sont extraites du modèle.

Pour le 4F-AZO-POE : Pour chaque point, $V_{CD}+V_{eau}$ est d'abord versé dans la cuve en quartz. Un blanc est réalisé afin de supprimer l'effet éventuel de la cyclodextrine qui absorbe légèrement dans l'UV. 1,5 mL de solution de 4F-AZO-POE sont ensuite ajoutés à la cuve. Celle-ci est bouchée, agitée et son spectre absorbance entre 190 nm et 800 nm est enregistré.

Pour le 2Cl2F-AZO-POE : Le protocole est exécuté sans les solutions 2, 5, 7 et 9.

Pour le terpolymère-protégé sous forme *trans* (Chapitre 3) : Une solution à 202 $g.L^{-1}$ est préparée dans une solution aqueuse saline (NaCl à 0,15 $mol.L^{-1}$). La solution est soumise aux ultrasons pendant 10 min et laissée une nuit à température ambiante dans le noir. Une solution de β-cyclodextrine à 10.10^{-3} $mol.L^{-1}$ est préparée dans la même solution saline. Le protocole décrit ci-dessus est ensuite appliqué et les solutions suivantes sont préparées puis analysées.

Expérience	[CD] ($mol.L^{-1}$)	V_{azo} (mL)	$V_{CD,10\ mM}$ (mL)	V_{EAU} (mL)
1	0,0	1	0,0	1,5
2	$2,5.10^{-05}$	1	0,0	1,43
3	$5,0.10^{-05}$	1	0,0	1,35
4	$1,0.10^{-04}$	1	0,0	1,2
5	$2,5.10^{-04}$	1	0,0	0,8
6	$5,0.10^{-04}$	1	0,0	0
7	$1,0.10^{-03}$	1	0,3	1,2
8	$2,0.10^{-03}$	1	0,6	0,9

Suivis cinétiques des irradiations par UV-Visible

Molécule invitée seule :

La cinétique d'une réaction d'actinométrie sous irradiation à 366 nm est suivie systématiquement selon le protocole décrit en partie « Actinométrie » avant le cycle d'irradiations pour vérifier l'intensité lumineuse arrivant sur l'échantillon. Par la suite, le montage n'est plus déplacé ni modifié avant la fin de l'expérience.

Une solution de molécule invitée est préparée à $1{,}0.10^{-4}$ mol.L^{-1} dans l'eau et placée dans un bain à ultrasons pendant 15 min. À 1 mL de cette solution est ajouté 1 mL d'eau dans une cuve en quartz contenant un barreau aimanté. La cuve est irradiée successivement à 366 nm, 420 nm puis 366 nm de nouveau, dans les mêmes conditions que l'actinométrie. Les paramètres d'enregistrement des spectres au cours du temps sont présentés dans le Tableau 38.

Expérience	Temps total d'analyse (s)	Nombre de scans
Actinométrie 366 nm	3600	180
Irradiation 1. 366 nm	150	150
Irradiation 2. 420 nm	150	150
Irradiation 3. 366 nm	150	150

Tableau 34 : Programme Olis utilisé pour suivre les cinétiques d'isomérisation de l'AZO-POE.

Complexe d'inclusion hôte/invité :

Une actinométrie de contrôle est réalisée selon le protocole décrit en partie « Actinométrie » avant d'irradier la solution d'intérêt. Des solutions de molécules hôtes α-, β-, γ-cyclodextrine sont préparées dans l'eau à des concentrations respectives de $3{,}6.10^{-3}$ mol.L^{-1} ; $9{,}9.10^{-3}$ mol.L^{-1} et 18.10^{-3} mol.L^{-1}.

Le mélange réactionnel est préparé en ajoutant 1 mL de solution de molécule hôte à 1 mL de solution de molécule invitée dans une cuve en quartz contenant un barreau aimanté. La cuve est ensuite irradiée successivement à 366 nm, 420 nm puis 366 nm de nouveau, dans les mêmes conditions que l'actinométrie. Les paramètres d'enregistrement des spectres au cours du temps sont présentés dans le Tableau 35.

	Expérience	Temps total d'analyse (s)	Nombre de scans
α-CD	Irradiation 1. 366 nm	150	150
	Irradiation 2. 420 nm	150	150
	Irradiation 3. 366 nm	150	150
β-CD	Irradiation 1. 366 nm	120	120
	Irradiation 2. 420 nm	110	110
	Irradiation 3. 366 nm	120	120
γ-CD	Irradiation 1. 366 nm	150	150
	Irradiation 2. 420 nm	150	150
	Irradiation 3. 366 nm	150	150

Tableau 35 : Programme utilisé pour suivre les cinétiques d'isomérisation de l'AZO-POE.

Etude de la photo-conversion des photochromes par RMN

4F-AZO-POE et 2Cl2F-AZO-POE :

Une solution d'azobenzène à $1{,}0.10^{-4}$ mol.L^{-1} est préparée dans D_2O et stockée dans un pilulier à 8°C à l'abri de la lumière. 0,6 mL de cette solution sont prélevés pour préparer un tube RMN et 0,6 mL de cette même solution sont irradiés dans le spectrophotomètre par la LED 530 nm poussée à sa puissance maximale et sans filtre. Plusieurs irradiations sont réalisées, entre lesquelles la solution est agitée mécaniquement. L'isomérisation est suivie par spectrophotométrie entre 190 nm et 800 nm jusqu'à ce que le spectre ne soit plus modifié par l'exposition à la lumière. La solution est ensuite utilisée pour préparer un tube RMN.
Environ 0,6 mL de solution à $1{,}0.10^{-4}$ mol.L^{-1} sont irradiés, de la même façon, à 530 nm. Une fois le PSS atteint, une seconde irradiation à 415 nm est réalisée de manière identique. Un troisième tube RMN est préparé à partir de cette solution. Les trois tubes sont analysés en RMN ^{1}H (500 MHz).

Terpolymère :

Une solution de 50 g.L^{-1} de terpolymère protégé est analysée par RMN ^{1}H avant d'être déprotégée et irradié pendant 15 min par une LED verte (530 nm, P=30 mW.cm^{-2}), pour atteindre le PSS-*cis*, puis par une LED bleue pendant 10 min (415 nm, P=90 mW.cm^{-2}), pour atteindre le PSS-*trans*. La spectroscopie RMN atteste de l'isomérisation et permet de caractériser les PSS.

Détermination de constantes d'association des complexes par spectroscopie RMN du proton

POE-OTs :

Une solution de poly(oxyde d'éthylène) tosylate de méthyle éther (ICBMS, UMR5246, Université Claude Bernard Lyon 1) est préparée à la concentration de 2.10^{-3} mol.L^{-1} dans D_2O. Une solution de β-CD à $1{,}9.10^{-2}$ mol.L^{-1} est préparée dans D_2O et chauffée jusqu'à solubilisation complète. Cinq solutions à 1.10^{-3} mol.L^{-1} sont préparées avec des quantités croissantes de β-CD comme reporté dans le Tableau suivant, et analysées en RMN ^{1}H. Les résultats sont modélisés par la linéarisation de Benesi-Hildebrandt.

Expérience	[CD] (mol/L)	$V_{POE-OTs}$ (mL)	V_{CD} (mL)	V_{D2O} (mL)
1	0	0, 3	0	0, 3
2	2.10^{-3}	0,3	0,06	0,24
3	4.10^{-3}	0,3	0,12	0,18
4	6.10^{-3}	0,3	0,18	0,12
5	8.10^{-3}	0,3	0 24	0,06

4F-AZO-POE :

Une solution d'4F-AZO-POE à $3,0.10^{-4}$ mol.L^{-1} est préparée. La solution est soumise 10 minutes au bain à ultra-sons et laissée une nuit à température ambiante dans le noir. Une solution de β-cyclodextrine à $6,0.10^{-3}$ est préparée dans l'eau. Le mélange est soumis 15 min aux ultra-sons à température ambiante pour finaliser la dissolution. Une deuxième solution à $3,0.10^{-4}$ mol.L^{-1} est réalisée par dilution de la première. Huit solutions du 4F-AZO-POE à $5,0.10^{-5}$ mol.L^{-1} et de plus en plus concentrées en cyclodextrine sont ensuite analysées par RMN ^{1}H. Les détails de ces solutions sont renseignés dans le tableau suivant.

Expérience	[CD] (mol/L)	V_{azo} (mL)	$V_{CD,0,3\ mM}$ (mL)	$V_{CD,6\ mM}$ (mL)	V_{EAU} (mL)
0	0,0	0,1		0	0,5
1	$2,5.10^{-05}$	0,1	0,05	-	0,45
2	$5,0.10^{-05}$	0,1	0,1	-	0,4
3	$2,5.10^{-04}$	0,1	0,5	-	0
4	$5,0.10^{-04}$	0,1	-	0,05	0,45
5	$1,3.10^{-03}$	0,1	-	0,13	0,37
6	$2,5.10^{-03}$	0,1	-	0,25	0,25
7	$5,0.10^{-03}$	0,1	-	0,5	0

Pour chaque tube RMN préparé, une première analyse permettant d'enregistrer le déplacement chimique du pic de l'eau (référence) est réalisée. Ensuite, le mélange est analysé par un programme irradiant le pic résiduel du solvant afin que son abondance ne gêne pas la lecture du déplacement chimique d'intérêt. Les données expérimentales sont interprétées par modélisation selon la linéarisation de Benesi-Hildebrandt puis pas le logiciel SA selon la modélisation disponible dans la partie expérimentale « Modélisation avec le logiciel SA ».

Test de turbidimétrie par spectrométrie UV-visible

4F-AZO-POE :

Trois solutions de 4F-AZO-POE sont préparées à 10.10^{-3} mol.L^{-1} dans trois solvants différents :

H_2O (1,05.10^{-2} mol.L^{-1}), D_2O (1,08.10^{-2} mol.L^{-1}) et PBS (1,05.10^{-2} mol.L^{-1}). Pour chaque mesure, la solution à analyser est versée dans une cuve de quartz qui est elle-même placée dans le porte-cuve thermostaté du spectrophotomètre Cary 100 Bio. Pour chacune des solutions, un blanc est mesuré avec le solvant puis 4 montée et descentes de température sont effectuées à 4 vitesses différentes (Tableau 36, Tableau 37, Tableau 38). L'observation est réalisée à 650 nm avec comme température de départ la température de fin de descente en température.

Etape	Acquisition des données (°C)	Rampe en température (°C/min)	Température de fin (°C)
1	0,5	2	18
2	0,5	2	9
3	0,5	1	18
4	0,5	1	9
5	0,5	0,75	18
6	0,5	0,75	9
7	0,5	0,5	18
8	0,5	0,5	9

Tableau 36 : Protocole de mesure de l'absorbance à 650 nm d'une solution de l'azo-4F dans D_2O en fonction de la température.

Etape	Acquisition des données (°C)	Rampe en température (°C/min)	Température de fin (°C)
1	0,5	2	38
2	0,5	2	18
3	0,5	1	38
4	0,5	1	18
5	0,5	0,75	38
6	0,5	0,75	18
7	0,5	0,5	38
8	0,5	0,5	18

Tableau 37 : Protocole de mesure de l'absorbance à 650 nm d'une solution de l'azo-4F dans H_2O en fonction de la température.

Etape	Acquisition des données (°C)	Rampe en température (°C/min)	Température de fin (°C)
1	0,5	2	33
2	0,5	2	13
3	0,5	1	33
4	0,5	1	13
5	0,5	0,75	33
6	0,5	0,75	13
7	0,5	0,5	33
8	0,5	0,5	13

Tableau 38 : Protocole de mesure de l'absorbance à 650 nm d'une solution de l'azo-4F dans le PBS en fonction de la température.

Terpolymère :

Une solution de 65,0 mg.L^{-1} de premier lot de terpolymère (Specific Polymers, SP-GELLIGHT-52) dans H_2O est préparée. Cette solution est analysée de la même façon que pour le 4F-AZO-POE. La solution est versée dans une cuve de quartz, placée dans le porte-cuve thermostaté d'un spectrophotomètre Cary 100 Bio. Pour chacune des solutions, un blanc est mesuré avec de l'eau puis 2 montées et 2 descentes de température sont effectuées à 2 vitesses différentes (Tableau 39). L'observation est réalisée à 650 nm avec comme température de départ la température de fin de descente en température.

Etape	Acquisition des données (°C)	Rampe en température (°C/min)	Température de fin (°C)
3	0,5	1	50
4	0,5	1	10
5	0,5	0,75	50
6	0,5	0,75	10

Tableau 39 : Protocole de mesure de l'absorbance à 650 nm d'une solution de terpolymère dans l'eau en fonction de la température.

Suivi de l'isomérisation cis→trans par retour thermique des azobenzènes 4F-AZO-POE et 2Cl-2F-AZO-POE

37 °C :

Deux solutions de 4F-AZO-POE et de 2Cl2F-AZO-POE sont préparées à 1,0.10^{-4} mol.L^{-1} dans l'eau. Les solutions sont irradiées 2 min à 366 nm pour l'4F-AZO-POE et 15 min à 530 nm pour l'2Cl2F-AZO-POE. La solution à mesurer est ensuite placée dans un bain sec à la température de retour thermique. Les spectres d'absorbance sont relevés au cours du temps.

60 °C :

Deux solutions de 4F-AZO-POE et de 2Cl2F-AZO-POE sont préparées à $1{,}0.10^{-4}$ mol.L^{-1} dans l'eau. Les solutions sont irradiées 2 min à 366 nm pour le 4F-AZO-POE et 15 min à 530 nm pour le 2Cl2F-AZO-POE. Elles sont ensuite placées dans le porte-cuve du spectromètre UV-Visible Cary 100 Bio dont la température est régulée à 60 °C. Les cuves sont équipées de barreaux aimantés et l'agitation magnétique est allumée pour la durée de l'analyse. L'absorbance des solutions est suivie à trois longueurs d'onde: 300 nm, 350 nm et 400 nm. Un point est relevé toutes les 30 secondes.

70 °C, 80 °C :

Une solution de 4F-AZO-POE à $1{,}0.10^{-4}$ mol.L^{-1} est préparée dans l'eau. 12 mL de cette solution sont irradiés soit 2 min par la LED à 366 nm. 6 piluliers en verre épais de 10 mL sont chacun remplis avec 3 mL de la solution irradiée. Les piluliers sont scellés et placés à l'étuve à la température du retour thermique. Les spectres d'absorbance sont relevés au cours du temps en prélevant à la seringue 1,5 mL de solution. Après le prélèvement, la solution est remise à l'étude. Pour le suivi à 70 °C, les solutions ayant servi à tracer les points à 0 et 2h sont prélevée à nouveau pour les points à 24 et 30h.

Modélisation avec le logiciel SA

Modèle pour l'actinométrie :

Le processus de photodégradation du ferrioxalate est considéré :

$$2\ K_3[Fe(C_2O_4)_3] \longrightarrow 2\ K_2[Fe(C_2O_4)_2] + K_2C_2O_4 + 2\ CO_2$$

Le modèle mathématique utilisé pour modéliser la cinétique de décoloration du ferrioxalate de potassium a été décrite dans Chapitre 2 de ce manuscrit.

Modèle pour les Job Plot [197,286]:

La modélisation de Job considère que le complexe hôte (H)/invite (G) H_mG_n est le seul formé et qu'il est donc le seul à engendrer une différence dans la propriété de milieu observée, par rapport au molécules libres. Le diagramme de Job atteint donc son maximum lorsque pour une solution où [H]/[G] = m/n. Le modèle représente l'équilibre suivant :

$$mAZO + nCD \underset{}{\overset{Ka}{\rightleftharpoons}} AZO_m@CD_n$$ avec $AZO_m@CD_n$ la représentation du complexe

- **Pour les complexes où n:m =1:1**, la constante d'association $K_{1:1}$ peut s'écrire :

$K_{1:1}$ = [AZO@CD]/([AZO].[CD])

Le déplacement chimique observé en RMN est décrit dans la littérature comme :

$\delta_{obs} = \delta_{AZO@CD}.([AZO@CD]/[AZO_0])$ avec $\delta_{AZO@CD}$ le déplacement du complexe seul

$\Leftrightarrow \delta_{obs} = X_{AZO}.\ \delta_{AZO} + X_{AZO@CD}.\ \delta_{AZO@CD}$

avec X_{AZO} et $X_{AZO@CD}$ les fraction molaires en AZO et en complexe

or $X_{AZO} = [AZO]/[AZO]_0$, $X_{AZO@CD} = [AZO@CD]/[AZO]_0$ et $X_{AZO} + X_{AZO@CD} = 1$.

$\delta_{obs} = X_{AZO}\ \delta_{AZO} + X_{AZO@CD}\ \delta_{AZO@CD}$

$= (1-X_{AZO@CD})\ \delta_{AZO} + X_{AZO@CD}\ \delta_{AZO@CD}$

$= \delta_{AZO} + X_{AZO@CD}\ (\delta_{AZO@CD} - \delta_{AZO})$

$\Rightarrow\ \Delta\delta_{obs} = \delta_{obs} - \delta_{AZO} = X_{AZO@CD}\ \Delta\delta_{max} = ([AZO@CD]/[AZO]_0).\Delta\delta_{max}$

Le Modèle calcule les concentrations pour X_{CD} croissant, en calculant *a posteriori* $\Delta\delta_{obs}$ qui fait intervenir [AZO@CD], permettant le lien entre modèle et expérience. $\Delta\delta_{max}$ a été déterminé en utilisant un échantillon contenant 100 fois plus de CD que d'AZO. Il peut également être déterminé par le modèle *a posteriori*.

- **Pour les complexes où n:m =1:2**, la constante d'association $K_{1:1}$ peut s'écrire :

$K_{1:2} = [AZO_2@CD]/([AZO]^2.[CD])$

De la même manière que pour le cas d'un complexe 1:1 mais avec $X_{AZO} + 2X_{AZO2@CD} = 1$

On a $\Rightarrow \Delta\delta_{obs} = \delta_{obs} - \delta_{AZO} = X_{AZO@CD}.(\delta_{AZO2@CD} - 2\delta_{AZO})$ et on peut écrire :

$\Delta\delta_{obs} = ([AZO_2@CD]/[AZO]_0).(\delta_{AZO2@CD} - 2\delta_{AZO})$

<u>Modèle pour le suivi cinétique de l'isomérisation photochimique de l'AZO-POE[169] :</u>

Trois processus sont considérés lors de l'irradiation de l'azobenzène libre en solution : les photoisomérisations directe et indirecte ainsi que la transformation thermique d'AZO-POE-C en AZO-POE-T :

$$\text{AZO-POE-T} \underset{k_{-1}}{\overset{}{\rightleftarrows}} \text{AZO-POE-C} \quad (\phi_D^{\lambda}, \phi_R^{\lambda})$$

La cinétique de retour thermique est évaluée en relevant l'absorbance au cours du temps de l'AZO-POE en solution après l'avoir isomérisé sous forme cis par irradiation à 366 nm. Les données obtenues sont traitées par un modèle d'ordre 1 et décrivent une cinétique très lente de l'AZO-POE-C vers l'AZO-POE-T à 23 °C, avec $k_{-1} = 7.10^{-6}\ s^{-1}$ (Figure 180). Cette valeur

correspond à un temps de demi-vie de plus de 27 h. Sa contribution est donc négligeable au cours des expériences de photochimie dont la durée ne dépasse pas 15 min. La présence d'un retour thermique est néanmoins prise en compte dans la modélisation avec k_{-1} fixée comme déterminée ici.

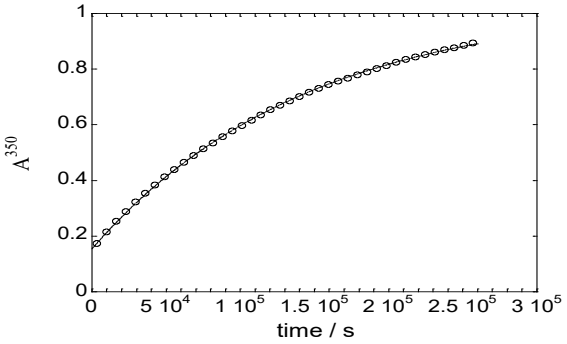


Figure 180 : Suivi de la réaction de relaxation thermique de l'AZO-POE-C en AZO-POE-T à 23 °C. L'absorbance à 350 nm est enregistrée pendant presque trois jours (ronds ouverts : données expérimentales, ligne continue : modélisation avec une loi du premier ordre, $k = 7.10^{-6}\ s^{-1}$). $[azo] = 4{,}3.10^{-5}\ mol.L^{-1}$.

Pour modéliser la photochimie, les équations suivantes seront utilisées par le modèle :

$$r_i = -\Phi_j^{\lambda}.\varepsilon_i^{\lambda}.[i].l_r.I_0^{\lambda}.F^{\lambda}$$

$$r = \frac{-d[AZO_T]}{dt} = \frac{d[AZO_C]}{dt} = r_T - r_C - k_{-1}.[r_T]$$

où $\mathbf{r_i}$ est la vitesse du processus photochimique et i représente l'AZO-POE-T ou -C.

$\mathbf{F^{\lambda}}$ est le facteur photocinétique tel que : $F^{\lambda} = (1 - 10^{-A^{\lambda}}) / A^{\lambda}$

$\mathbf{A^{\lambda}}$ est l'absorbance de la solution à la longueur d'onde λ telle que : $A^{\lambda} = (\varepsilon_T^{\lambda}.[AZO_T] + \varepsilon_C^{\lambda}.[AZO_C])\ l_r$,

$\boldsymbol{\varphi_j^{\lambda}}$ est le rendement quantique de la réaction photochimique de i à la longueur d'irradiation λ où j représente l'isomérisation directe (D) trans→cis et R ou l'isomérisation retour (R) cis→trans,

$\mathbf{I_0^{\lambda}}$ est le flux de photon incident à la longueur d'onde λ,

$\boldsymbol{\varepsilon_i^{\lambda}}$ est le coefficient d'extinction molaire du composé i à la longueur d'onde λ,

$\mathbf{l_r}$ est le trajet optique.

L'objectif de la modélisation est d'ajuster, par le calcul, les courbes obtenues expérimentalement pour en extraire les paramètres inconnus. A cette étape, les paramètres déjà connus sont les suivants : I_0^{λ} grâce à l'actinométrie, l_r (= 1 cm) imposé par la géométrie du système, ε_T^{λ} et ε_C^{λ} obtenus par les titrages en spectroscopie UV-Visible. Les paramètres restant à déterminer sont les rendements quantiques φ_D^{366}, φ_D^{420}, φ_R^{366} et φ_R^{420}. Les données utilisées

dans le logiciel sont les absorbances aux longueurs d'onde d'irradiation (366 nm et 420 nm) car elles déterminent l'évolution du facteur photocinétique F^{λ}. Trois cinétiques d'isomérisation sont présentées successivement au modèle :

1ère isomérisation : D'abord, l'isomérisation directe par irradiation à 366 nm seulement, pour laquelle ε_T^{λ} est ajusté afin que l'absorbance initiale calculée soit parfaitement superposée à l'absorbance initiale expérimentale. Cet ajustement permet d'assurer une modélisation correcte de la pente initiale. Cet ajustement est tolérable car il est toujours inférieur à la gamme d'erreur déterminée par titrage UV-Visible. Le paramètre ε_T^{λ} est ensuite fixé et les rendements quantiques à 366 nm sont déterminés par le modèle. De plus, pour assurer la bonne modélisation du point de départ de la deuxième expérience, le coefficient d'extinction molaire du produit de la première irradiation est laissé libre et ajusté, dans la gamme d'erreur tolérée.

2ème isomérisation : Les concentrations finales de chaque espèce sont relevées et entrées comme les conditions initiales de la deuxième expérience alors que tous les paramètres déterminés dans la première sont fixés. La deuxième irradiation est ensuite présentée au modèle qui détermine les deux rendements quantiques à 420 nm. Les conditions initiales de la troisième irradiation sont déterminées de la même façon que pour la deuxième.

3ème isomérisation : Tous les paramètres sont alors fixés et le calcul du modèle est alors comparé aux données expérimentales de la troisième expérience. Une reproduction à l'identique de l'expérience par la modélisation permet de valider ou invalider les paramètres précédemment extraits des premières et deuxièmes irradiations.

Finalement tous les paramètres sont ajustés une dernière fois, de façon simultanée en tenant comptes des trois irradiations afin de trouver leurs valeurs optimales.

Modèle pour la détermination de Ka par spectrométrie UV-Visible et par RMN :

Les constantes d'affinités déterminées par des expériences de dosage ont été modélisées par le logiciel SA en utilisant la méthode et les équations décrites par Thordarson[197].

Modèle pour le suivi cinétique de l'isomérisation photochimique des complexes entre AZO-POE et CD[169]

Pour cette dernière étape, les paramètres déjà connus sont les suivants : les intensités des LEDs, les coefficients d'absorption molaire aux longueurs d'onde d'irradiation des AZO-POE-T et AZO-POE-C libres en solution, les rendements quantiques des réactions d'isomérisation directe et inverse de l'AZO-POE pour les deux irradiations et les constantes d'affinités de chaque complexe AZO-POE/CD. On considère que la formation du complexe est bien plus rapide que

la réaction de photoisomérisation.

La procédure de modélisation est la même que celle utilisée pour le cas de l'AZO-POE seul avec en plus le phénomène de complexation AZO-POE/CD correspondant. De plus l'isomérisation de l'AZO-OE est associée à son éjection de la cyclodextrine. Trois modèles sont construits pour décrire les interactions entre l'AZO-POE et chaque cyclodextrine :

α-CD :

$$\text{AZO-POE-T} + \alpha\text{-CD} \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} \text{AZO-POE-T@}\alpha\text{-CD} \qquad \text{avec } Ka=k_1/k_{-1}$$

$$\text{AZO-POE-T@}\alpha\text{-CD} \rightleftharpoons \text{AZO-POE-C} + \alpha\text{-CD} \qquad (\phi^{366}_{AZO@CD},\phi^{420}_{AZO@CD})$$

Tous les paramètres sont connus et fixés mis à part les rendements quantiques du complexe lors des deux irradiations $\phi^{366}_{AZO@CD}$ et $\phi^{420}_{\text{AZO@CD}}$ qui sont à déterminer. En suivant la procédure employée pour l'azo seul, un paramètre est déterminé grâce aux modélisations de chacune des deux premières irradiations, la troisième expérience servant de validation du modèle avant le réajustement des deux inconnues à la fois.

β-CD :

$$\text{AZO-POE-T} + \beta\text{-CD} \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} \text{AZO-POE-T@}\beta\text{-CD} \qquad \text{avec } Ka_1=k_1/k_{-1}$$

$$\text{AZO-POE-C} + \beta\text{-CD} \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} \text{AZO-POE-C@}\beta\text{-CD} \qquad \text{avec } Ka_2=k_2/k_{-2}$$

$$\text{AZO-POE-T@}\beta\text{-CD} \rightleftharpoons \text{AZO-POE-C@}\beta\text{CD} \qquad (\phi^{366}_{AZO-T@CD},\phi^{420}_{AZO-T@CD},\phi^{366}_{AZO-C@CD},\phi^{420}_{AZO-C@CD})$$

La β-CD a la capacité de se lier aux deux isomères. Les quatre paramètres à déterminer lors de ces irradiations sont les rendements quantiques des deux isomères complexés.

NB : on considère que l'isomérisation de l'AZO-POE entraine sons éjection de la cavité.

γ-CD :

$$\mathbf{2}\ \text{AZO-POE-T} + \gamma\text{-CD} \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} \text{AZO-POE-T}_2\text{@}\gamma\text{-CD} \qquad \text{avec } Ka=k_1/k_{-1}$$

$$\text{AZO-POE-T}_2\text{@}\gamma\text{-CD} \rightleftharpoons 2\ \text{AZO-POE-C} + \gamma\text{-CD} \qquad (\phi^{366}_{AZO@CD},\phi^{420}_{AZO@CD})$$

Le modèle pour l'inclusion de deux azobenzènes dans la cavité de la γ-CD considère que seul ce complexe se forme en solution et que l'isomérisation des deux molécules invitées entraine leur éjection de la cavité. Seuls les deux rendements quantiques du complexe aux deux longueurs d'onde d'irradiation sont donc à déterminer pour ce complexe.

Déprotection du terpolymère :

Dans un ballon bicol de 10 mL, 100 mg de terpolymère sont pesés et dissous dans 2 mL de 1,4-dioxane. Un appareil de type Dean-Stark est monté sur le ballon, rempli de 1,4-dioxane et

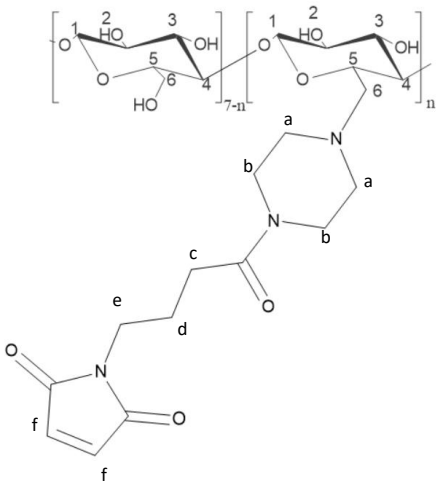
équipé d'un réfrigérant. Le mélange sous agitation magnétique est chauffé à 93 °C et placé sous et bullage d'argon par le septum fermant le second col, pendant 4h. Après 2h de chauffe, le Dean-Stark est vidé et rempli avec du 1,4-dioxane pur avant de relancer le chauffage pour les deux dernières heures. A la fin des 4 heures, le mélange est laissé à refroidir puis est irradié pendant 15 min à 530 nm (P=30 mW.cm^{-2}) protégé de la lumière. La LED est amenée jusqu'à environ 2 cm de la surface du mélange par sa fibre optique. Le mélange est ensuite transvasé dans un tube à hémolyse taré. Le 1,4-dioxane et le DMFu libre sont évaporés à l'évaporateur rotatif pendant 30 min à 40 °C et 5 min à 50 °C à 60 mbar puis le polymère est séché sous vide à la pompe à palette à température ambiante. L'huile rouge-orangée obtenue avec un rendement de 95% est conservée au congélateur jusqu'à son utilisation.

RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : 7,34 (m, -CF=CH-CH=CH-CF), 7,05 (t, -CF=CH-CH=CH-CF), 6,72 (s, -N-CO-CH=CH-CO(N)), 6,65 (d, -CH-CF=C($N_2C_6H_5F_2$)-CF=CH-), 3,43-4,32 (m, -O-CH_2-CH_2-O-), 3,39 (s, -O-CH_2-CH_2-O-CH_3), 2,10 (m, -CH_2- squelette), 1,22-1,4 (COOH-C(CH_3)$_2$- bout de chaine, -(CH2)10-CH3 bout de chaine), 0,6-1,22 (-CH3 squelette, -CH3 bout de chaine). $M_{n,NMR}$=19,600 g/mol.

RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : 177,32, 170,66, 160,20, 153,76, 153,69, 152,74, 151,69, 150,70, 134,19, 129,45, 112,62, 112,62, 112,45, 112,18, 112,04, 99,84, 99,46, 99,09, 98,89, 71,93, 70,56, 70,04, 69,23, 69,14, 68,43, 67,81, 67,08, 64,12, 63,88, 59,03, 44,85, 37,12, 31,90, 29,0-29,80, 27,18, 22,69, 19,59, 14,12.

Déprotection de la β-CD-maléimide-protégée :

Dans un ballon de 10 mL, 250 mg de β-CD-m_p sont dissous dans 3 mL de DMSO. Le mélange est chauffé à 93 °C sous agitation magnétique et bullage d'argon pendant 4h. La réaction est réalisée en milieu ouvert pour favoriser l'évaporation du groupement protecteur diméthylfurane. Une fois la réaction terminée, le mélange réactionnel est laissé à refroidir puis est précipité dans 40 mL d'un mélange 80 :20 éther diéthylique:acétone dans un tube de centrifugeuse. Le tube est centrifugé à 5 °C pendant 1h40 à 9000 tr/min. Le surnageant est ensuite éliminé et le solide orangé est lavé avec 40 mL d'acétone et de nouveau centrifugé à 5 °C pendant 1h40 à 9000 tr/min. Le surnageant est éliminé et la β-cyclodextrine maléimide déprotégée (β-CD-m) est séché dans une étude à vide, à température ambiante (25 °C).



RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm) : RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 6,90-7,05 (sl, H(f)), 5,60-6,15 ((m, OH(2) et OH(3)), 4,70-5,30 (m, H(1)), 4,2-4,7 (ml, OH(6)), 3-4 (m, H(2), H(3), H(4), H(5), H(6), H(a), H(b), H(e)), 2-3 (m, H(c), H(d)).

Spectroscopie de masse

ESI-TOF :

Un échantillon de β-CD tosylée est solubilisé dans du DMSO puis dilué au millième dans la phase mobile. Le spectre de masse ESI-TOF est acquis avec le spectromètre XEVO-G2QTOF (Waters) en ionisation par électrospray en mode positif et négatif. L'analyse est faite par couplage LC/MS avec un phase mobile composée d'un gradient de mélange A:B avec A : eau + 0,1% d'acide formique et B : acétonitrile + 0,1% d'acide formique (Tableau 40). Les températures de source et de désolvatation utilisées sont respectivement 130 °C et 450 °C. La tension de cône a été optimisée à 30 V. La détection se fait par spectroscopie de masse entre 100 et 2500 g.mol^{-1} ainsi qu'avec un détecteur UV à la longueur d'onde de 234 nm.

Gradient	Temps (min)	Débit (mL.min^{-1})	%A	%B
1	0	0,5	85	15
2	2	0,5	85	15
3	17	0,5	0	100
4	19	0,5	0	100
5	20	0,5	85	15
6	24	0,5	85	15

Tableau 40 : Gradient de A : eau + 0,1% d'acide formique et B : acétonitrile + 0,1% d'acide formique utilisés pour l'analyse LC/MS de la β-CD-m_p.

La détection masse est utilisée pour établir quel composé (branché n fois) de β-CD est présent dans la fraction qui sort au temps t. La détection UV est corrélée à la détection masse afin de déterminer quel signal sur le chromatogramme correspond à quelcomposé de β-CD. Il est ainsi possible de quantifier grossièrement chaque composé et de tracer la fraction de chaque composé en fonction du nombre de branches n.

Analyse élémentaire

Les échantillons sous forme de poudre sèche sont analysés par analyse élémentaire CHN. Pour chaque β-CD, les %m théoriques d'éléments C, H et N sont calculées pour un taux de substitution entre 1 et 7 puis comparés aux valeurs expérimentales, moyenne calculée sur 2 mesures. Les masses calculées pour les β-CD-m_P et β-CD-m en fonction du nombre de branches sont reportées dans les tableaux suivants.

Nombre de branches	Atomes β-CD-m_P (nombre)			%m éléments		
	C	N	H	C	N	H
1	60	3	93	49.21	2.87	6.36
2	78	6	116	52.23	4.69	6.47
3	96	9	139	54.31	5.94	6.55
4	114	12	162	55.84	6.86	6.61
5	132	15	185	57.00	7.56	6.66
6	150	18	208	57.92	8.11	6.69
7	168	21	231	58.66	8.55	6.72

Tableau 41 : Nombre calculé d'atomes de carbone (C), azote (N) et oxygène (O) pour la β-CD maléimide protégée et % théorique de chaque élément en fonction du nombre de branches fonctionnelles portées par la molécule.

Nombre de branches	Atomes β-CD-m (nombre)			%m éléments		
	C	N	H	C	N	H
1	54	3	85	47.40	3.07	6.22
2	66	6	100	49.50	5.25	6.25
3	78	9	115	51.06	6.87	6.27
4	90	12	130	52.27	8.13	6.29
5	102	15	145	53.24	9.13	6.31
6	114	18	160	54.03	9.95	6.32
7	126	21	175	54.68	10.63	6.33

Tableau 42 : Nombre calculé d'atomes de carbone (C), azote (N) et oxygène (O) pour la β-CD maléimide déprotégée et % théorique de chaque élément en fonction du nombre de branches fonctionnelles portées par la molécule.

Dosage des fonctions maléimides par le 1-octanethiol

105 mg de β-CD-m_p sont solubilisés dans 1,7 mL de DMSO-d_6 et déprotégé selon le protocole de déprotection. Le brut réactionnel est divisé en 6 piluliers et les masses calculées de β-CD-m sont données dans le Tableau 43.

	0	1	2	3	4	5
$m_{mél}$ (mg)	109,7	98,5	109,5	101,1	100,4	96,7
$m_{β\text{-}CD\text{-}m}$ (mg)	0	10,0	11,1	10,2	10,1	9,8
$m_{octanethiol}$ (mg)	0	0,57	1,19	1,57	2,06	2,63

Tableau 43: Paramètres expérimentaux du dosage de la β-CD-m par le 1-octanethiol.

Des quantités croissantes de 1-octanethiol sont ajoutés à 5 des 6 piluliers à partir d'une solution mère de 1-octanethiol dans le DMSO-d_6 à 14,8 $g.L^{-1}$, telles que reportées dans le Tableau 43. Les piluliers sont placés sous agitation magnétique pendant 1,5h à température ambiante. La spectroscopie RMN ^1H est utilisée pour analyser les 6 échantillons et quantifier les fonctions maléimides. Les tableaux suivants (Tableau 44) ont été utilisés pour déterminer la fonctionnalité moyenne de la β-CD-m en maléimide.

	I maléimide pour methyl octanethiol I=3	$n_{octanethiol}$ (mg)	$n_{octanethiol}$(mmol)	$n_{maléimide}$ restant (mmol)	$n_{maléimide}$ restant/g (meq/g)
tube 0	10.84*	0,00	0,0000		
tube 1	8	0,57	0,0039	0,0156	1,5667
tube 2	1,65	1,19	0,0081	0,0067	0,6078
tube 3	0,47	1,57	0,0107	0,0025	0,2463
tube 4	0,082	2,06	0,0141	0,0006	0,0569
tube 5	0,069	2,63	0,0180	0,0006	0,0635

* pour H1 CD I=7

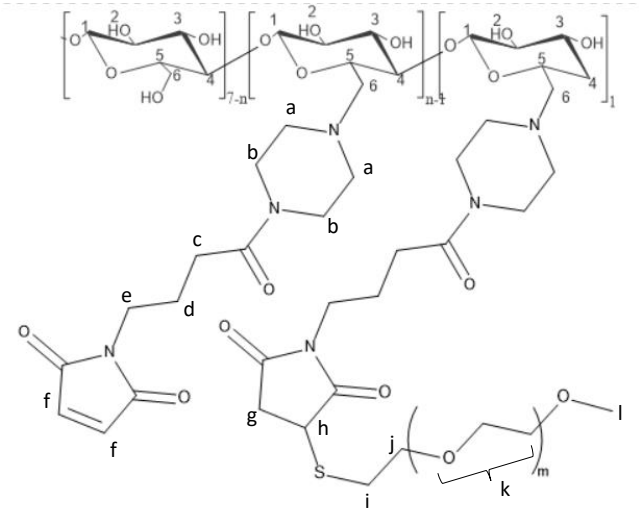
	$n_{maléimide}$ total (mmol)	$n_{maléimide}$ total (meq/g)	I proton H1 cyclodextrine	n_{CD}** (mmol)	$n_{maléimide}/n_{CD}$ total
tube 0			7		/
tube 1	0,0195	1,96	5,88	0,0033	5,95
tube 2	0,0149	1,34	2,28	0,0027	5,60
tube 3	0,0132	1,29	1,57	0,0024	5,51
tube 4	0,0146	1,44	1,29	0,0026	/
tube 5	0,0186	1,90	0,92	0,0024	/

** dosées en considérant l'octanethiol comme étalon interne

Tableau 44 : Tableau permettant de calculer la fonctionnalité approximative en maléimide de la β-CD maléimide par dosage avec l'octanethiol.

Synthèse de la β-CD-maléimide-POE (β-CD-m-POE)

Dans un pilulier de 4 mL, 98,5 mg de β-CD-m_P sont dissous dans 1 mL de DMSO sec. Le mélange est chauffé à 93 °C sous agitation magnétique et bullage d'argon en milieu ouvert pendant 4h. Une solution à 1 équivalent de POE-monothiol 6000 $g.mol^{-1}$ (Sigma Aldrich, Etats-Unis) par rapport à la β-CD-m est préparée dans du DMSO sec à la concentration de 190 $mg.mL^{-1}$, soit 142 mg dans 0,75 mL. La solution de POE-monothiol est ajoutée par un goutte-à-goutte manuel sur la solution de β-CD-m sous agitation vigoureuse. Le mélange est laissé sous argon et sous agitation pendant une nuit à température ambiante. 2 mL d'eau sont ajoutés au mélange sous agitation. Le DMSO est éliminé par dialyse dans un tube de dialyse équipé d'une membrane de taille de pore moyenne de 1000 $g.mol^{-1}$. La disparition du DMSO est suivie par RMN ^1H dans le MeOD. Il faut au moins 3 jours de dialyse avec des changements d'eau réguliers pour éliminer le DMSO résiduel. La β-CD-m-POE est obtenue comme une poudre beige clair après lyophilisation.



RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm) : 6,90-7,05 (sl, H(f)), 5,4-6,2 ((m, OH(2) et OH(3)), 4,75-5,35 (m, H(1)), 4,20-4,70 (m, OH(6)), 3,30-40 (m, H(2), H(3), H(4), H(5), H(6), H(a), H(b), H(e), H(h), H(j), H(k)), 3,26 (s, H(l)), 2-3 (m, H(c), H(d), H(g), H(i)).

Déprotection de la β-CD-bismaléimide-protégée (β-CD-2m$_p$)

Dans un pilulier de 4 mL, 108,3 mg de β-CD-2m$_P$ sont dissous dans 1,6 mL de DMSO sec. Le mélange sous agitation magnétique est chauffé à 93 °C sous bullage d'argon en milieu ouvert pendant 4h. Une fois la réaction terminée, le mélange réactionnel est laissé refroidir puis 1,6 mL d'eau distillée y sont ajoutés. Le produit est précipité dans 30 mL d'acétone dans un tube de centrifugeuse puis centrifugé à 4500 rpm pendant 3h à 5 °C. Le surnageant est évacué et le produit est resolubilisé dans 3 mL d'eau distillée avec l'aide d'ultrasons pendant 3 min. Le produit est reprécipité dans 30 mL d'acétone et centrifugé à 4500 rmn pendant 2h à 5 °C. Les étapes de solubilisation et précipitation sont répétées une troisième fois puis le solide est séché sous flux d'argon pendant 5min avant d'être récupéré dans un pilulier de 4 mL et séché sous vide, jusqu'à stabilisation de sa masse. La β-CD-2m est obtenue comme un solide rosé avec un rendement de 75 %.

Quantification des fonctions par RMN ^{1}H

Les quantifications par étalonnage interne ont été réalisées en préparant une solution d'échantillon ($S_{éch}$) de concentration connue dans un tube RMN et une solution d'étalon ($S_{étalon}$) de concentration connue dont une masse précise ($m_{étalon}$) a été introduite dans un capillaire. Le capillaire a été introduit à son tour dans le tube RMN pour l'analyse en RMN ^{1}H. La comparaison des intégrales entre l'étalon et les signaux des fonctions à doser permet de déterminer la fonctionnalité du composé échantillon.

Fonctions du Terpolymère :

$S_{étalon}$: solution de 26 g.L^{-1} de nitrométhane dans le chloroforme deutéré ; $S_{éch}$: solution de 17 g.L^{-1} de terpolymère dans le chloroforme deutéré ; $m_{étalon}$: 16,7 mg.

Maléimides β-CD-m :

$S_{étalon}$: solution de 56 g.L^{-1} de chloroforme pur dans le DMSO-d_6 ; $S_{éch}$: solution de 6,4 g.L^{-1} de β-CD-m dans le DMSO-d_6 ; $m_{étalon}$: 35 mg.

Maléimides de la β-CD-m-POE :

$S_{étalon}$: solution de 65,6 g.L^{-1} de DMF pur dans le DMSO-d_6 ; $S_{éch}$: solution de 32 g.L^{-1} de β-CD-m-POE dans le DMSO-d_6 ; $m_{étalon}$: 44,3 mg.

Maléimides de la β-CD-2m :

$S_{étalon}$: solution de 65,6 g.L^{-1} de DMF pur dans le DMSO-d_6 ; $S_{éch}$: solution de 11,4 mg de β-CD-2m dans le DMSO-d_6 ; $m_{étalon}$: 44,3 mg.

Thiols des POE-thiols :

POE-4SH : $S_{étalon}$: solution de 13,1 mg de nitrométhane dans le chloroforme deutéré; $S_{éch}$: solution de 8,5 mg de thiol dans le chloroforme deutéré.
POE-2SH : $S_{étalon}$: solution de 4,5 mg de nitrométhane dans le chloroforme deutéré; $S_{éch}$: solution de 8,9 mg de thiol dans le chloroforme deutéré.
POE-SH : $S_{étalon}$: solution de 121 g.L^{-1} de nitrométhane dans le chloroforme deutéré; $S_{éch}$: solution de 11,2 mg de thiol dans le chloroforme deutéré ; $m_{étalon}$: 9,5 mg.

Plan d'expériences

Optimisation de Doehlert :

Un tableau uniforme de Doelhert[225] a été choisi ici afin d'être capable de dessiner des surfaces de réponse. La forme générale du modèle polynomial du second ordre pour un plan de Doehlert est :

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^{k} b_i X_i + \sum_{i=1}^{k} b_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=2}^{k} b_{ij} X_i X_j$$

avec j>i, k le nombre de variables étudiées, b_0 la moyenne des réponses expérimentales, b_i l'effet principal de la variable encodée X_i, b_{ii} l'effet quadratique de la variable encodée X_i, et b_{ij} l'effet d'interaction du premier ordreentre les variables encodées X_i et X_j.

Matrice expérimentale du premier plan d'expériences :

Expérience	X1*	X2*	X3*	tétrathiol/dithiol	%m polymère	AZO/β-CD
1	1	0	0	100/0	20	50/50
2	-1	0	0	0/100	20	50/50
3	0,5	0,866	0	75/25	30	50/50
4	-0,5	-0,866	0	25/75	10	50/50
5	0,5	-0,866	0	75/25	10	50/50
6	-0,5	0,866	0	25/75	30	50/50
7	0,5	0,288	0,816	75/25	23	60/40
8	-0,5	-0,288	-0,816	25/75	17	40/60
9	0,5	-0,288	-0,816	75/25	17	40/60
10	0	0,577	-0,816	50/50	26	40/60
11	-0 ,5	0,288	0,816	25/75	23	60/40
12	0	-0,577	0,816	50/50	14	60/40
13	0	0	0	50/50	20	50/50

*X1, X2 et X3 sont les coordonnées codées de la matrice de Dohlert.

Matrice expérimentale du deuxième plan d'expériences :

Expérience	X1*	X2*	X3*	tétrathiol/dithiol	%m polymère	AZO/β-CD
1	1	0	0	100/0	23	50/50
2	-1	0	0	0/100	23	50/50
3	0,5	0,866	0	75/25	30	50/50
4	-0,5	-0,866	0	25/75	16	50/50
5	0,5	-0,866	0	75/25	16	50/50
6	-0,5	0,866	0	25/75	30	50/50
7	0,5	0,288	0,816	75/25	25	60/40
8	-0,5	-0,288	-0,816	25/75	21	40/60
9	0,5	-0,288	-0,816	75/25	21	40/60
10	0	0,577	-0,816	50/50	28	40/60
11	-0 ,5	0,288	0,816	25/75	25	60/40
12	0	-0,577	0,816	50/50	18	60/40
13	0	0	0	50/50	23	50/50

*X1, X2 et X3 sont les coordonnées codées de la matrice de Dohlert.

Synthèse de gel maléimide-thiol selon différentes techniques de mélangeage

Une solution de POE-tétramaléimide à 20 000 g.mol^{-1} (Sigma Aldrich, Etats-Unis) à 240

mg.mL^{-1} et une solution de POE-dithiol à 8500 g.mol^{-1} (Polymer Source, Canada) à 488 mg.mL^{-1} sont préparées dans le PBS. La Figure 181 montre les deux systèmes utilisés pour le mélangeage des gels.

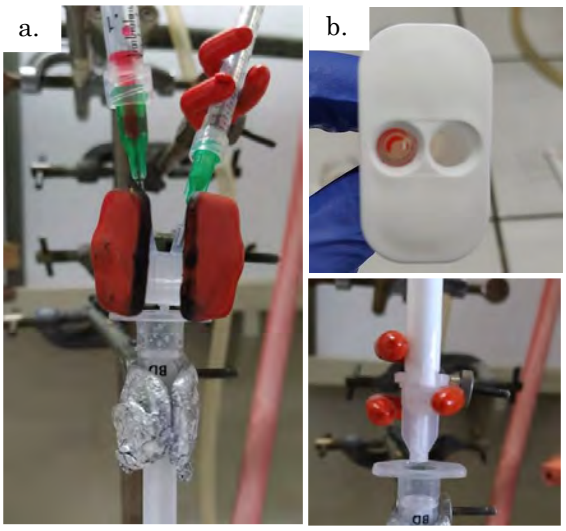


Figure 181 : Photographies des montages de mélange a. avec mélangeur en Y et b. avec double seringue équipée d'un mélangeur à vis.

Méthode mélangeur en Y **:** 150 µL de solution de maléimide et 300 µL de solution de thiol sont versées dans deux seringues distinctes de 1 mL. Ces seringues équipées d'aiguilles de diamètre 1mm sont reliées par des tubulures souples au mélangeur en Y dont la sortie est placée au-dessus du moule. Une fois le montage préparé, les pistons des deux seringues sont poussés de façon synchrone et le mélange est récupéré dans le moule puis laissé gélifier à température ambiante.

Méthode mélangeur à vis : de la même façon que pour le mélangeur en Y chaque solution mère de thiol et de maléimide et versée dans les deux demi-seringues de la double seringue équipée de son mélangeur à vis. Le double piston est poussé et le mélange récupéré en sortie de mélangeur dans un moule. Un premier gel est coulé en utilisant 150 µL de solution de maléimide et 300 µL de solution de thiol, un second avec 300 µL de solution de maléimide et 150 µL de solution de thiol.

Synthèse de gel sans β-CD

Des hydrogels sans β-CD ont été préparés à partir de terpolymère et de POE-tétrathiol et formulés à partir de 100% de POE-tétrathiol et de 10%m de polymère. Une solution de terpolymère a été préparée à 122 mg.mL^{-1} dans l'eau et une solution de tétrathiol a été préparée à 80 mg.mL^{-1} dans l'eau. Trois hydrogels identiques ont été formés en mélangeant 164 µL de

solution de terpolymère et 69 µL de solution de thiol. Les gels ont été démoulés après une nuit à 4°C dans le noir.

Synthèse de gel à base de β-CD-m

Dans un mélange DMSO:H_2O 15:85 en masse :

Formulation	$m_{cyclodextrine}$ (mg)	$m_{terpolymère}$ (mg)	m_{4SH} (mg)	m_{2SH} (mg)	$m_{solvant}$ (mg)
DMSO:H_2O 15:85	16,8	34,3	37,4	66,5	585 (H_2O) 113 (DMSO)

La β-CD-m pesée est solubilisée dans la quantité indiquée de DMSO puis mélangée à une solution de terpolymère dans l'eau. La solution se trouble. Elle est mélangée à une solution préparée avec les thiols pesés dans l'eau. Le gel peut être moulé mais reste opaque.

Synthèse de gel à base de β-CD-m-POE :

En suivant le premier plan d'expériences :

Huit gels sont formulés selon le premier plan d'expériences avec les paramètres suivants :

x	β-CD-POE-m
y	Terpolymère 1
z	Tétrahiol 5K
w	Dithiol 9K

Mx (g/mol)=	8700
My (g/mol)=	20400
Mz (g/mol)=	5000
Mw (g/mol)=	8900

f(thiol,z)	3,3
f(thiol,w)	2
f(malé,x)	4,8
f(malé,y)	2,5
f(azo,y)	3

Les masses molaires de y, z et w proviennent des données fournisseurs, la masse molaire de la β-CD-m-POE a été calculée. f(thiol,z) a été dosé par étalonnage interne, f(malé,x) a été calculé par dosage par étalonnage interne des maléimides de la β-CD-m puis soustraction de 1 décrivant la substitution moyenne de 1 maléimide par le POE-SH (6000 $g.mol^{-1}$). f(malé,y) et f(azo,y) ont été dosées par étalonnage interne sur le premier lot de terpolymère (SP-GELLIGHT-52) reçu en faible quantité. f(thiol,w) a été déterminé arbitrairement car non encore quantifié.

Les formulations de gels ont été préparées à partir du Tableau 45 sur 850 mg de matière avec les quantités de réactifs regroupées dans le Tableau 46. Les formulations 1 et 7 ont été préparées par pesée directe de chaque composé. Ces pesées engendrant trop de pertes de cyclodextrine et de terpolymère, les six autres formulations ont été préparées à partir de solutions mères de terpolymère (S_1: 200,9 $mg.mL^{-1}$ et S_2: 100,5 $mg.mL^{-1}$) et de β-CD-m-POE (447 $mg.mL^{-1}$) dans l'eau.

Formulation	$m_{cyclodextrine}$ (mg)	$m_{terpolymère}$ (mg)	m_{4SH} (mg)	m_{2SH} (mg)	m_{eau} (mg)
1	70,8	55,3	69,4	0	654,5
3	82,7	64,7	67,5	40,1	595,0
5	27,6	21,6	22,5	13,4	765,0
7	77,1	40,2	59,8	35,5	637,5
8	39,3	46,1	14,7	78,4	671,5
9	50,0	58,6	43,8	26,0	671,5
10	59,6	69,8	39,1	69,5	612,0
13	48,9	38,2	29,8	53,1	680,0

Tableau 45 : Masses théoriques calculées pour des gels de 850 mg selon les paramètres du premier plan d'expériences.

Formulation	$m_{cyclodextrine}$ (mg)	$m_{terpolymère}$ (mg)	m_{4SH} (mg)	m_{2SH} (mg)	m_{eau} (mg)
1	64,8	50,9	64,1	0	780
3	89,9	70,1	73,1	45,4	646
5	27,6	21,7	22,8	13,7	773
7	76,1	39,9	58,5	36,1	766
8	26,5	40,1	12,8	67,2	680
9	43	50,5	37,7	23,9	750
10	14,0	16,7	9,2	16,8	163
13	52,9	39,5	31	54,3	713

Tableau 46 : Masses réelles pesées pour les gels du premier plan d'expériences, premier lot.

Le terpolymère et la β-CD maléimide sont pesés dans un même pilulier en verre tandis que les thiols sont pesés dans un second pilulier. L'eau est ajoutée en répartissant la quantité nécessaire dans les deux piluliers pour que tous les composés soient solubles. Les deux piluliers sont ensuite mis dans un bain à ultrasons pendant quelques minutes. Une fois tous les composants du gel solubilisés, les deux solutions sont versées simultanément dans un moule puis agitées manuellement. Les gels sont laissés réticulés pendant 30 min à température ambiante (15 °C) puis démoulés avant d'être lavés dans de l'eau distillée avec au moins 3x5 mL sous agitation légère pendant 24h.

<u>En suivant le deuxième plan d'expériences :</u>

Six gels sont formulés selon le deuxième plan d'expériences avec les paramètres suivants :

x	β-CD-POE-m
y	Terpolymère 2
z	Tétrahiol 5K
w	Dithiol 9K

a (mol BCD/g BCD2)=	0,00012
b (mol malé /g BCD2) =	0,0000283
c (mol malé/g terpo)=	0,000322
d (mol azo/g terpo)=	0,000279
e (mol thiol/g tetrathiol) =	0,00056
f (mol thiol/g dithiol) =	0,000306

Les constants a, b, c, d, e et f proviennent de dosages par étalonnage interne en RMN. Le terpolymère utilisé provient du lot final fourni par Specific Polymers (SP-GELLIGHT-55), le POE-tétrathiol du premier lot de chez Sigma Aldrich et le POE-dithiol du premier lot de Polymer Source.

Les formulations de gels ont été préparées à partir du Tableau 47 sur 500 mg de matière avec les quantités de réactifs regroupées dans le *sur 350 mg de gel

Tableau 48. Une solution mère de β-CD-m-POE (235 $mg.mL^{-1}$) dans l'eau est utilisée, mélangée au terpolymère solide.

Formulation	$m_{cyclodextrine}$ (mg)	$m_{terpolymère}$ (mg)	m_{4SH} (mg)	m_{2SH} (mg)	m_{eau} (mg)
1	66,6	28,6	19,8	0	385
2	58,2	25,0	0	31,7	385
4	41,8	18,0	3,1	17,1	420
9	48,7	31,4	15,4	9,4	395
12*	35 ,8	10,5	5,4	9,8	
13	62,1	26,7	9,7	16,9	385

*sur 350 mg de gel

Tableau 47 : Masses théoriques calculées pour les gels du premier plan d'expériences, deuxième lot.

Formulation	$m_{cyclodextrine}$ (mg)	$m_{terpolymère}$ (mg)	m_{4SH} (mg)	m_{2SH} (mg)	m_{eau} (mg)
1.2	66,1	28,3	20,1	0	387
2.2	58,1	25,9	0	30,7	395
2.2	58,5	24,5	0	31,9	387
4.2	41,2	17,6	3,3	17,1	422
9.2	48,2	31,4	16,4	11,2	397
12.2*	36,1	10,6	5,4	9,7	
13.2	61,7	27,4	9,7	17,4	386

*sur 350 mg de gel

Tableau 48 : Masses réelles pesées pour les gels du premier plan d'expériences, premier lot.

Le terpolymère et la solution de β-CD-m-POE sont pesés dans un même pilulier en verre tandis

que les thiols sont pesés dans un second pilulier. L'eau est ajoutée en répartissant la quantité nécessaire dans les deux piluliers pour que tous les composés soient solubles. Les deux piluliers sont ensuite mis dans un bain à ultrasons pendant quelques minutes puis dans un bain de glace pendant 20 min. Une fois tous les composants du gel solubilisés et refroidis, les deux solutions sont versées dans des seringues et mélangées par l'intermédiaire du mélangeur en Y comme décrit plus haut. Les gels sont laissés réticulés pendant 1h à température ambiante (25 °C) puis démoulés avant d'être lavés dans de l'eau distillée avec au moins 3x5 mL sous agitation légère pendant 24h.

Synthèse de gel à base de β-CD-2m

<u>En suivant le premier plan d'expériences :</u>

Quelques gels sont formulés avec la β-CD bismaléimide selon le premier plan d'expériences avec les paramètres suivants :

x	β-CD-2m
y	Terpolymère 2
z	Tétrahiol 5K
w	Dithiol 9K

a (mol BCD/g BCD2)=	0,000726
b (mol malé /g BCD2) =	0,0000839
c (mol malé/g terpo)=	0,000322
d (mol azo/g terpo)=	0,00025
e (mol thiol/g tetrathiol) =	0,00075
f (mol thiol/g dithiol) =	0,000149

Le terpolymère utilisé provient du lot final fourni par Specific Polymers, le POE-tétrathiol du deuxième lot de chez Sigma Aldrich et le POE-dithiol du premier lot de Polymer Source.

Remarque : Dans ces expériences, la fonctionnalité du dithiol a été sous-estimée, les gels suivant ont donc un rapport entre maléimide et thiol approchant 1:2 plutôt que 1:1.

Les formulations de gels ont été préparées à partir du Tableau 49 sur 400 mg de matière avec les quantités de réactifs regroupées dans le Tableau 50. La β-CD-2m et le terpolymère sont pesés directement à l'état solide avant leur mise en solution.

Formulation	$m_{cyclodextrine}$ (mg)	$m_{terpolymère}$ (mg)	m_{4SH} (mg)	m_{2SH} (mg)	m_{eau} (mg)
5	4,6	13,4	8,2	13,8	360
13	7,2	21,0	8,6	43,1	320

Tableau 49 : Masses théoriques calculées pour les gels à base de β-CD-2m.

Formulation	$m_{cyclodextrine}$ (mg)	$m_{terpolymère}$ (mg)	m_{4SH} (mg)	M_{2SH} (mg)	$m_{solvant}$ (mg)
5.3	4,4	15,3	8,2	13,9	373
5.3_{DMSO} (12% DMSO)	4,6	14,9	8,5	13,7	312 (NaCl) 48,5 (DMSO)
13.3	7,3	23,7	8,7	43,4	322
$13.3_{PEPTIDE}$ (0,17% peptide)	7,2	23,0	8,6	39,5 (POE-2SH) 0,85 (peptide)	325

Tableau 50 : Masses réelles pesées pour les gels à base de β-CD-2m.

Synthèse de gels pour l'étude des propriétés de gonflement

Trois hydrogels F1, F2 et F3 ont été formulés à partir d'un mélange 1:1 entre β-CD:AZO(terpolymère) broyée à la main pendant au moins 15 min avant la mise en solution. La concentration massique finale du gel est fixée à 10 %m. F1 est formulé avec la β-CD-m-POE à partir d'un rapport 75/25 de tétrathiol/dithiol tandis que F2 et F3 sont formulés pour 100% de tétrathiol à partir de β-CD-m-POE et β-CD-2m, respectivement.

Nom	$m_{cyclodextrine}$ (mg)	$m_{terpolymère}$ (mg)	m_{4SH} (mg)	m_{2SH} (mg)	$m_{solvant}$ (mg)
F1	22,0	16,0	14,3	24,2	700
F2	10,3	7,4	8,8	0	240
F3	3,8	16	6,6	0	250

Après le broyage et la mise en solution du mélange β-CD/terpolymère, la solution est mélangée à la solution de thiol préparée en amont et le gel est laissé prendre la nuit à 4 °C.

Taux de gonflement

Les gels sont démoulés et pesés avant d'être plongés dans leur solvant (eau ou solution aqueuse de NaCl à 0,15 mol.L^{-1}). Le taux de gonflement des hydrogels a été étudié par la méthode classique de gravimétrie. Les gels sont pesés au démoulage puis plongés 9 mL de solution aqueuse dans une plaque 6 puits, à 4 °C sans agitation, jusqu'à atteindre l'équilibre. La masse des gels est relevée au cours du temps pour tracer la cinétique de gonflement.

Microscopie électronique à balayage (MEB)

Quatre découpes de gel d'environ 8 mm^3 environ sont préparées à partir des gels 4.2, 13.2 et 12.2. Trois de ces gels, le 4.2, le 13.2 et un 12.2, sont irradiés pendant 10 min par une LED à 415 nm (90 N,cm^{-2}). Un deuxième gel 12.2 est irradié 30 min avec une LED à 520 nm (30

N,cm^{-2}). Les gels sont ensuite insérés entre deux portes échantillons pour congélation haute pression (HPF pour « high-pressure freezing »), dédiés à la cryofracture (Leica) puis immédiatement chargés dans le microscope ICE HPF (EM-ICE, Leica, Nanterre, France) comme décrit par Payre *et coll.*[287] Les échantillons sont fixés et congelés pendant 5 ms à 2050 bar puis sont transférés dans des flacons de stockages cryogéniques dans l'azote liquide. Le porte échantillon contenant le gel congelé est ensuite inséré dans la chambre de préparation (Quorum PP3000T). Pour ce transfert, un adaptateur de support d'échantillons cryogénisés est utilisé en suivant la description de Payre *et coll.*[287] Après un transfert rapide sous vide dans la chambre de préparation, l'échantillon est fracturé à -140 °C, sublimé à -95 °C pendant 20 min puis recouvert d'une pulvérisation de platine (métallisation). L'échantillon est finalement transféré dans la chambre d'observation cryo-MEB (Quanta 250 FEG) et conservé à -140 °C pour l'observation avec un microscope électronique à balayage (FEI Quanta 250 FEG) à une tension d'accélération de 5 kV.

Caractérisation UV-Visible d'un hydrogel

Une tranche du gel 5.3_{DMSO} est découpée et placée entre deux lames de verre fixées entre elles par de la pâte adhésive. L'hydrogel est analysé avant et après des irradiations à 415 nm ou 530 nm pendant 15 min en utilisant le module sphère d'intégration du spectrophotomètre Varian Cary 100 Bio.

Expériences de nanoindentation par microscopie à Force Atomique (AFM)

Les expériences de nanoindentation sont effectuées sur des hydrogels synthétisés et gonflés comme décrit précédemment. Une tranche de gel la plus fine (e < 1 mm) et la plus plane possible est découpée depuis un hydrogel gonflé à l'aide d'une lame de rasoir. La tranche est ensuite fixée sur une lame ou lamelle de verre à l'aide de vernis à ongle. L'échantillon est ensuite immergé dans son solvant en attendant, et pendant la durée de l'expérience. Les propriétés mécaniques des gels ont été déterminées en milieu aqueux, eau ou solution aqueuse NaCl (0,15 mol.L^{-1}) à température ambiante (ou contrôlée quand spécifié), soit sur lame de verre, soit sur lamelle de verre dans la cellule BioCell®(JPK Instruments, Allemagne). Les échantillons ont été analysés par des pointes MLCT-C (Bruker, Etats-Unis) de constante de raideur du ressort k= 0,01 N.m^{-1}, ou MLCT-D (Bruker, Etats-Unis) de constante de raideur du ressort k= 0,03 N.m^{-1}, pyramidale (angle du demi-cône α=17,5°). Les constantes de raideurs sont toujours

calibrées selon la méthode de fluctuation thermique inclue dans le logiciel de contrôle de JPK. La relation entre le signal et la défection du levier a été obtenue grâce à la courbe de force réalisée sur lame de verre, dans les conditions de solvant et température de l'expérience. Les propriétés mécaniques des hydrogels ont été suivies en temps réel sous irradiation par l'intermédiaire de courbes de force-déplacement. Deux procédures ont été utilisées pour étudier les propriétés des matériaux au cours du temps :

- L'enregistrement de courbes de force au cours du temps en un même point du matériau. Cela implique de supposer que le matériau est uniforme, ou répond de manière isotropique à un stimulus lumineux.
- L'enregistrement de « carte de force » consistant à l'enregistrement de 256 ou 1024 mesures sur des surfaces variant de 10x10 à 2x2 μm^2 en fonction des cas, au cours du temps et/ou en début et fin de chaque irradiation.

Le module d'Young (E) est extrait pour chaque courbe en utilisant le logiciel de traitement de données JPK data ainsi que le modèle conique de Sneddon suivant :

$$F = \frac{2.E.tan\alpha}{\pi(1-\nu^2)}\,\delta^2$$

où ν est le coefficient de Poisson, arbitrairement fixé à 0,5 et δ l'indentation mesurée. Les modules d'Young mesurés sont ensuite tracés au cours du temps.

Fluorescence des 4F-AZO-POE et du terpolymère

Les expériences de spectroscopie en fluorescence sont réalisées avec le Fluorolog 3-2 iHR 320 dans une cuve de quartz de trajet optique l=1 cm. Une solution de 4F-AZO-POE est préparée à $3{,}5.10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ dans le DMSO. Une solution de terpolymère (protégé) est préparée à 2,7 $mg.mL^{-1}$ dans le DMSO. Les solutions échantillons sont préparées par dilution avec de l'eau distillée ou du DMSO comme indiqué dans le Tableau qui suit :

Solution	%m d'eau ajouté	$V_{solution}$ (mL)	V_{DMSO} (mL)	V_{EAU} (mL)
4F-AZO-POE	0	150	450	0
	100	150	150	300
	200	150	50	400
	300	150	0	450
Terpolymer	0	150	450	0
	100	150	150	300
	200	150	50	400
	300	150	0	450

Les solutions sont excitées à 373 nm et la fluorescence est enregistrée entre 400 et 700 nm avec

une fenêtre d'ouverture de 6 nm pour les solutions de 4F-AZO-POE et de 4 nm pour les solutions de terpolymère.

Etude de la complexation entre terpolymère et β-CD en RMN ^{1}H et ^{19}F

Dans D_2O :

Un solution de terpolymère sous la forme *trans* a été préparée dans le D_2O à 10,0 mg.mL^{-1}. La solution est passée 10 minutes au bain à ultra-sons et laissée une nuit à température ambiante dans le noir. Le jour de l'analyse, la solution est irradiée 15 min à 530 nm sous agitation pour passer le 4F-AZO sous forme *cis*. Une solution de β-cyclodextrine à 1,0.10^{-2} mol.L^{-1} est préparée dans le D_2O avant l'analyse. Six solutions de terpolymère à 2,0 mg.mL^{-1} et de plus en plus concentrées en cyclodextrine sont ensuite analysées par RMN du proton et du fluor. Les détails de ces solutions sont renseignés dans le tableau suivant :

Expérience	[CD] (mol.L^{-1})	V_{azo} (mL)	V_{CD} (mL)	V_{D2O} (mL)
1	0	0,1	0	0,400
2	1,5.10^{-04}	0,1	0,0075	0,3925
3	3,0.10^{-04}	0,1	0,015	0,385
4	6.10^{-03}	0,1	0,03	0,37
5	1,5.10^{-03}	0,1	0,075	0,325
6	3.10^{-03}	0,1	0,150	0,250
7	6.10^{-03}	0,1	0,300	0 ,100

Pour chaque échantillon analysé en RMN ^{1}H (500 MHz), un spectre de D_2O est enregistré avant d'analyser l'échantillon avec une séquence qui irradie le pic du solvant.

Dans DMSO-d_6 :

Un solution de terpolymère sous la forme *trans* a été préparée dans le DMSO-d_6 à 15,7 mg.mL^{-1}. La solution est placée 10 minutes dans un bain à ultra-sons. Une solution de β-cyclodextrine à 1,05.10^{-2} mol.L^{-1} est préparée dans le DMSO-d_6 avant l'analyse. Six solutions de terpolymère à 2,8 mg.mL^{-1} et de plus en plus concentrées en cyclodextrine sont ensuite analysées par RMN du proton et du fluor. Les détails de ces solutions sont renseignés dans le tableau suivant.

Expérience	[CD] (mol/L)	V_{azo} (mL)	V_{CD} (mL)	V_{DMSO} (mL)
1	0	0,09	0	0,410
2	$2,5.10^{-04}$	0,09	0,012	0,389
3	$5,0.10^{-04}$	0,09	0,024	0,386
4	1.10^{-03}	0,09	0,048	0,362
5	$2,5.10^{-03}$	0,09	0,120	0,290
6	5.10^{-03}	0,09	0,240	0,170

Analyse NOESY du terpolymère en solution (I. Hamouda, IMMM)

Deux solutions de terpolymère sont préparées à 20 $mg.mL^{-1}$ par dissolution du terpolymère dans D_2O dans un cas et dans le DMSO-d_6 pour l'autre. Les solutions sont ensuite diluées d'un facteur 10 dans l'eau. Pour cela, D_2O est ajouté lentement et sous agitation sur la solution dans le DMSO-d_6. Les deux solutions diluées sont analysées en spectroscopie RMN ^1H, NOESY (400 MHz).

Analyses en diffusion de la lumière du terpolymère en solution (I. Hamouda, IMMM)

Deux solutions de terpolymère sont préparées à 20 $mg.mL^{-1}$ par dissolution du terpolymère dans l'eau distillée dans un cas et dans le DMSO pour l'autre. Les solutions sont ensuite diluées d'un facteur variant entre 2 et 10 dans l'eau. Pour cela, l'eau est ajoutée lentement et sous agitation sur la solution dans le DMSO. Les mesures de masses molaires apparentes et de rayons hydrodynamiques ont été réalisées à des angles (θ) compris entre 20 et 150°. Avant les mesures, les solutions sont filtrées à l'aide d'un filtre à membrane inorganique de 0,45 µm. Les solutions de concentrations en terpolymère comprises entre 2 et 10 $mg.mL^{-1}$ sont analysées en considérant l'incrément d'indice de réfraction dn/dC = 0,155 $mL.g^{-1}$, similaire au valeurs de la littérature pour les polymères à base de polymethacrylate[288]. Le temps de relaxation moyen (Γ) s'est avéré indépendant de q^2 où q est le vecteur de diffusion ($q = (4\pi n/k)/\sin(\theta/2)$). Le coefficient coopératif de diffusion (D_c) a été calculé tel que $D_c = \Gamma/q^2$. A des concentrations assez faibles, pour que les interactions entre molécules soient négligeables, le rayon hydrodynamique apparent moyen z (R_h) du soluté peut être calculé depuis le coefficient de diffusion avec la relation de Stokes-Einstein :

$$R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta_s D_c}$$

où $k_B$est la constante de Boltzmann, T la température absolue et η_s la viscosité du solvant.

L'intensité relative de diffusion en excès (Ir) a été déterminée comme sa différence entre l'intensité totale et la diffusion du solvant divisée par la diffusion du toluène à 20 °C. Ir est lié à la compressibilité osmotique ((dπ/dC)-1) et au facteur de structure moyen z (S(q)) telle que :

$$Ir = KCRT((\frac{d\pi}{dC}) - 1)S(q)$$

où C est la concentration en soluté et K une constante optique qui dépend de l'incrément d'indice de réfraction. En solution diluée, Ir est liée à la masse molaire moyenne en masse (Mw) par la relation :

$$Ir = KC.Mw.S(q)$$

S(q) décrit la dépendance de Ir au vecteur d'onde de diffusion. Dans la gamme de concentrations étudiées (2 à 10 $mg.ml^{-1}$), les interactions influencent l'intensité de diffusion et le résultat obtenu en extrapolant q=0 représente une valeur apparente de masse molaire (Ma).

Analyse du terpolymère en microscopie électronique à transmission (MET)

Une goutte de solution de terpolymère à 1 $mg.mL^{-1}$ dans l'eau a été déposée sur une grille de cuivre recouverte de carbone et soumis à une décharge luminescente dans une station Pelco easiGlow juste avant le dépôt. Le liquide en excès a été éliminé et une gouttelette de colorant négatif à 2 %m d'acétate d'uranyle a été déposée avant le séchage. L'excès de colorant a été absorbée et la préparation a été laissée sécher. L'échantillon a été observé avec un microscope JEOL JEM-2100 Plus fonctionnant à 200 kV et les images ont été enregistrées avec une caméra Gatan Rio 16.

Analyse DOSY de terpolymère et de la β-CD en solvant organique

Deux solutions de β-CD commerciale sont préparées dans DMSO-d_6 et DMF-d_7 à $1,05.10^{-2}$ $mol.L^{-1}$ et $1,83.10^{-2}$ $mol.L^{-1}$ respectivement. Deux solutions de terpolymère sont préparées dans DMSO-d_6 et DMF-d_7 à 15,7 $mg.mL^{-1}$ et 13,8 $mg.mL^{-1}$ respectivement. Les solutions sont analysées séparément en RMN DOSY (500 MHz) puis deux solutions sont préparées en mélangeant les solutions de terpolymère et β-CD commerciale dans le DMF-d_7 d'un côté et dans le DMSO-d_6 de l'autre, dans des proportions approchant la stœchiométrie entre fonctions azobenzènes et β-CD.

Broyage sans solvant (mécanochimie)

A la main :

- β-CD-polymère : 30,5 mg de terpolymère protégé et 140 mg de β-CD-polymère (Sigma Aldrich, Etats-Unis) sont déposés dans un mortier en agate. 100 µL d'eau sont utilisés pour mélanger les composés entre eux sous forme de pâte puis ceux-ci sont broyés à la main pendant 1h avec un pilon en agate. Des fractions de pâtes sont prélevées au cours du broyage à 15, 30 et 60 min et dissoutes dans l'eau à la concentration de 2 $mg.mL^{-1}$. Des spectres UV-Visible sont enregistrés pour chaque avancement (10 spectres par solution) et la longueur d'onde maximale de la bande $n \rightarrow \pi^*$ est relevée pour chaque solution (moyenne sur 10 spectres).
- β-CD-2m : Les quantités proviennent d'une formulation contenant 100% de tétrathiol, un rapport AZO/CD de 50/50 et un pourcentage massique de 10%m (formulation F3). 56,9 mg de terpolymère protégé et 13,5 mg de β-CD-2m sont déposés dans un mortier en agate et broyés à la main pendant 30 min. Le mélange est récupéré dans 475 µL d'eau ultra-pure pour la suite. Les pertes sont évaluées par solubilisation dans $CDCl_3$ et dosage des azobenzènes par étalonnage interne. 9 mg de polymère et 2 mg de β-CD-2m étaient restés dans le mortier. Une solution de tétrathiol-POE est préparée à 88,5 $mg.mL^{-1}$ dans l'eau. Trois réplicats de gels sont formés en mélangeant 155 µL de solution de broyage et 95 µL de solution de POE-tétrathiol. Les gels prennent en 30 secondes et leur taux de gonflement a été mesuré. L'un des réplicas est découpés pour être testé en AFM.

Automatisé au vibro-broyeur :

Les expériences de mécanochimie ont été réalisées avec un vibro-broyeur à la fréquence de 24 Hz dans des jarres en acier inoxydable intérieur téflon de 10 mL avec deux billes en oxyde de zirconium de 10 mm de diamètre. Trois expériences ont été effectuées dans trois jarres séparées telles que :

Jarre	$m_{terpolymère}$ (mg)	nature CD	m_{CD} (mg)	$m_{sable\ (g)}$
A	32,7	Ancune	0	1,35
B	45,9	β-CD-m-POE	65,5	1,25
C	47,5	β-CD-polymère	15,5	1,25

Les jarres sont agitées par le vibro-broyeur pendant 30 min pour le terpolymère seul et 1h pour les jarres contenant de la β-CD. Un prélèvement du contenu de la jarre A est effectué et repris

dans des solvants deutérés, D_2O et DMSO-d_6. Le contenu des jarres en ensuite récupéré dans un minimum d'eau. Le sable est laissé décanter et la phase supérieure est récupérée et centrifugée 3 min à 13000 rpm. Les solutions finales sont diluées au besoin afin de pouvoir enregistrer leurs spectres d'absorbance UV-Visible. La solution concentrée récupérée depuis la jarre C est gardée en observation afin de voir si la formation d'un gel physique apparait.

Synthèse des gels d'agarose

Des solutions d'agarose dans l'eau et dans le PBS ont été préparées à différentes concentrations massiques (0,5%, 0,75%, 1%, 1,25%, 1,5% ou 1,75% en masse). Les solutions sont chauffées à environ 70 °C sous agitation jusqu'à dissolution de l'agarose. Elles sont ensuite versées dans des moules (Figure 182) et laissées à gélifier à température ambiante. La planéité des faces supérieure et inférieure du cylindre est cruciale pour le bon déroulement du test en compression, Celle-ci est assurée par le dépôt d'une lame de verre au-dessus du moule une fois la solution versée en léger excès.

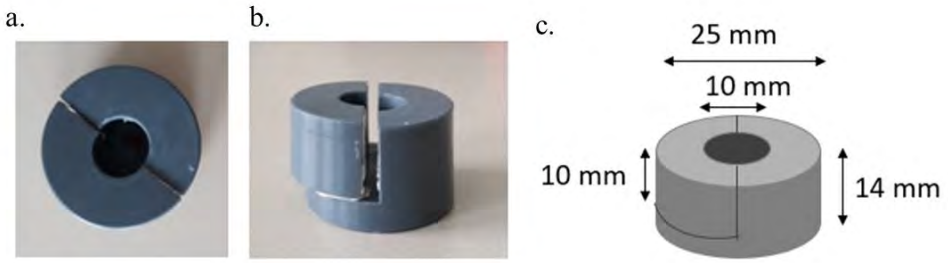


Figure 182 : Photographies d'un moule utilisé pour la synthèse de gels d'agarose vu a, du dessus, b, de côté et c, vue schématique de côté avec les côtes du moule.

Culture cellulaire H9C2(2-1) ATCC CRL-1446 et HEK 293T (N. Pataluch, I2MC)

<u>Préparation Milieu de culture complet :</u>

Un milieu culture complet est préparé à base de milieu de DMEM Glutamax 4,5 g/L Glucose + Pyruvate (Gibco Life Technologies, Etats-Unis) enrichi de 10% de Sérum de veau fœtal abrégé SVF (Gibco Life technologies, Etats-Unis) et de 1 % penicilline-streptomycine (Sigma Aldrich, Etats-Unis), Le reste de milieu sans SVF et sans penicilline-streptomycine dans un Falcon au frigo).

<u>Préparation trypsine:</u>

Les cellules H9C2 sont décollées avec une solution de trypsine à 0,25% % (p /v)-EDTA 0,53

mM. Les cellules HEK sont décollées avec une solution de trypsine à 0,05 % (p / v)-EDTA 0,53 mM.

Décongélation des cellules :

Dans une flasque 12 ml, 9 ml de milieu complet sont ajoutés puis incubés 15 min à 37°C, 5% CO_2 (pour stabiliser le pH). Les cellules congelées sont récupérées dans un tube et 9 mL de milieu complet y sont ajoutés. Le tube est centrifugé 5 min à 1000 rpm et le surnageant est retiré. Le culot est resuspendu dans 3 mL de milieu complet puis transféré dans la flasque qui contient 9 mL de milieu complet pré-incubé, Les cellules sont ainsi incubées à 37°C, 5% CO_2.

Passage et Ensemencement des cellules :

Remarque : La population myoblastique s'épuise rapidement si les cultures sont autorisées à devenir confluentes. Pour éviter la perte de cellules myoblastiques, les cultures doivent être repiquées avant qu'elles ne deviennent confluentes (Maximum 80%), Ne pas dépasser le passage 18 car laa prolifération est lente jusqu'à P10 puis accélère.

- Passage

Le milieu de culture est retiré de la flasque (*aspiration toujours à l'opposé du tapis cellulaire*) et la couche cellulaire est rincée avec 2 ml de solution de trypsine afin d'éliminer des traces de sérum (*contenant des inhibiteurs de protéase*). La solution de rinçage est ensuite éliminée et 2 mL de solution de trypsine fraiche sont ajoutées (par flasques 24 mL) pour décoller les cellules (vérification au microscope). Les cellules sont incubées pendant environ 5 minutes à 37°C, 5% CO_2. Une fois les cellules décollées, 8 ml de milieu complet sont ajoutés dans la flasque. Les cellules sont écupérées(total 10 mL).

- Ensemencement (plaque 96 puits)

Le milieu de culture est retiré de la flasque et rincé avec 2 ml de solution de trypsine, à son tour retirée. Les cellules sont décollées avec 2 mL de solution de trypsine puis laissées dans l'incubateur à 37°C à 5% de CO_2 pendant maximum 5 min. 6 mL de milieu complet sont ajoutés (par flasque de 24 mL). Les cellules sont ensuite récupérées, placées dans un tube puis centrifugées 5 min à 1000 rpm. Le surnageant est aspiré et le tube est agité manuellement pour resuspendre les cellules après ajout de 10 mL de milieu complet pour les H9C2 et 40 mL pour les HEK.

Comptage cellulaire dans une plaque 6 puits :

oH9C2 = 45000 cellules/ml

oHEK = 50000 cellules/ml

Biocompatibilité d'un gel d'agarose

Une solution d'agarose est préparée à 1% en masse d'agarose dans l'eau et elle est chauffée à 70°C sous agitation jusqu'à ce que la solution soit homogène. Une goutte de solution est déposée au fond de puits d'une plaque 6 puits et laissé réticuler quelques minutes à température ambiante. Les gels sont ensuite lavés selon le protocole de lavage défini avec du PBS et du milieu de culture avant d'être incubés avec des cellules de 2 lignées différentes (HEK 293T ou H9C2).

Biocompatibilité de gels macromoléculaires

Au contact des gels :

Une solution de β-CD-m-POE à environ 380 mg,mL^{-1} est préparée. Une solution aqueuse d'acide chlorydrique (HCl) est préparée à pH4,2. Un lot de gels est préparé pour 500 g de matière en suivant la formulation ci-dessous.

β-CD-m-POE (mg)	Terpolymère (mg)	Tétrathiol (mg)	Dithiol (mg)	H_2O pH4,2 (mg)
51,5	16,6	7,9	13,9	407

Une solution intermédiaire de terpolymère/ β-CD-m-POE (S1) est préparée en ajoutant 16,6 mg et 194 mg d'eau acide à 184 mg de solution de β-CD-m-POE. Une solution intermédiaire de thiol (S2) est préparée en solubilisant 7,9 mg de tétrathiol et 13,9 mg de dithiol dans 80 mg d'eau acide. La formation de gel au fond de la plaque 6 puits se fait par mélange de 40 µL de solution S1 et de 10 µL de solution S2 suivi d'une agitation manuelle à la spatule.L'agitation est arrêtée lorsque le gel commence à adhérer à la spatule, après environ 1min. Les gels sont ensuite laissés au moins 1h à température ambiante à réticuler avant d'être immergés dans du PBS (Figure 183). Deux protocoles de lavages différents sont testés appelés :

- Protocole de « lavage court » : 1 lavage au PBS(Gibco Life technologies, Etats-Unis) de 30 min, 1 lavage au PBS de 1h et 3 lavages au milieu de culture de 15 min ; et
- Protocole de « lavage long » : 2 lavages au PBS de 30 min, 2 lavages au PBS de 1h et 3 lavages au milieu de culture de 15 min.

Les lavages sont faits sous oscillations à 90 rpm. A la fin des lavages, du milieu de culture contenant des cellules de l'une ou l'autre de 2 lignées étudiées (HEK 293T ou H9C2) est versé dans les puits correspondants. Le comportement des cellules a été observé les jours suivants la mise en contact avec le gel, au microscope à champs clair.

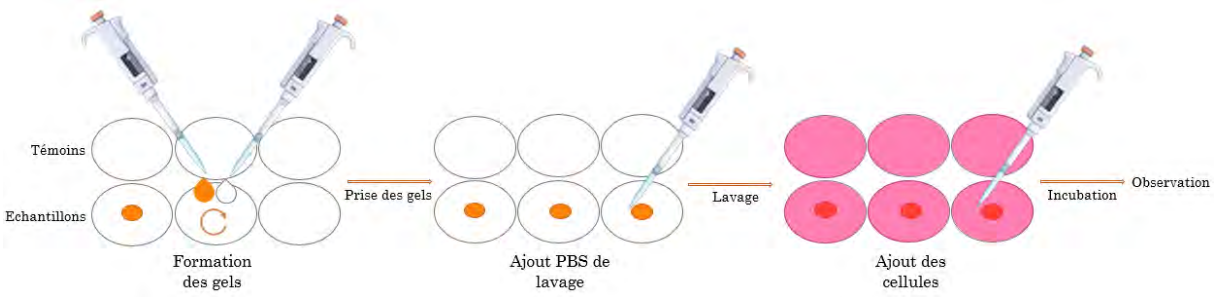


Figure 183 : Protocole expérimental des tests de cytotoxicité des hydrogels au contact de cellules,

<u>En milieu conditionné :</u>

Des hydrogels sont synthétisés dans des puits d'une plaque 6 puits et lavés selon les protocoles de « lavage court » et de « lavage long », Le dernier milieu de lavage est récupéré et versé sur des cellules H9C2 et HEK en culture alors qu'un milieu de culture propre est versé sur les hydrogels (Figure 184). Après 24h, les cellules cultivées en milieu conditionné sont observées en microscopie à champs clair puis leur milieu est remplacé par le milieu de lavage des hydrogels. Cette procédure est répétée sur 4 jours.

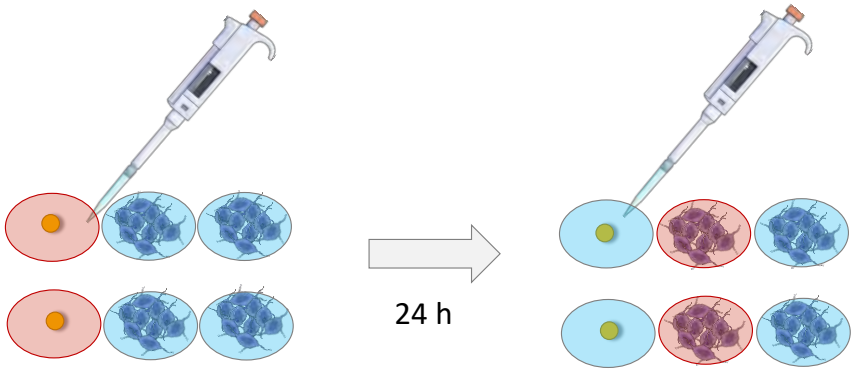


Figure 184 : Protocole expérimental des tests de cytotoxicité des hydrogels par mise en contact des cellules avec le milieu conditionné de lavage des hydrogels.

Encapsulation de biopsie dans un hydrogel macromoléculaire :

Des biopsies de 1mm^3 sont prélevées depuis le ventricule gauche de cœurs battants de souris (souris C57BL6J d'environ 2 mois). Ces biopsies sont marquées pendant 2 à 3 jours avec les marqueurs WGA, Isob4 et Mitotraker, Une fois le temps de marquage terminé, les biopsies sont placées dans des puits de lame de verre puis recouverte de préparation d'hydrogel afin

d'effectuer l'encapsulation (Figure 185).

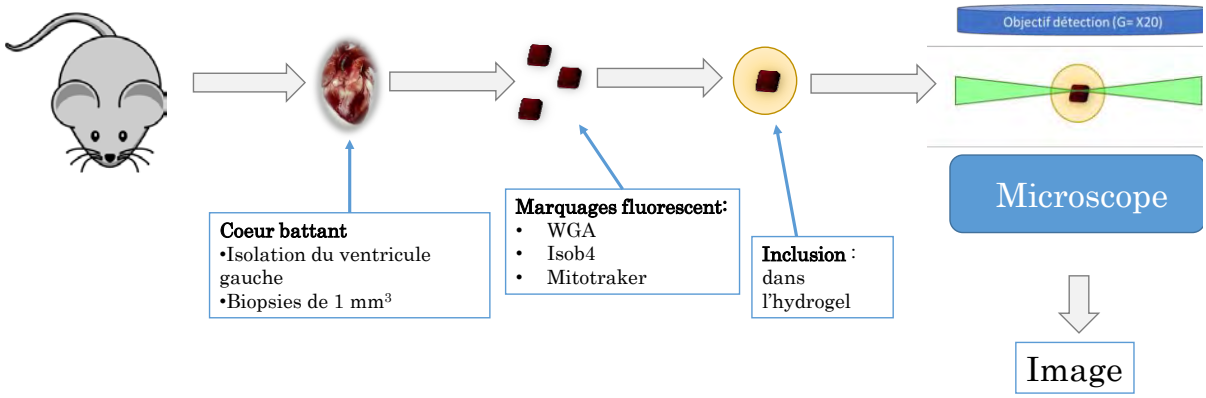


Figure 185 : Représentation schématique du protocole expérimental de préparation des biopsies et de leur inclusion dans un hydrogel.

Les hydrogels sont préparés à partir de la formulation 1 modifiée, contenant une fraction de peptide, du plan d'expériences 2 selon le Tableau 51. Une solution sont préparée dans le PBS (Gibco Life technologies, Etats-Unis) à 4°C, l'une contenant les thiols et le peptide, l'autre contenant le terpolymère et la β-CD-m-POE. Les deux solutions sont mélangées et 30 µL du mélange sont versés dans trois puits contenants des biopsies (Figure 186).

	Masses théorique (mg)	Masses expérimentales (mg)
Terpolymère	5,5	6,2
β-CD-m-POE	7,9	8,6
4-SH	6,6	6,5
PBS	80	110
Peptide	1	2

Tableau 51 : Formulation utilisée pour la préparation du gel d'enrobage.

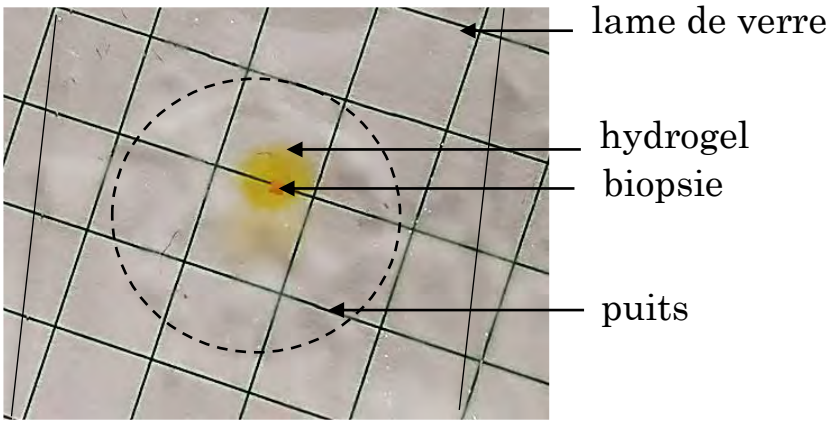


Figure 186 : Photographie d'une biopsie d'1 mm³ encapsulée dans dans un hydrogel photo-sensible.

Les gels sont laissés réticuler à 4°C pendant environ 10 min avant d'être lavés au PBS froid pendant 10 min sans agitation. Le PBS de lavage est retiré et remplacé par du PBS frais pour un second lavage de 1h sous légère agitation. Les puits sont ensuite recouverts de lamelles de verre fixées à la lame de verre par un joint en silicone afin d'éviter les fuites pendant l'observation au microscope confocal (Figure 187).

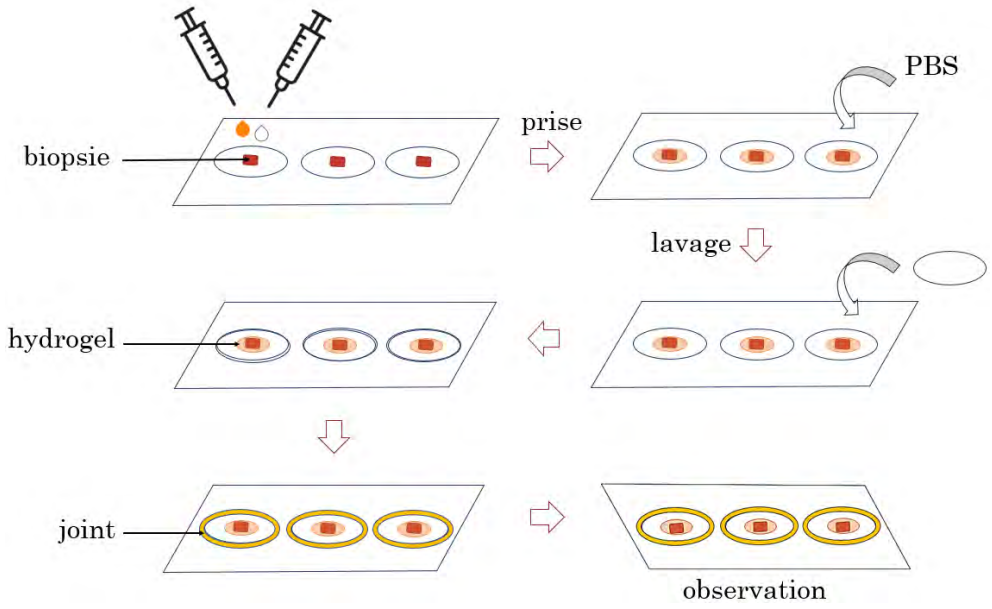


Figure 187 : Schéma de mise en contact des biopsies avec le gel photo-stimulable et préparation de l'échantillon pour l'observation au microscope confocal

Préparation de carottes de gel pour le SPIM

Des carottes de gel ont été préparées pour l'analyse en SPIM grâce à des capillaires en verre. Les gels ont été préparés à partir de la formulation à 10% massique sans cyclodextrine et contenant 1% massique de peptide, comme présentée dans le Tableau 52. Les composants du gel ont été indépendamment solubilisés dans du PBS (Gibco Life technologies, Etats-Unis) contenant 10^6 microbilles fluorescentes de 0,5 µm de diamètre par mL. Les solutions ont été mélangées puis 30 µL environ de mélange ont été versés dans plusieurs tubes capillaires en verre pour former des carottes d'hydrogels. Au moins 30min après moulage, les carottes ont pu être démoulées et analysées en SPIM.

	Masses expérimentales (mg)
Terpolymère	23,6
4-SH	6,4
PBS	270
Peptide	3

Tableau 52 : Formulation utilisée pour la préparation de carottes d'hydrogel.

Références

(1) Theocharis, A. D.; Skandalis, S. S.; Gialeli, C.; Karamanos, N. K. Extracellular Matrix Structure. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *97*, 4–27. https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.11.001.

(2) Pelham, R. J.; Wang, Y. -l. Cell Locomotion and Focal Adhesions Are Regulated by Substrate Flexibility. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1997**, *94* (25), 13661–13665. https://doi.org/10.1073/pnas.94.25.13661.

(3) Puklin-Faucher, E.; Gao, M.; Schulten, K.; Vogel, V. How the Headpiece Hinge Angle Is Opened: New Insights into the Dynamics of Integrin Activation. *J. Cell Biol.* **2006**, *175* (2), 349–360. https://doi.org/10.1083/jcb.200602071.

(4) Sunyer, R.; Conte, V.; Escribano, J.; Elosegui-Artola, A.; Labernadie, A.; Valon, L.; Navajas, D.; Garcia-Aznar, J. M.; Munoz, J. J.; Roca-Cusachs, P.; Trepat, X. Collective Cell Durotaxis Emerges from Long-Range Intercellular Force Transmission. *Science* **2016**, *353* (6304), 1157–1161. https://doi.org/10.1126/science.aaf7119.

(5) Clause, K. C.; Barker, T. H. Extracellular Matrix Signaling in Morphogenesis and Repair. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2013**, *24* (5), 830–833. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.04.011.

(6) Hynes, R. O. The Extracellular Matrix: Not Just Pretty Fibrils. *Science* **2009**, *326* (5957), 1216–1219. https://doi.org/10.1126/science.1176009.

(7) Han, S. W.; Roman, J. Fibronectin Induces Cell Proliferation and Inhibits Apoptosis in Human Bronchial Epithelial Cells: Pro-Oncogenic Effects Mediated by PI3-Kinase and NF- κ B. *Oncogene* **2006**, *25* (31), 4341–4349. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209460.

(8) Gattazzo, F.; Urciuolo, A.; Bonaldo, P. Extracellular Matrix: A Dynamic Microenvironment for Stem Cell Niche. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1840* (8), 2506–2519. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.01.010.

(9) Son, D.; Harijan, A. Overview of Surgical Scar Prevention and Management. *J. Korean Med. Sci.* **2014**, *29* (6), 751–757. https://doi.org/10.3346/jkms.2014.29.6.751.

(10) Lu, P.; Takai, K.; Weaver, V. M.; Werb, Z. Extracellular Matrix Degradation and Remodeling in Development and Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2011**, *3* (12). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005058.

(11) Walker, C.; Mojares, E.; del Río Hernández, A. Role of Extracellular Matrix in Development and Cancer Progression. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19* (10). https://doi.org/10.3390/ijms19103028.

(12) Giannandrea, M.; Parks, W. C. Diverse Functions of Matrix Metalloproteinases during Fibrosis. *Dis. Model. Mech.* **2014**, *7* (2), 193–203. https://doi.org/10.1242/dmm.012062.

(13) Murtha, L. A.; Schuliga, M. J.; Mabotuwana, N. S.; Hardy, S. A.; Waters, D. W.; Burgess, J. K.; Knight, D. A.; Boyle, A. J. The Processes and Mechanisms of Cardiac and Pulmonary Fibrosis. *Front. Physiol.* **2017**, *8*. https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00777.

(14) Schaper, J.; Froede, R.; Hein, S.; Buck, A.; Hashizume, H.; Speiser, B.; Friedl, A.; Bleese, N. Impairment of the Myocardial Ultrastructure and Changes of the Cytoskeleton in Dilated Cardiomyopathy. *Circulation* **1991**, *83* (2), 504–514. https://doi.org/10.1161/01.cir.83.2.504.

(15) Acerbi, I.; Cassereau, L.; Dean, I.; Shi, Q.; Au, A.; Park, C.; Chen, Y. Y.; Liphardt, J.; Hwang, E. S.; Weaver, V. M. Human Breast Cancer Invasion and Aggression Correlates with ECM Stiffening and Immune Cell Infiltration. *Integr. Biol. Quant. Biosci. Nano Macro* **2015**, *7* (10), 1120–1134. https://doi.org/10.1039/c5ib00040h.

(16) Mohamed, M. A.; Fallahi, A.; El-Sokkary, A. M. A.; Salehi, S.; Akl, M. A.; Jafari, A.; Tamayol, A.; Fenniri, H.; Khademhosseini, A.; Andreadis, S. T.; Cheng, C. Stimuli-

Responsive Hydrogels for Manipulation of Cell Microenvironment: From Chemistry to Biofabrication Technology. *Prog. Polym. Sci.* **2019**, *98*, 101147. https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2019.101147.
(17) Fratzl, P. Collagen: Structure and Mechanics, an Introduction. In *Collagen: Structure and Mechanics*; Fratzl, P., Ed.; Springer US: Boston, MA, 2008; pp 1–13. https://doi.org/10.1007/978-0-387-73906-9_1.
(18) Vella, F. Molecular Biology of the Cell (Third Edition). *Biochem. Educ.* **1994**, *22* (3), 164. https://doi.org/10.1016/0307-4412(94)90059-0.
(19) Drury, J. L.; Mooney, D. J. Hydrogels for Tissue Engineering: Scaffold Design Variables and Applications. *Biomaterials* **2003**, *24* (24), 4337–4351. https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00340-5.
(20) Lee, C. H.; Singla, A.; Lee, Y. Biomedical Applications of Collagen. *Int. J. Pharm.* **2001**, *221* (1–2), 1–22. https://doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00691-3.
(21) Maeda, M.; Tani, S.; Sano, A.; Fujioka, K. Microstructure and Release Characteristics of the Minipellet, a Collagen-Based Drug Delivery System for Controlled Release of Protein Drugs. *J. Controlled Release* **1999**, *62* (3), 313–324. https://doi.org/10.1016/S0168-3659(99)00156-X.
(22) Rice, J. J.; Martino, M. M.; De Laporte, L.; Tortelli, F.; Briquez, P. S.; Hubbell, J. A. Engineering the Regenerative Microenvironment with Biomaterials. *Adv. Healthc. Mater.* **2013**, *2* (1), 57–71. https://doi.org/10.1002/adhm.201200197.
(23) Helary, C.; Bataille, I.; Abed, A.; Illoul, C.; Anglo, A.; Louedec, L.; Letourneur, D.; Meddahi-Pellé, A.; Giraud-Guille, M. M. Concentrated Collagen Hydrogels as Dermal Substitutes. *Biomaterials* **2010**, *31* (3), 481–490. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.09.073.
(24) Leitinger, B.; Hohenester, E. Mammalian Collagen Receptors. *Matrix Biol.* **2007**, *26* (3), 146–155. https://doi.org/10.1016/j.matbio.2006.10.007.
(25) Fishman, J. M.; Wiles, K.; Wood, K. J. Chapter 8 - The Acquired Immune System Response to Biomaterials, Including Both Naturally Occurring and Synthetic Biomaterials. In *Host Response to Biomaterials*; Badylak, S. F., Ed.; Academic Press: Oxford, 2015; pp 151–187. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800196-7.00008-6.
(26) Harrington, D. J. Bacterial Collagenases and Collagen-Degrading Enzymes and Their Potential Role in Human Disease. *Infect. Immun.* **1996**, *64* (6), 1885–1891.
(27) Holland, T. A.; Bodde, E. W. H.; Cuijpers, V. M. J. I.; Baggett, L. S.; Tabata, Y.; Mikos, A. G.; Jansen, J. A. Degradable Hydrogel Scaffolds for in Vivo Delivery of Single and Dual Growth Factors in Cartilage Repair. *Osteoarthritis Cartilage* **2007**, *15* (2), 187–197. https://doi.org/10.1016/j.joca.2006.07.006.
(28) Rathna, G. V. N. Gelatin Hydrogels: Enhanced Biocompatibility, Drug Release and Cell Viability. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2008**, *19* (6), 2351–2358. https://doi.org/10.1007/s10856-007-3334-9.
(29) Ferry, J. D.; Morrison, P. R. Preparation and Properties of Serum and Plasma Proteins. VIII. The Conversion of Human Fibrinogen to Fibrin under Various Conditions1,2. *J. Am. Chem. Soc.* **1947**, *69* (2), 388–400. https://doi.org/10.1021/ja01194a066.
(30) Kloczewiak, M.; Timmons, S.; Lukas, T. J.; Hawiger, J. Platelet Receptor Recognition Site on Human Fibrinogen. Synthesis and Structure-Function Relationship of Peptides Corresponding to the Carboxy-Terminal Segment of the Gamma Chain. *Biochemistry* **1984**, *23* (8), 1767–1774. https://doi.org/10.1021/bi00303a028.
(31) Ugarova, T. P.; Yakubenko, V. P. Recognition of Fibrinogen by Leukocyte Integrins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2001**, *936* (1), 368–385. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb03523.x.
(32) Podolnikova, N. P.; Yakovlev, S.; Yakubenko, V. P.; Wang, X.; Gorkun, O. V.; Ugarova,

T. P. The Interaction of Integrin AIIbβ3 with Fibrin Occurs through Multiple Binding Sites in the AIIb β-Propeller Domain. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289* (4), 2371–2383. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.518126.

(33) Ho, W.; Tawil, B.; Dunn, J. C. Y.; Wu, B. M. The Behavior of Human Mesenchymal Stem Cells in 3D Fibrin Clots: Dependence on Fibrinogen Concentration and Clot Structure. *Tissue Eng.* **2006**, *12* (6), 1587–1595. https://doi.org/10.1089/ten.2006.12.1587.

(34) Andersen, T.; Auk-Emblem, P.; Dornish, M. 3D Cell Culture in Alginate Hydrogels. *Microarrays* **2015**, *4* (2), 133–161. https://doi.org/10.3390/microarrays4020133.

(35) Bidarra, S. J.; Barrias, C. C.; Granja, P. L. Injectable Alginate Hydrogels for Cell Delivery in Tissue Engineering. *Acta Biomater.* **2014**, *10* (4), 1646–1662. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.12.006.

(36) Kaczmarek-Pawelska, A. Alginate-Based Hydrogels in Regenerative Medicine. *Alginates - Recent Uses This Nat. Polym.* **2019**. https://doi.org/10.5772/intechopen.88258.

(37) Drury, J. L.; Dennis, R. G.; Mooney, D. J. The Tensile Properties of Alginate Hydrogels. *Biomaterials* **2004**, *25* (16), 3187–3199. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.10.002.

(38) LeRoux, M. A.; Guilak, F.; Setton, L. A. Compressive and Shear Properties of Alginate Gel: Effects of Sodium Ions and Alginate Concentration. *J. Biomed. Mater. Res.* **1999**, *47* (1), 46–53. https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4636(199910)47:1<46::aid-jbm6>3.0.co;2-n.

(39) Lee, K. Y.; Rowley, J. A.; Eiselt, P.; Moy, E. M.; Bouhadir, K. H.; Mooney, D. J. Controlling Mechanical and Swelling Properties of Alginate Hydrogels Independently by Cross-Linker Type and Cross-Linking Density. *Macromolecules* **2000**, *33* (11), 4291–4294. https://doi.org/10.1021/ma9921347.

(40) Johansson, B. G. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation. *J. Clin. Pathol.* **1949**, *2* (4), 298–298. https://doi.org/10.1136/jcp.2.4.298-b.

(41) Roach, B. L.; Nover, A. B.; Ateshian, G. A.; Hung, C. T. Agarose Hydrogel Characterization for Regenerative Medicine Applications: Focus on Engineering Cartilage. In *Biomaterials from Nature for Advanced Devices and Therapies*; Neves, N. M., Reis, R. L., Eds.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, New Jersey, 2016; pp 258–273. https://doi.org/10.1002/9781119126218.ch16.

(42) Laurell, C.-B. Quantitative Estimation of Proteins by Electrophoresis in Agarose Gel Containing Antibodies. *Anal. Biochem.* **1966**, *15* (1), 45–52. https://doi.org/10.1016/0003-2697(66)90246-6.

(43) Mauck, R. L.; Seyhan, S. L.; Ateshian, G. A.; Hung, C. T. Influence of Seeding Density and Dynamic Deformational Loading on the Developing Structure/Function Relationships of Chondrocyte-Seeded Agarose Hydrogels. *Ann. Biomed. Eng.* **2002**, *30* (8), 1046–1056. https://doi.org/10.1114/1.1512676.

(44) Duarte Campos, D. F.; Blaeser, A.; Korsten, A.; Neuss, S.; Jäkel, J.; Vogt, M.; Fischer, H. The Stiffness and Structure of Three-Dimensional Printed Hydrogels Direct the Differentiation of Mesenchymal Stromal Cells Toward Adipogenic and Osteogenic Lineages. *Tissue Eng. Part A* **2015**, *21* (3–4), 740–756. https://doi.org/10.1089/ten.tea.2014.0231.

(45) Meyer, K.; Palmer, J. W. THE POLYSACCHARIDE OF THE VITREOUS HUMOR. *J. Biol. Chem.* **1934**, *107* (3), 629–634. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)75338-6.

(46) Lapčík, L.; Lapčík, L.; De Smedt, S.; Demeester, J.; Chabreček, P. Hyaluronan: Preparation, Structure, Properties, and Applications †. *Chem. Rev.* **1998**, *98* (8), 2663–2684. https://doi.org/10.1021/cr941199z.

(47) Laurent, T. C.; Fraser, J. R. Hyaluronan. *FASEB J.* **1992**, *6* (7), 2397–2404. https://doi.org/10.1096/fasebj.6.7.1563592.
(48) Vasvani, S.; Kulkarni, P.; Rawtani, D. Hyaluronic Acid: A Review on Its Biology, Aspects of Drug Delivery, Route of Administrations and a Special Emphasis on Its Approved Marketed Products and Recent Clinical Studies. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.066.
(49) Turley, E. A.; Noble, P. W.; Bourguignon, L. Y. W. Signaling Properties of Hyaluronan Receptors. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (7), 4589–4592. https://doi.org/10.1074/jbc.R100038200.
(50) Saw, K.-Y.; Hussin, P.; Loke, S.-C.; Azam, M.; Chen, H.-C.; Tay, Y.-G.; Low, S.; Wallin, K.-L.; Ragavanaidu, K. Articular Cartilage Regeneration With Autologous Marrow Aspirate and Hyaluronic Acid: An Experimental Study in a Goat Model. *Arthrosc. J. Arthrosc. Relat. Surg.* **2009**, *25* (12), 1391–1400. https://doi.org/10.1016/j.arthro.2009.07.011.
(51) Aslan, M.; Şimşek, G.; Dayi, E. The Effect of Hyaluronic Acid-Supplemented Bone Graft in Bone Healing: Experimental Study in Rabbits. *J. Biomater. Appl.* **2006**, *20* (3), 209–220. https://doi.org/10.1177/0885328206051047.
(52) Schanté, C. E.; Zuber, G.; Herlin, C.; Vandamme, T. F. Chemical Modifications of Hyaluronic Acid for the Synthesis of Derivatives for a Broad Range of Biomedical Applications. *Carbohydr. Polym.* **2011**, *85* (3), 469–489. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.03.019.
(53) Ouasti, S.; Donno, R.; Cellesi, F.; Sherratt, M. J.; Terenghi, G.; Tirelli, N. Network Connectivity, Mechanical Properties and Cell Adhesion for Hyaluronic Acid/PEG Hydrogels. *Biomaterials* **2011**, *32* (27), 6456–6470. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.05.044.
(54) Cushing, M. C.; Anseth, K. S. Materials Science. Hydrogel Cell Cultures. *Science* **2007**, *316* (5828), 1133–1134. https://doi.org/10.1126/science.1140171.
(55) Selimis, A.; Farsari, M. 3.8 Laser-Based 3D Printing and Surface Texturing. In *Comprehensive Materials Finishing*; Elsevier, 2017; pp 111–136. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803581-8.09171-2.
(56) Moad, G.; Solomon, D. H. *The Chemistry of Radical Polymerization*; Elsevier, 2006.
(57) Lee, K. Y.; Mooney, D. J. Hydrogels for Tissue Engineering. *Chem. Rev.* **2001**, *101* (7), 1869–1880. https://doi.org/10.1021/cr000108x.
(58) Yang, J.-A.; Yeom, J.; Hwang, B. W.; Hoffman, A. S.; Hahn, S. K. In Situ-Forming Injectable Hydrogels for Regenerative Medicine. *Prog. Polym. Sci.* **2014**, *39* (12), 1973–1986. https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2014.07.006.
(59) Tan, H.; Chu, C. R.; Payne, K. A.; Marra, K. G. Injectable in Situ Forming Biodegradable Chitosan–Hyaluronic Acid Based Hydrogels for Cartilage Tissue Engineering. *Biomaterials* **2009**, *30* (13), 2499–2506. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.12.080.
(60) Luo, Y.; Kobler, J. B.; Heaton, J. T.; Jia, X.; Zeitels, S. M.; Langer, R. Injectable Hyaluronic Acid-Dextran Hydrogels and Effects of Implantation in Ferret Vocal Fold. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **2010**, *93B* (2), 386–393. https://doi.org/10.1002/jbm.b.31593.
(61) Grover, G. N.; Braden, R. L.; Christman, K. L. Oxime Cross-Linked Injectable Hydrogels for Catheter Delivery. *Adv. Mater.* **2013**, *25* (21), 2937–2942. https://doi.org/10.1002/adma.201205234.
(62) Tchounwou, P. B.; Newsome, C.; Williams, J.; Glass, K. Copper-Induced Cytotoxicity and Transcriptional Activation of Stress Genes in Human Liver Carcinoma (HepG2) Cells. *Met Ions Biol Med* **2008**, *10*, 285–290.

(63) Jiang, H.; Qin, S.; Dong, H.; Lei, Q.; Su, X.; Zhuo, R.; Zhong, Z. An Injectable and Fast-Degradable Poly(Ethylene Glycol) Hydrogel Fabricated via Bioorthogonal Strain-Promoted Azide–Alkyne Cycloaddition Click Chemistry. *Soft Matter* **2015**, *11* (30), 6029–6036. https://doi.org/10.1039/C5SM00508F.
(64) Nimmo, C. M.; Owen, S. C.; Shoichet, M. S. Diels−Alder Click Cross-Linked Hyaluronic Acid Hydrogels for Tissue Engineering. *Biomacromolecules* **2011**, *12* (3), 824–830. https://doi.org/10.1021/bm101446k.
(65) Phelps, E. A.; Enemchukwu, N. O.; Fiore, V. F.; Sy, J. C.; Murthy, N.; Sulchek, T. A.; Barker, T. H.; García, A. J. Maleimide Cross-Linked Bioactive PEG Hydrogel Exhibits Improved Reaction Kinetics and Cross-Linking for Cell Encapsulation and In Situ Delivery. *Adv. Mater.* **2012**, *24* (1), 64–70. https://doi.org/10.1002/adma.201103574.
(66) Fu, Y.; Kao, W. J. In Situ Forming Poly(Ethylene Glycol)-Based Hydrogels via Thiol-Maleimide Michael-Type Addition. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2011**, *98A* (2), 201–211. https://doi.org/10.1002/jbm.a.33106.
(67) Hoyle, C. E.; Bowman, C. N. Thiol–Ene Click Chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49* (9), 1540–1573. https://doi.org/10.1002/anie.200903924.
(68) Jin, R.; Hiemstra, C.; Zhong, Z.; Feijen, J. Enzyme-Mediated Fast in Situ Formation of Hydrogels from Dextran–Tyramine Conjugates. *Biomaterials* **2007**, *28* (18), 2791–2800. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.02.032.
(69) Cappello, B.; Maio, C. di; Iervolino, M.; Miro, A.; Calignano, A. Etodolac/Cyclodextrin Formulations: Physicochemical Characterization and in Vivo Pharmacological Studies. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2009**, *35* (7), 877–886. https://doi.org/10.1080/03639040802680263.
(70) Lohmeijer, B. G. G.; Schubert, U. S. Playing LEGO with Macromolecules: Design, Synthesis, and Self-Organization with Metal Complexes. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2003**, *41* (10), 1413–1427. https://doi.org/10.1002/pola.10685.
(71) Peng, F.; Li, G.; Liu, X.; Wu, S.; Tong, Z. Redox-Responsive Gel−Sol/Sol−Gel Transition in Poly(Acrylic Acid) Aqueous Solution Containing Fe(III) Ions Switched by Light. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (48), 16166–16167. https://doi.org/10.1021/ja807087z.
(72) Perera, M. M.; Ayres, N. Dynamic Covalent Bonds in Self-Healing, Shape Memory, and Controllable Stiffness Hydrogels. *Polym. Chem.* **2020**, *11* (8), 1410–1423. https://doi.org/10.1039/C9PY01694E.
(73) Wei, Z.; Yang, J. H.; Du, X. J.; Xu, F.; Zrinyi, M.; Osada, Y.; Li, F.; Chen, Y. M. Dextran-Based Self-Healing Hydrogels Formed by Reversible Diels–Alder Reaction under Physiological Conditions. *Macromol. Rapid Commun.* **2013**, *34* (18), 1464–1470. https://doi.org/10.1002/marc.201300494.
(74) Deng, G.; Li, F.; Yu, H.; Liu, F.; Liu, C.; Sun, W.; Jiang, H.; Chen, Y. Dynamic Hydrogels with an Environmental Adaptive Self-Healing Ability and Dual Responsive Sol–Gel Transitions. *ACS Macro Lett.* **2012**, *1* (2), 275–279. https://doi.org/10.1021/mz200195n.
(75) Fonseca Guerra, C.; Bickelhaupt, F. M.; Snijders, J. G.; Baerends, E. J. Hydrogen Bonding in DNA Base Pairs: Reconciliation of Theory and Experiment. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122* (17), 4117–4128. https://doi.org/10.1021/ja993262d.
(76) Lange, R. F. M.; Gurp, M. V.; Meijer, E. W. Hydrogen-Bonded Supramolecular Polymer Networks. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **1999**, *37*, 3657–3670.
(77) Bastings, M. M. C.; Koudstaal, S.; Kieltyka, R. E.; Nakano, Y.; Pape, A. C. H.; Feyen, D. A. M.; Slochteren, F. J. van; Doevendans, P. A.; Sluijter, J. P. G.; Meijer, E. W.; Chamuleau, S. A. J.; Dankers, P. Y. W. A Fast PH-Switchable and Self-Healing Supramolecular Hydrogel Carrier for Guided, Local Catheter Injection in the Infarcted

Myocardium. *Adv. Healthc. Mater.* **2014**, *3* (1), 70–78. https://doi.org/10.1002/adhm.201300076.
(78) Berger, J.; Reist, M.; Mayer, J. M.; Felt, O.; Peppas, N. A.; Gurny, R. Structure and Interactions in Covalently and Ionically Crosslinked Chitosan Hydrogels for Biomedical Applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, *57* (1), 19–34. https://doi.org/10.1016/S0939-6411(03)00161-9.
(79) Hunt, J. N.; Feldman, K. E.; Lynd, N. A.; Deek, J.; Campos, L. M.; Spruell, J. M.; Hernandez, B. M.; Kramer, E. J.; Hawker, C. J. Tunable, High Modulus Hydrogels Driven by Ionic Coacervation. *Adv. Mater.* **2011**, *23* (20), 2327–2331. https://doi.org/10.1002/adma.201004230.
(80) Luo, F.; Sun, T. L.; Nakajima, T.; Kurokawa, T.; Ihsan, A. B.; Li, X.; Guo, H.; Gong, J. P. Free Reprocessability of Tough and Self-Healing Hydrogels Based on Polyion Complex. *ACS Macro Lett.* **2015**, *4* (9), 961–964. https://doi.org/10.1021/acsmacrolett.5b00501.
(81) Stauffer, S. R.; Peppast, N. A. Poly(Vinyl Alcohol) Hydrogels Prepared by Freezing-Thawing Cyclic Processing. *Polymer* **1992**, *33* (18), 3932–3936. https://doi.org/10.1016/0032-3861(92)90385-A.
(82) Hassan, C. M.; Peppas, N. A. Structure and Applications of Poly(Vinyl Alcohol) Hydrogels Produced by Conventional Crosslinking or by Freezing/Thawing Methods. In *Biopolymers · PVA Hydrogels, Anionic Polymerisation Nanocomposites*; Advances in Polymer Science; Springer: Berlin, Heidelberg, 2000; pp 37–65. https://doi.org/10.1007/3-540-46414-X_2.
(83) Schild, H. G. Poly(N-Isopropylacrylamide): Experiment, Theory and Application. *Prog. Polym. Sci.* **1992**, *17* (2), 163–249. https://doi.org/10.1016/0079-6700(92)90023-R.
(84) Lutz, J.-F.; Akdemir, Ö.; Hoth, A. Point by Point Comparison of Two Thermosensitive Polymers Exhibiting a Similar LCST: Is the Age of Poly(NIPAM) Over? *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (40), 13046–13047. https://doi.org/10.1021/ja065324n.
(85) Ruel-Gariépy, E.; Leroux, J.-C. In Situ-Forming Hydrogels—Review of Temperature-Sensitive Systems. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, *58* (2), 409–426. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2004.03.019.
(86) Ha, D. I.; Lee, S. B.; Chong, M. S.; Lee, Y. M.; Kim, S. Y.; Park, Y. H. Preparation of Thermo-Responsive and Injectable Hydrogels Based on Hyaluronic Acid and Poly(N-Isopropylacrylamide) and Their Drug Release Behaviors. *Macromol. Res.* **2006**, *14* (1), 87–93. https://doi.org/10.1007/BF03219073.
(87) Cidade, M. T.; Ramos, D. J.; Santos, J.; Carrelo, H.; Calero, N.; Borges, J. P. Injectable Hydrogels Based on Pluronic/Water Systems Filled with Alginate Microparticles for Biomedical Applications. *Materials* **2019**, *12* (7). https://doi.org/10.3390/ma12071083.
(88) Jeong, B.; Bae, Y. H.; Kim, S. W. In Situ Gelation of PEG-PLGA-PEG Triblock Copolymer Aqueous Solutions and Degradation Thereof. *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, *50* (2), 171–177. https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4636(200005)50:2<171::aid-jbm11>3.0.co;2-f.
(89) Tsuji, H. Poly(Lactide) Stereocomplexes: Formation, Structure, Properties, Degradation, and Applications. *Macromol. Biosci.* **2005**, *5* (7), 569–597. https://doi.org/10.1002/mabi.200500062.
(90) Bandelli, D.; Alex, J.; Weber, C.; Schubert, U. S. Polyester Stereocomplexes Beyond PLA: Could Synthetic Opportunities Revolutionize Established Material Blending? *Macromol. Rapid Commun.* **2020**, *41* (1), 1900560. https://doi.org/10.1002/marc.201900560.
(91) Fox, T. G.; Garrett, B. S.; Goode, W. E.; Gratch, S.; Kincaid, J. F.; Spell, A.; Stroupe, J. D. CRYSTALLINE POLYMERS OF METHYL METHACRYLATE. *J. Am. Chem.*

Soc. **1958**, *80* (7), 1768–1769. https://doi.org/10.1021/ja01540a068.
(92) Liu, K.-Y.; Abebe, D. G.; Wiley, E. R.; Fujiwara, T. Characterization and Optimization of PLA Stereocomplexed Hydrogels for Local Gene Delivery Systems. *Polymers* **2019**, *11* (5). https://doi.org/10.3390/polym11050796.
(93) Jaime, C.; Redondo, J.; Sánchez-Ferrando, F.; Virgili, A. β-Cyclodextrin Inclusion Complex with Adamantane Intermolecular 1H{1H} NOE Determinations and Molecular Mechanics Calculations. *J. Mol. Struct.* **1991**, *248* (3), 317–329. https://doi.org/10.1016/0022-2860(91)80039-7.
(94) Harada, A.; Takashima, Y.; Nakahata, M. Supramolecular Polymeric Materials via Cyclodextrin–Guest Interactions. *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47* (7), 2128–2140. https://doi.org/10.1021/ar500109h.
(95) Assaf, K. I.; Nau, W. M. Cucurbiturils: From Synthesis to High-Affinity Binding and Catalysis. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44* (2), 394–418. https://doi.org/10.1039/C4CS00273C.
(96) Zhang, M.; Xu, D.; Yan, X.; Chen, J.; Dong, S.; Zheng, B.; Huang, F. Self-Healing Supramolecular Gels Formed by Crown Ether Based Host–Guest Interactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51* (28), 7011–7015. https://doi.org/10.1002/anie.201203063.
(97) Appel, E. A.; Biedermann, F.; Rauwald, U.; Jones, S. T.; Zayed, J. M.; Scherman, O. A. Supramolecular Cross-Linked Networks via Host−Guest Complexation with Cucurbit[8]Uril. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (40), 14251–14260. https://doi.org/10.1021/ja106362w.
(98) Kretschmann, O.; Choi, S. W.; Miyauchi, M.; Tomatsu, I.; Harada, A.; Ritter, H. Switchable Hydrogels Obtained by Supramolecular Cross-Linking of Adamantyl-Containing LCST Copolymers with Cyclodextrin Dimers. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45* (26), 4361–4365. https://doi.org/10.1002/anie.200504539.
(99) Kakuta, T.; Takashima, Y.; Harada, A. Highly Elastic Supramolecular Hydrogels Using Host–Guest Inclusion Complexes with Cyclodextrins. *Macromolecules* **2013**, *46* (11), 4575–4579. https://doi.org/10.1021/ma400695p.
(100) Cramer, F. Einschlußverbindungen Der Cyclodextrine. *Angew. Chem.* **1952**, *64* (5), 136–136. https://doi.org/10.1002/ange.19520640506.
(101) Ren, L.; He, L.; Sun, T.; Dong, X.; Chen, Y.; Huang, J.; Wang, C. Dual-Responsive Supramolecular Hydrogels from Water-Soluble PEG-Grafted Copolymers and Cyclodextrin. *Macromol. Biosci.* **2009**, *9* (9), 902–910. https://doi.org/10.1002/mabi.200900021.
(102) Harada, A.; Li, J.; Kamachi, M. Formation of Inclusion Complexes of Monodisperse Oligo(Ethylene Glycol)s with .Alpha.-Cyclodextrin. *Macromolecules* **1994**, *27* (16), 4538–4543. https://doi.org/10.1021/ma00094a017.
(103) Bléger, D.; Hecht, S. Visible-Light-Activated Molecular Switches. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54* (39), 11338–11349. https://doi.org/10.1002/anie.201500628.
(104) Wu, N. M.-W.; Wong, H.-L.; Yam, V. W.-W. Photochromic Benzo[b]Phosphole Oxide with Excellent Thermal Irreversibility and Fatigue Resistance in the Thin Film Solid State via Direct Attachment of Dithienyl Units to the Weakly Aromatic Heterocycle. *Chem. Sci.* **2017**, *8* (2), 1309–1315. https://doi.org/10.1039/C6SC02928K.
(105) Knie, C.; Utecht, M.; Zhao, F.; Kulla, H.; Kovalenko, S.; Brouwer, A. M.; Saalfrank, P.; Hecht, S.; Bléger, D. *Ortho* -Fluoroazobenzenes: Visible Light Switches with Very Long-Lived *Z* Isomers. *Chem. - Eur. J.* **2014**, *20* (50), 16492–16501. https://doi.org/10.1002/chem.201404649.
(106) Bartels, E.; Wassermann, N. H.; Erlanger, B. F. Photochromic Activators of the Acetylcholine Receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1971**, *68* (8), 1820–1823.
(107) Broichhagen, J.; Jurastow, I.; Iwan, K.; Kummer, W.; Trauner, D. Optical Control of Acetylcholinesterase with a Tacrine Switch. *Angew. Chem.* **2014**, *53* (29), 7657–7660.

https://doi.org/10.1002/anie.201403666.
(108) Hartley, G. S. The *Cis*-Form of Azobenzene. *Nature* **1937**, *140* (3537), 281. https://doi.org/10.1038/140281a0.
(109) Noble, A. III. Zur Geschichte Des Azobenzols Und Des Benzidins. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1856**, *98* (2), 253–256. https://doi.org/10.1002/jlac.18560980211.
(110) Barillé, R. Molécule azobenzène - Propriétés et applications photomécaniques de la commutation moléculaire. **2017**, 23.
(111) Bléger, D.; Schwarz, J.; Brouwer, A. M.; Hecht, S. *O* -Fluoroazobenzenes as Readily Synthesized Photoswitches Offering Nearly Quantitative Two-Way Isomerization with Visible Light. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (51), 20597–20600. https://doi.org/10.1021/ja310323y.
(112) Griffiths, J. II. Photochemistry of Azobenzene and Its Derivatives. *Chem. Soc. Rev.* **1972**, *1* (4), 481–493. https://doi.org/10.1039/CS9720100481.
(113) Rau, H. Spectroscopic Properties of Organic Azo Compounds. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1973**, *12* (3), 224–235. https://doi.org/10.1002/anie.197302241.
(114) A. Beharry, A.; Andrew Woolley, G. Azobenzene Photoswitches for Biomolecules. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40* (8), 4422–4437. https://doi.org/10.1039/C1CS15023E.
(115) Fliegl, H.; Köhn, A.; Hättig, C.; Ahlrichs, R. Ab Initio Calculation of the Vibrational and Electronic Spectra of Trans- and Cis-Azobenzene. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (32), 9821–9827. https://doi.org/10.1021/ja034433o.
(116) Siewertsen, R.; Neumann, H.; Buchheim-Stehn, B.; Herges, R.; Näther, C.; Renth, F.; Temps, F. Highly Efficient Reversible Z- E Photoisomerization of a Bridged Azobenzene with Visible Light through Resolved S1 (Nπ*) Absorption Bands. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (43), 15594–15595.
(117) Yang, Y.; Hughes, R. P.; Aprahamian, I. Near-Infrared Light Activated Azo-BF_2 Switches. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (38), 13190–13193. https://doi.org/10.1021/ja508125n.
(118) Qian, H.; Wang, Y.-Y.; Guo, D.-S.; Aprahamian, I. Controlling the Isomerization Rate of an Azo-BF_2 Switch Using Aggregation. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139* (3), 1037–1040. https://doi.org/10.1021/jacs.6b10982.
(119) Beharry, A. A.; Sadovski, O.; Woolley, G. A. Azobenzene Photoswitching without Ultraviolet Light. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (49), 19684–19687. https://doi.org/10.1021/ja209239m.
(120) Konrad, D. B.; Savasci, G.; Allmendinger, L.; Trauner, D.; Ochsenfeld, C.; Ali, A. M. Computational Design and Synthesis of a Deeply Red-Shifted and Bistable Azobenzene. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142* (14), 6538–6547. https://doi.org/10.1021/jacs.9b10430.
(121) Jukes, R. T.; Adamo, V.; Hartl, F.; Belser, P.; De Cola, L. Photochromic Dithienylethene Derivatives Containing Ru (II) or Os (II) Metal Units. Sensitized Photocyclization from a Triplet State. *Inorg. Chem.* **2004**, *43* (9), 2779–2792.
(122) van Leeuwen, T.; Pol, J.; Roke, D.; Wezenberg, S. J.; Feringa, B. L. Visible-Light Excitation of a Molecular Motor with an Extended Aromatic Core. *Org. Lett.* **2017**, *19* (6), 1402–1405. https://doi.org/10.1021/acs.orglett.7b00317.
(123) Wang, F.; Liu, X. Recent Advances in the Chemistry of Lanthanide-Doped Upconversion Nanocrystals. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38* (4), 976–989. https://doi.org/10.1039/B809132N.
(124) Carling, C.-J.; Boyer, J.-C.; Branda, N. R. Remote-Control Photoswitching Using NIR Light. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (31), 10838–10839. https://doi.org/10.1021/ja904746s.
(125) Boyer, J.-C.; Carling, C.-J.; Gates, B. D.; Branda, N. R. Two-Way Photoswitching Using One Type of Near-Infrared Light, Upconverting Nanoparticles, and Changing Only the

Light Intensity. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (44), 15766–15772. https://doi.org/10.1021/ja107184z.
(126) Croissant, J.; Maynadier, M.; Gallud, A.; Peindy N'Dongo, H.; Nyalosaso, J. L.; Derrien, G.; Charnay, C.; Durand, J.-O.; Raehm, L.; Serein-Spirau, F.; Cheminet, N.; Jarrosson, T.; Mongin, O.; Blanchard-Desce, M.; Gary-Bobo, M.; Garcia, M.; Lu, J.; Tamanoi, F.; Tarn, D.; Guardado-Alvarez, T. M.; Zink, J. I. Two-Photon-Triggered Drug Delivery in Cancer Cells Using Nanoimpellers. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52* (51), 13813–13817. https://doi.org/10.1002/anie.201308647.
(127) Kurihara, M.; Hirooka, A.; Kume, S.; Sugimoto, M.; Nishihara, H. Redox-Conjugated Reversible Isomerization of Ferrocenylazobenzene with a Single Green Light. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (30), 8800–8801.
(128) Carneiro, S.; Costa Duarte, F.; Heimfarth, L.; Siqueira Quintans, J.; Quintans-Júnior, L.; Veiga Júnior, V.; Neves de Lima, Á. Cyclodextrin–Drug Inclusion Complexes: In Vivo and In Vitro Approaches. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20* (3), 642. https://doi.org/10.3390/ijms20030642.
(129) Varan, G.; Varan, C.; Erdoğar, N.; Hıncal, A. A.; Bilensoy, E. Amphiphilic Cyclodextrin Nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **2017**, *531* (2), 457–469. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.06.010.
(130) Ding, L.; Li, Y.; Jia, D.; Deng, J.; Yang, W. β-Cyclodextrin-Based Oil-Absorbents: Preparation, High Oil Absorbency and Reusability. *Carbohydr. Polym.* **2011**, *83* (4), 1990–1996. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.11.005.
(131) Einschlußverbindungen der Cyclodextrine - Cramer - 1952 - Angewandte Chemie - Wiley Online Library https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ange.19520640506 (accessed 2020 -01 -27).
(132) Marques, H. M. C. A Review on Cyclodextrin Encapsulation of Essential Oils and Volatiles. *Flavour Fragr. J.* **2010**, *25* (5), 313–326. https://doi.org/10.1002/ffj.2019.
(133) Loftsson, T.; Jansook, P.; Stefánsson, E. Topical Drug Delivery to the Eye: Dorzolamide. *Acta Ophthalmol. (Copenh.)* **2012**, *90* (7), 603–608. https://doi.org/10.1111/j.1755-3768.2011.02299.x.
(134) Santos, P. L.; Brito, R. G.; Quintans, J. S. S.; Araujo, A. A. S.; Menezes, I. R. A.; Brogden, N. K.; Quintans-Junior, L. J. Cyclodextrins as Complexation Agents to Improve the Anti-Inflammatory Drugs Profile: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Curr. Pharm. Des.* **2017**, *23* (14), 2096–2107. https://doi.org/10.2174/1381612823666170126121926.
(135) MacNicol, D. D. Cyclodextrins as NMR Shift Reagents for Hydrocarbons. *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16* (38), 3325–3326. https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)91439-4.
(136) Harada, A.; Takahashi, S. Preparation and Properties of Cyclodextrin–Ferrocene Inclusion Complexes. *J Chem Soc Chem Commun* **1984**, No. 10, 645–646. https://doi.org/10.1039/C39840000645.
(137) Di Motta, S.; Avellini, T.; Silvi, S.; Venturi, M.; Ma, X.; Tian, H.; Credi, A.; Negri, F. Photophysical Properties and Conformational Effects on the Circular Dichroism of an Azobenzene-Cyclodextrin [1]Rotaxane and Its Molecular Components. *Chem. - Eur. J.* **2013**, *19* (9), 3131–3138. https://doi.org/10.1002/chem.201203676.
(138) Zheng, X.; Wang, D.; Shuai, Z.; Zhang, X. Molecular Dynamics Simulations of the Supramolecular Assembly between an Azobenzene-Containing Surfactant and α-Cyclodextrin: Role of Photoisomerization. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116* (2), 823–832. https://doi.org/10.1021/jp2073107.
(139) Dongsheng Wang; Zhao, W.; Wei, Q.; Zhao, C.; Zheng, Y. Photoswitchable Azobenzene/Cyclodextrin Host-Guest Complexes: From UV- to Visible/Near-IR-Light-Responsive Systems. *ChemPhotoChem* **2018**, *2* (5), 403–415.

https://doi.org/10.1002/cptc.201700233.
(140) Bortolus, P.; Monti, S. Cis-Trans Photoisomerization of Azobenzene-Cyclodextrin Inclusion Complexes. *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*, 5046–5050.
(141) Yui, H.; Takei, M.; Hirose, Y.; Sawada, T. Ultrafast Transient Lens Spectroscopy of Photoisomerization Dynamics of Azocompounds in Confined Nanospace of Cyclodextrins. *Rev. Sci. Instrum.* **2003**, *74* (1), 907–909. https://doi.org/10.1063/1.1524044.
(142) Yamaguchi, H.; Kobayashi, Y.; Kobayashi, R.; Takashima, Y.; Hashidzume, A.; Harada, A. Photoswitchable Gel Assembly Based on Molecular Recognition. *Nat. Commun.* **2012**, *3* (1), 603. https://doi.org/10.1038/ncomms1617.
(143) Tomatsu, I.; Hashidzume, A.; Harada, A. Contrast Viscosity Changes upon Photoirradiation for Mixtures of Poly(Acrylic Acid)-Based α-Cyclodextrin and Azobenzene Polymers. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (7), 2226–2227. https://doi.org/10.1021/ja058345a.
(144) Huang, H.; Juan, A.; Katsonis, N.; Huskens, J. Competitive Inclusion of Molecular Photo-Switches in Host Cavities. *Tetrahedron* **2017**, *73* (33), 4913–4917. https://doi.org/10.1016/j.tet.2017.05.026.
(145) Wang, D.; Wagner, M.; Butt, H.-J.; Wu, S. Supramolecular Hydrogels Constructed by Red-Light-Responsive Host–Guest Interactions for Photo-Controlled Protein Release in Deep Tissue. *Soft Matter* **2015**, *11* (38), 7656–7662. https://doi.org/10.1039/C5SM01888A.
(146) Wang, D.; Wagner, M.; Saydjari, A. K.; Mueller, J.; Winzen, S.; Butt, H.-J.; Wu, S. A Photoresponsive Orthogonal Supramolecular Complex Based on Host-Guest Interactions. *Chem. - Eur. J.* **2017**, *23* (11), 2628–2634. https://doi.org/10.1002/chem.201604634.
(147) Zhang, L.; Zhang, H.; Gao, F.; Peng, H.; Ruan, Y.; Xu, Y.; Weng, W. Host–Guest Interaction between Fluoro-Substituted Azobenzene Derivative and Cyclodextrins. *RSC Adv.* **2015**, *5* (16), 12007–12014. https://doi.org/10.1039/C4RA13283A.
(148) Ladoux, B.; Mège, R.-M. Mechanobiology of Collective Cell Behaviours. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2017**, *18* (12), 743–757. https://doi.org/10.1038/nrm.2017.98.
(149) Kloxin, A. M.; Kasko, A. M.; Salinas, C. N.; Anseth, K. S. Photodegradable Hydrogels for Dynamic Tuning of Physical and Chemical Properties. *Science* **2009**, *324* (3 April), 59–63. https://doi.org/10.1126/science.1169494.
(150) Bryant, S. J.; Nuttelman, C. R.; Anseth, K. S. Cytocompatibility of UV and Visible Light Photoinitiating Systems on Cultured NIH/3T3 Fibroblasts in Vitro. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2000**, *11* (5), 439–457. https://doi.org/10.1163/156856200743805.
(151) Yang, C.; DelRio, F. W.; Ma, H.; Killaars, A. R.; Basta, L. P.; Kyburz, K. A.; Anseth, K. S. Spatially Patterned Matrix Elasticity Directs Stem Cell Fate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2016**, E4439–E4445. https://doi.org/10.1073/pnas.1609731113.
(152) Mabry, K. M.; Lawrence, R. L.; Anseth, K. S. Dynamic Stiffening of Poly(Ethylene Glycol)-Based Hydrogels to Direct Valvular Interstitial Cell Phenotype in a Three-Dimensional Environment. *Biomaterials* **2015**, *49* (0), 47–56. http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.01.047.
(153) Liu, H.-Y.; Nguyen, H. D.; Lin, C.-C. Dynamic PEG–Peptide Hydrogels via Visible Light and FMN-Induced Tyrosine Dimerization. *Adv. Healthc. Mater.* **2018**, *7* (22), 1800954. https://doi.org/10.1002/adhm.201800954.
(154) Brown, T. E.; Silver, J. S.; Worrell, B. T.; Marozas, I. A.; Yavitt, F. M.; Günay, K. A.; Bowman, C. N.; Anseth, K. S. Secondary Photocrosslinking of Click Hydrogels To Probe Myoblast Mechanotransduction in Three Dimensions. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140* (37), 11585–11588. https://doi.org/10.1021/jacs.8b07551.

(155) Günay, K. A.; Ceccato, T. L.; Silver, J. S.; Bannister, K. L.; Bednarski, O. J.; Leinwand, L. A.; Anseth, K. S. PEG–Anthracene Hydrogels as an On-Demand Stiffening Matrix To Study Mechanobiology. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58* (29), 9912–9916. https://doi.org/10.1002/anie.201901989.
(156) Rape, A. D.; Zibinsky, M.; Murthy, N.; Kumar, S. A Synthetic Hydrogel for the High-Throughput Study of Cell–ECM Interactions. *Nat. Commun.* **2015**, *6* (1), 8129. https://doi.org/10.1038/ncomms9129.
(157) Mabry, K. M.; Schroeder, M. E.; Payne, S. Z.; Anseth, K. S. Three-Dimensional High-Throughput Cell Encapsulation Platform to Study Changes in Cell-Matrix Interactions https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acsami.5b11359 (accessed 2021 -10 -11). https://doi.org/10.1021/acsami.5b11359.
(158) Zheng, Y.; Han, M. K. L.; Jiang, Q.; Li, B.; Feng, J.; Campo, A. del. 4D Hydrogel for Dynamic Cell Culture with Orthogonal, Wavelength-Dependent Mechanical and Biochemical Cues. *Mater. Horiz.* **2020**, *7* (1), 111–116. https://doi.org/10.1039/C9MH00665F.
(159) Rosales, A. M.; Mabry, K. M.; Nehls, E. M.; Anseth, K. S. Photoresponsive Elastic Properties of Azobenzene-Containing Poly(Ethylene-Glycol)-Based Hydrogels. *Biomacromolecules* **2015**, *16* (3), 798–806. https://doi.org/10.1021/bm501710e.
(160) Lee, I.-N.; Dobre, O.; Richards, D.; Ballestrem, C.; Curran, J. M.; Hunt, J. A.; Richardson, S. M.; Swift, J.; Wong, L. S. Photoresponsive Hydrogels with Photoswitchable Mechanical Properties Allow Time-Resolved Analysis of Cellular Responses to Matrix Stiffening. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10* (9), 7765–7776. https://doi.org/10.1021/acsami.7b18302.
(161) Zhao, Y.-L.; Stoddart, J. F. Azobenzene-Based Light-Responsive Hydrogel System. *Langmuir* **2009**, *25* (15), 8442–8446. https://doi.org/10.1021/la804316u.
(162) Tamesue, S.; Takashima, Y.; Yamaguchi, H.; Shinkai, S.; Harada, A. Photoswitchable Supramolecular Hydrogels Formed by Cyclodextrins and Azobenzene Polymers. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49* (41), 7461–7464. https://doi.org/10.1002/anie.201003567.
(163) Ma, D.; Zhou, N.; Zhang, T.; Hu, K.; Ma, X.; Gu, N. Photoresponsive Smart Hydrogel Microsphere via Host-Guest Interaction for 3D Cell Culture. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2017**, *522*, 97–104. https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.02.073.
(164) Rosales, A. M.; Rodell, C. B.; Chen, M. H.; Morrow, M. G.; Anseth, K. S.; Burdick, J. A. Reversible Control of Network Properties in Azobenzene-Containing Hyaluronic Acid-Based Hydrogels. *Bioconjug. Chem.* **2018**, *29* (4), 905–913. https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00802.
(165) Royes Mir, J.; Coudret, C.; Roux, C.; Benoit-Marquié, F.; Cazalès, M.; Séverac, C.; Lorenzo, C.; Mingotaud, A.-F. Rational Hydrogel Formulation Leads to Reversible and Enhanced Photocontrolled Rigidity. *ChemPhotoChem* **2017**, *1* (7), 311–316. https://doi.org/10.1002/cptc.201700038.
(166) Yan, H.; Qiu, Y.; Wang, J.; Jiang, Q.; Wang, H.; Liao, Y.; Xie, X. Wholly Visible-Light-Responsive Host–Guest Supramolecular Gels Based on Methoxy Azobenzene and β-Cyclodextrin Dimers. *Langmuir* **2020**, *36* (26), 7408–7417. https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c00964.
(167) Yan, H.; Jiang, Q.; Wang, J.; Cao, S.; Qiu, Y.; Wang, H.; Liao, Y.; Xie, X. A Triple-Stimuli Responsive Supramolecular Hydrogel Based on Methoxy-Azobenzene-Grafted Poly(Acrylic Acid) and β-Cyclodextrin Dimer. *Polymer* **2021**, *221*, 123617. https://doi.org/10.1016/j.polymer.2021.123617.
(168) Ma, D.; Zhou, N.; Zhang, T.; Hu, K.; Ma, X.; Gu, N. Photoresponsive Smart Hydrogel Microsphere via Host-Guest Interaction for 3D Cell Culture. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2017**, *522*, 97–104. https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.02.073.

(169) Royes, J.; Courtine, C.; Lorenzo, C.; Lauth-de Viguerie, N.; Mingotaud, A.-F.; Pimienta, V. Quantitative Kinetic Modeling in Photoresponsive Supramolecular Chemistry: The Case of Water-Soluble Azobenzene/Cyclodextrin Complexes. *J. Org. Chem.* **2020**, *85* (10), 6509–6518. https://doi.org/10.1021/acs.joc.0c00461.
(170) Bowen, E. J.; Hartley, H.; Scott, W. D.; Watts, H. G. CXLVIII.—Rate of Photochemical Change in Solids. *J. Chem. Soc. Trans.* **1924**, *125* (0), 1218–1221. https://doi.org/10.1039/CT9242501218.
(171) Willett, K. L.; Hites, R. A. Chemical Actinometry: Using o-Nitrobenzaldehyde to Measure Lamp Intensity in Photochemical Experiments. *J. Chem. Educ.* **2000**, *77* (7), 900. https://doi.org/10.1021/ed077p900.
(172) Hatchard, C. H.; Parker, C. A. A New Sensitive Chemical Actinometer - II. Potassium Ferrioxalate as a Standard Chemical Actinometer. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. Math. Phys. Sci.* **1956**, *235* (1203), 518–536. https://doi.org/10.1098/rspa.1956.0102.
(173) Bortolus, Pietro.; Monti, Sandra. Cis-Trans Photoisomerization of Azobenzene. Solvent and Triplet Donors Effects. *J. Phys. Chem.* **1979**, *83* (6), 648–652. https://doi.org/10.1021/j100469a002.
(174) Ladányi, V.; Dvořák, P.; Anshori, J. A.; Vetráková, Ľ.; Wirz, J.; Heger, D. Azobenzene Photoisomerization Quantum Yields in Methanol Redetermined. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2017**, *16* (12), 1757–1761. https://doi.org/10.1039/C7PP00315C.
(175) Taura, D.; Li, S.; Hashidzume, A.; Harada, A. Formation of Side-Chain Hetero-Polypseudorotaxane Composed of α- and β-Cyclodextrins with a Water-Soluble Polymer Bearing Two Recognition Sites. *Macromolecules* **2010**, *43* (4), 1706–1713. https://doi.org/10.1021/ma902712u.
(176) Ulatowski, F.; Dąbrowa, K.; Bałakier, T.; Jurczak, J. Recognizing the Limited Applicability of Job Plots in Studying Host-Guest Interactions in Supramolecular Chemistry. *J. Org. Chem.* **2016**, *81* (5), 1746–1756. https://doi.org/10.1021/acs.joc.5b02909.
(177) Job, P. Formation and Stability of Inorganic Complexes in Solution. *Ann Chim* **1928**, 113–203.
(178) Renny, J. S.; Tomasevich, L. L.; Tallmadge, E. H.; Collum, D. B. Method of Continuous Variations: Applications of Job Plots to the Study of Molecular Associations in Organometallic Chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52* (46), 11998–12013. https://doi.org/10.1002/anie.201304157.
(179) Tablet, C.; Matei, I.; Hillebrand, M. The Determination of the Stoichiometry of Cyclodextrin Inclusion Complexes by Spectral Methods: Possibilities and Limitations. *Stoichiom. Res. - Importance Quant. Biomed.* **2012**. https://doi.org/10.5772/34287.
(180) Bruneau, E.; Lavabre, D.; Levy, G.; Micheau, J. C. Quantitative Analysis of Continuous-Variation Plots with a Comparison of Several Methods: Spectrophotometric Study of Organic and Inorganic 1:1 Stoichiometry Complexes. *J. Chem. Educ.* **1992**, *69* (10), 833. https://doi.org/10.1021/ed069p833.
(181) Blanco, M.; Coello, J.; Iturriaga, H.; Maspoch, S.; Pérez-Maseda, C. Circular Dichroism Spectra of Cyclodextrins–Ketoprofen Inclusion Complexes: Determination of Enantiomeric Purity. *Anal. Chim. Acta* **2000**, *407* (1), 233–245. https://doi.org/10.1016/S0003-2670(99)00811-9.
(182) Bobek, M. M.; Krois, D.; Brinker, U. H. Induced Circular Dichroism of Cyclodextrin Inclusion Complexes: Examining the Cavity with a Bilateral Probe. *Org. Lett.* **2000**, *2* (14), 1999–2002. https://doi.org/10.1021/ol005923d.
(183) Galle, D.; Tolksdorf, M.; Braun, M. Circular Dichroism of Trans and Cis β-Lactams and of Their Inclusion Compounds in β-Cyclodextrin. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36* (24), 4217–4220. https://doi.org/10.1016/0040-4039(95)00773-6.

(184) Shimizu, H.; Kaito, A.; Hatano, M. Induced Circular Dichroism of β-Cyclodextrin Complexes with Substituted Benzenes. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1979**, *52* (9), 2678–2684. https://doi.org/10.1246/bcsj.52.2678.
(185) Adachi, K.; Watarai, H. Site-Selective Formation of Optically Active Inclusion Complexes of Alkoxo-Subphthalocyanines with β-Cyclodextrin at the Toluene/Water Interface. *Chem. – Eur. J.* **2006**, *12* (16), 4249–4260. https://doi.org/10.1002/chem.200501330.
(186) Fielding, L. Determination of Association Constants (Ka) from Solution NMR Data. *Tetrahedron* **2000**, *56* (34), 6151–6170. https://doi.org/10.1016/S0040-4020(00)00492-0.
(187) Bakirci, H.; Zhang, X.; Nau, W. M. Induced Circular Dichroism and Structural Assignment of the Cyclodextrin Inclusion Complexes of Bicyclic Azoalkanes. *J. Org. Chem.* **2005**, *70* (1), 39–46. https://doi.org/10.1021/jo048420k.
(188) Mura, P. Analytical Techniques for Characterization of Cyclodextrin Complexes in Aqueous Solution: A Review. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2014**, *101*, 238–250. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.02.022.
(189) Saokham, P.; Muankaew, C.; Jansook, P.; Loftsson, T. Solubility of Cyclodextrins and Drug/Cyclodextrin Complexes. *Molecules* **2018**, *23* (5), 1161. https://doi.org/10.3390/molecules23051161.
(190) Nehls, E. M.; Rosales, A. M.; Anseth, K. S. Enhanced User-Control of Small Molecule Drug Release from a Poly(Ethylene Glycol) Hydrogel via Azobenzene/Cyclodextrin Complex Tethers. *J. Mater. Chem. B* **2016**, *4* (6), 1035–1039. https://doi.org/10.1039/C5TB02004B.
(191) Ueno, A.; Takahashi, K.; Hino, Y.; Osa, T. Fluorescence Enhancement of α-Naphthyloxyacetic Acid in the Cavity of γ-Cyclodextrin, Assisted by a Space-Regulating Molecule. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1981**, No. 4, 194–195. https://doi.org/10.1039/C39810000194.
(192) Márquez, C.; Hudgins, R. R.; Nau, W. M. Mechanism of Host−Guest Complexation by Cucurbituril. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (18), 5806–5816. https://doi.org/10.1021/ja0319846.
(193) Lucarini, M.; Luppi, B.; Pedulli, G. F.; Roberts, B. P. Dynamic Aspects of Cyclodextrin Host–Guest Inclusion as Studied by an EPR Spin-Probe Technique. *Chem. – Eur. J.* **1999**, *5* (7), 2048–2054. https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3765(19990702)5:7<2048::AID-CHEM2048>3.0.CO;2-U.
(194) Djedaïni, F.; Lin, S. Z.; Perly, B.; Wouessidjewe, D. High-Field Nuclear Magnetic Resonance Techniques for the Investigation of a β-Cyclodextrin:Indomethacin Inclusion Complex. *J. Pharm. Sci.* **1990**, *79* (7), 643–646. https://doi.org/10.1002/jps.2600790721.
(195) Zheng, P. J.; Wang, C.; Hu, X.; Tam, K. C.; Li, L. Supramolecular Complexes of Azocellulose and α-Cyclodextrin: Isothermal Titration Calorimetric and Spectroscopic Studies. *Macromolecules* **2005**, *38* (7), 2859–2864. https://doi.org/10.1021/ma048324l.
(196) Zou, L.; Braegelman, A. S.; Webber, M. J. Dynamic Supramolecular Hydrogels Spanning an Unprecedented Range of Host–Guest Affinity. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11* (6), 5695–5700. https://doi.org/10.1021/acsami.8b22151.
(197) Thordarson, P. Determining Association Constants from Titration Experiments in Supramolecular Chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40* (3), 1305–1323. https://doi.org/10.1039/C0CS00062K.
(198) Shi, J.; Guo, D.-S.; Ding, F.; Liu, Y. Unique Regioselective Binding of Permethylated β-Cyclodextrin with Azobenzene Derivatives. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, *2009* (6), 923–931. https://doi.org/10.1002/ejoc.200800829.
(199) Sanchez, A. M.; de Rossi, R. H. Effect of β-Cyclodextrin on the Thermal Cis- Trans

Isomerization of Azobenzenes. *J. Org. Chem.* **1996**, *61* (10), 3446–3451.
(200) Rullo, A.; Reiner, A.; Reiter, A.; Trauner, D.; Isacoff, E. Y.; Woolley, G. A. Long Wavelength Optical Control of Glutamate Receptor Ion Channels Using a Tetra-Ortho-Substituted Azobenzene Derivative. *Chem. Commun.* **2014**, *50* (93), 14613–14615. https://doi.org/10.1039/C4CC06612J.
(201) Law, H.; Benito, J. M.; García Fernández, J. M.; Jicsinszky, L.; Crouzy, S.; Defaye, J. Copper(II)-Complex Directed Regioselective Mono- *p* -Toluenesulfonylation of Cyclomaltoheptaose at a Primary Hydroxyl Group Position: An NMR and Molecular Dynamics-Aided Design. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115* (23), 7524–7532. https://doi.org/10.1021/jp2035345.
(202) Hocine, S.; Li, M.-H. Thermoresponsive Self-Assembled Polymer Colloids in Water. *Soft Matter* **2013**, *9* (25), 5839–5861. https://doi.org/10.1039/C3SM50428J.
(203) Graham, N. B.; Zulfiqar, M.; Nwachuku, N. E.; Rashid, A. Interaction of Poly(Ethylene Oxide) with Solvents: 2. Water-Poly(Ethylene Glycol). *Polymer* **1989**, *30* (3), 528–533. https://doi.org/10.1016/0032-3861(89)90026-8.
(204) Ashbaugh, H. S.; Paulaitis, M. E. Monomer Hydrophobicity as a Mechanism for the LCST Behavior of Poly(Ethylene Oxide) in Water. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2006**, *45* (16), 5531–5537. https://doi.org/10.1021/ie051131h.
(205) Smith, G. D.; Bedrov, D. Roles of Enthalpy, Entropy, and Hydrogen Bonding in the Lower Critical Solution Temperature Behavior of Poly(Ethylene Oxide)/Water Solutions. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107* (14), 3095–3097. https://doi.org/10.1021/jp0270046.
(206) Han, J.; Weng, Y.; Xu, J.; Guo, B. Thermo-Sensitive Micelles Based on Amphiphilic Poly(Butylene 2-Methylsuccinate)-Poly(Ethylene Glycol) Multi-Block Copolyesters as the Pesticide Carriers. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2019**, *575*, 84–93. https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2019.04.057.
(207) Scheiner, S.; Čuma, M. Relative Stability of Hydrogen and Deuterium Bonds. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (6), 1511–1521. https://doi.org/10.1021/ja9530376.
(208) Sheu, S.-Y.; Schlag, E. W.; Selzle, H. L.; Yang, D.-Y. Molecular Dynamics of Hydrogen Bonds in Protein−D $_2$ O: The Solvent Isotope Effect. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112* (5), 797–802. https://doi.org/10.1021/jp0771668.
(209) Cho, Y.; Sagle, L. B.; Iimura, S.; Zhang, Y.; Kherb, J.; Chilkoti, A.; Scholtz, J. M.; Cremer, P. S. Hydrogen Bonding of β-Turn Structure Is Stabilized in D2O. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (42), 15188–15193. https://doi.org/10.1021/ja9040785.
(210) Whitten, D. G.; Wildes, P. D.; Pacifici, J. G.; Jr, G. I. Solvent and Substituent on the Thermal Isomerization of Substituted Azobenzenes. Flash Spectroscopic Study. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 2004–2008. https://doi.org/10.1021/ja00737a027.
(211) Asano, T.; Okada, T.; Shinkai, S.; Shigematsu, K.; Kusano, Y.; Manabe, O. Temperature and Pressure Dependences of Thermal Cis-to-Trans Isomerization of Azobenzenes Which Evidence an Inversion Mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103* (17), 5161–5165. https://doi.org/10.1021/ja00407a034.
(212) Baba, K.; Ono, H.; Itoh, E.; Itoh, S.; Noda, K.; Usui, T.; Ishihara, K.; Inamo, M.; Takagi, H. D.; Asano, T. Kinetic Study of ThermalZ ToE Isomerization Reactions of Azobenzene and 4-Dimethylamino-4′-Nitroazobenzene in Ionic Liquids [1-R-3-Methylimidazolium Bis(Trifluoromethylsulfonyl)Imide with R=Butyl, Pentyl, and Hexyl]. *Chem. - Eur. J.* **2006**, *12* (20), 5328–5333. https://doi.org/10.1002/chem.200600081.
(213) Bléger, D.; Schwarz, J.; Brouwer, A. M.; Hecht, S. O-Fluoroazobenzenes as Readily Synthesized Photoswitches Offering Nearly Quantitative Two-Way Isomerization with Visible Light. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (51), 20597–20600. https://doi.org/10.1021/ja310323y.

(214) Bandara, H. M. D.; Burdette, S. C. Photoisomerization in Different Classes of Azobenzene. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (5), 1809–1825. https://doi.org/10.1039/C1CS15179G.
(215) Yin, T.-T.; Zhao, Z.-X.; Zhang, H.-X. Theoretical Study of Substituent and Charge Effects on the Thermal Cis → Trans Isomerization of Ortho-Fluoroazobenzenes Photoswitches. *Org. Electron.* **2018**, *52*, 61–70. https://doi.org/10.1016/j.orgel.2017.10.002.
(216) Metters, A.; Hubbell, J. Network Formation and Degradation Behavior of Hydrogels Formed by Michael-Type Addition Reactions. *Biomacromolecules* **2005**, *6* (1), 290–301. https://doi.org/10.1021/bm049607o.
(217) Nair, D. P.; Podgórski, M.; Chatani, S.; Gong, T.; Xi, W.; Fenoli, C. R.; Bowman, C. N. The Thiol-Michael Addition Click Reaction: A Powerful and Widely Used Tool in Materials Chemistry. *Chem. Mater.* **2014**, *26* (1), 724–744. https://doi.org/10.1021/cm402180t.
(218) Lutz, J.-F.; Hoth, A. Preparation of Ideal PEG Analogues with a Tunable Thermosensitivity by Controlled Radical Copolymerization of 2-(2-Methoxyethoxy)Ethyl Methacrylate and Oligo(Ethylene Glycol) Methacrylate. *Macromolecules* **2006**, *39* (2), 893–896. https://doi.org/10.1021/ma0517042.
(219) Porsch, C.; Hansson, S.; Nordgren, N.; Malmström, E. Thermo-Responsive Cellulose-Based Architectures: Tailoring LCST Using Poly(Ethylene Glycol) Methacrylates. *Polym. Chem.* **2011**, *2* (5), 1114–1123. https://doi.org/10.1039/C0PY00417K.
(220) Kajiyama, M. Chapter 17 - The Chemistry of Bis-Maleimides Used in Adhesives. In *Adhesion Science and Engineering*; Dillard, D. A., Pocius, A. V., Chaudhury, M., Eds.; Elsevier Science B.V.: Amsterdam, 2002; pp 813–822. https://doi.org/10.1016/B978-044451140-9/50017-2.
(221) Fujita, K.; Matsunaga, A.; Imoto, T. 6A6B, 6A6C, and 6A6D-Ditosylates of β-Cyclodextrin. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25* (48), 5533–5536. https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)81618-X.
(222) Agnihotri, S. A.; Aminabhavi, T. M. Novel Interpenetrating Network Chitosan-Poly(Ethylene Oxide-g-Acrylamide) Hydrogel Microspheres for the Controlled Release of Capecitabine. *Int. J. Pharm.* **2006**, *324* (2), 103–115. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.05.061.
(223) Spagnol, C.; Rodrigues, F. H. A.; Pereira, A. G. B.; Fajardo, A. R.; Rubira, A. F.; Muniz, E. C. Superabsorbent Hydrogel Composite Made of Cellulose Nanofibrils and Chitosan-Graft-Poly(Acrylic Acid). *Carbohydr. Polym.* **2012**, *87* (3), 2038–2045. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.10.017.
(224) Amasya, G.; Inal, O.; Sengel-Turk, C. T. SLN Enriched Hydrogels for Dermal Application: Full Factorial Design Study to Estimate the Relationship between Composition and Mechanical Properties. *Chem. Phys. Lipids* **2020**, *228*, 104889. https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2020.104889.
(225) Doehlert, D. H. Uniform Shell Designs. *J. R. Stat. Soc. Ser. C Appl. Stat.* **1970**, *19* (3), 231–239. https://doi.org/10.2307/2346327.
(226) Ferreira, S. L. C.; Dos Santos, W. N. L.; Quintella, C. M.; Neto, B. B.; Bosque-Sendra, J. M. Doehlert Matrix: A Chemometric Tool for Analytical Chemistry-Review. *Talanta* **2004**, *63* (4), 1061–1067. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2004.01.015.
(227) Jansen, L. E.; Negrón-Piñeiro, L. J.; Galarza, S.; Peyton, S. R. Control of Thiol-Maleimide Reaction Kinetics in PEG Hydrogel Networks. *Acta Biomater.* **2018**, *70*, 120–128. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.01.043.
(228) Johnson, B. D.; Beebe, D. J.; Crone, W. C. Effects of Swelling on the Mechanical Properties of a PH-Sensitive Hydrogel for Use in Microfluidic Devices. *Mater. Sci. Eng.*

C **2004**, *24* (4), 575–581. https://doi.org/10.1016/j.msec.2003.11.002.
(229) Northrop, B. H.; Frayne, S. H.; Choudhary, U. Thiol–Maleimide "Click" Chemistry: Evaluating the Influence of Solvent, Initiator, and Thiol on the Reaction Mechanism, Kinetics, and Selectivity. *Polym. Chem.* **2015**, *6* (18), 3415–3430. https://doi.org/10.1039/C5PY00168D.
(230) Lutolf, M. P.; Tirelli, N.; Cerritelli, S.; Cavalli, L.; Hubbell, J. A. Systematic Modulation of Michael-Type Reactivity of Thiols through the Use of Charged Amino Acids. *Bioconjug. Chem.* **2001**, *12* (6), 1051–1056. https://doi.org/10.1021/bc015519e.
(231) Kloxin, A. M.; Kloxin, C. J.; Bowman, C. N.; Anseth, K. S. Mechanical Properties of Cellularly Responsive Hydrogels and Their Experimental Determination. *Adv. Mater.* **2010**, *22* (31), 3484–3494. https://doi.org/10.1002/adma.200904179.
(232) Zhao, F.; Bonasera, A.; Nöchel, U.; Behl, M.; Bléger, D. Reversible Modulation of Elasticity in Fluoroazobenzene-Containing Hydrogels Using Green and Blue Light. *Macromol. Rapid Commun.* **2018**, *39* (1), 1700527. https://doi.org/10.1002/marc.201700527.
(233) Normand, V.; Lootens, D. L.; Amici, E.; Plucknett, K. P.; Aymard, P. New Insight into Agarose Gel Mechanical Properties. *Biomacromolecules* **2000**, *1* (4), 730–738. https://doi.org/10.1021/bm005583j.
(234) Roberts, J. J.; Earnshaw, A.; Ferguson, V. L.; Bryant, S. J. Comparative Study of the Viscoelastic Mechanical Behavior of Agarose and Poly(Ethylene Glycol) Hydrogels. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **2011**, *99B* (1), 158–169. https://doi.org/10.1002/jbm.b.31883.
(235) Peppas, N. A.; Huang, Y.; Torres-Lugo, M.; Ward, J. H.; Zhang, J. Physicochemical Foundations and Structural Design of Hydrogels in Medicine and Biology. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2000**, *2* (1), 9–29. https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.2.1.9.
(236) Oyen, M. L. Mechanical Characterisation of Hydrogel Materials. *Int. Mater. Rev.* **2014**, *59* (1), 44–59. https://doi.org/10.1179/1743280413Y.0000000022.
(237) Peppas, N. A.; Hilt, J. Z.; Khademhosseini, A.; Langer, R. Hydrogels in Biology and Medicine: From Molecular Principles to Bionanotechnology. *Adv. Mater.* **2006**, *18* (11), 1345–1360. https://doi.org/10.1002/adma.200501612.
(238) Zustiak, S. P.; Leach, J. B. Characterization of Protein Release from Hydrolytically Degradable Poly(Ethylene Glycol) Hydrogels. *Biotechnol. Bioeng.* **2011**, *108* (1), 197–206. https://doi.org/10.1002/bit.22911.
(239) Richbourg, N. R.; Peppas, N. A. The Swollen Polymer Network Hypothesis: Quantitative Models of Hydrogel Swelling, Stiffness, and Solute Transport. *Prog. Polym. Sci.* **2020**, *105*, 101243. https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2020.101243.
(240) Singh, Y. P.; Bhardwaj, N.; Mandal, B. B. Potential of Agarose/Silk Fibroin Blended Hydrogel for in Vitro Cartilage Tissue Engineering. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8* (33), 21236–21249. https://doi.org/10.1021/acsami.6b08285.
(241) Arslan, M.; Gevrek, T. N.; Sanyal, A.; Sanyal, R. Cyclodextrin Mediated Polymer Coupling via Thiol–Maleimide Conjugation: Facile Access to Functionalizable Hydrogels. *RSC Adv.* **2014**, *4* (101), 57834–57841. https://doi.org/10.1039/C4RA12408A.
(242) Lee, I.-N.; Dobre, O.; Richards, D.; Ballestrem, C.; Curran, J. M.; Hunt, J. A.; Richardson, S. M.; Swift, J.; Wong, L. S. Photoresponsive Hydrogels with Photoswitchable Mechanical Properties Allow Time-Resolved Analysis of Cellular Responses to Matrix Stiffening. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10* (9), 7765–7776. https://doi.org/10.1021/acsami.7b18302.
(243) Binnig, G.; Quate, C. F.; Gerber, Ch. Atomic Force Microscope. *Phys. Rev. Lett.* **1986**, *56* (9), 930–933. https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.56.930.

(244) Jones, J. E.; Chapman, S. On the Determination of Molecular Fields.—I. From the Variation of the Viscosity of a Gas with Temperature. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. Contain. Pap. Math. Phys. Character* **1924**, *106* (738), 441–462. https://doi.org/10.1098/rspa.1924.0081.
(245) Lennard-Jones, J. E. Cohesion. *Proc. Phys. Soc.* **1931**, *43* (5), 461–482. https://doi.org/10.1088/0959-5309/43/5/301.
(246) Martin, Y.; Williams, C. C.; Wickramasinghe, H. K. Atomic Force Microscope–Force Mapping and Profiling on a Sub 100-Å Scale. *J. Appl. Phys.* **1987**, *61* (10), 4723–4729. https://doi.org/10.1063/1.338807.
(247) Domke, J.; Radmacher, M. Measuring the Elastic Properties of Thin Polymer Films with the Atomic Force Microscope. *Langmuir* **1998**, *14* (12), 3320–3325. https://doi.org/10.1021/la9713006.
(248) Cappello, J.; d'Herbemont, V.; Lindner, A.; du Roure, O. Microfluidic In-Situ Measurement of Poisson's Ratio of Hydrogels. *Micromachines* **2020**, *11* (3), 318. https://doi.org/10.3390/mi11030318.
(249) Bouklas, N.; Huang, R. Swelling Kinetics of Polymer Gels: Comparison of Linear and Nonlinear Theories. *Soft Matter* **2012**, *8* (31), 8194–8203. https://doi.org/10.1039/C2SM25467K.
(250) Lin, D. C.; Dimitriadis, E. K.; Horkay, F. Robust Strategies for Automated AFM Force Curve Analysis—I. Non-Adhesive Indentation of Soft, Inhomogeneous Materials. *J. Biomech. Eng.* **2006**, *129* (3), 430–440. https://doi.org/10.1115/1.2720924.
(251) Selby, A.; Maldonado-Codina, C.; Derby, B. Influence of Specimen Thickness on the Nanoindentation of Hydrogels: Measuring the Mechanical Properties of Soft Contact Lenses. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2014**, *35*, 144–156. https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2013.11.023.
(252) Walderhaug, H.; Söderman, O. NMR Studies of Block Copolymer Micelles. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2009**, *14* (3), 171–177. https://doi.org/10.1016/j.cocis.2008.10.001.
(253) Parenti, F.; Tassinari, F.; Libertini, E.; Lanzi, M.; Mucci, A. Π-Stacking Signature in NMR Solution Spectra of Thiophene-Based Conjugated Polymers. *ACS Omega* **2017**, *2* (9), 5775–5784. https://doi.org/10.1021/acsomega.7b00943.
(254) Wu, S.; Wang, L.; Kroeger, A.; Wu, Y.; Zhang, Q.; Bubeck, C. Block Copolymers of PS-b-PEO Co-Assembled with Azobenzene-Containing Homopolymers and Their Photoresponsive Properties. *Soft Matter* **2011**, *7* (24), 11535–11545. https://doi.org/10.1039/C1SM06316B.
(255) Reuter, R.; Wegner, H. A. Switchable 3D Networks by Light Controlled π-Stacking of Azobenzene Macrocycles. *Chem. Commun.* **2012**, *49* (2), 146–148. https://doi.org/10.1039/C2CC35974J.
(256) Bo, Q.; Zhao, Y. Fluorescence from an Azobenzene-Containing Diblock Copolymer Micelle in Solution. *Langmuir* **2007**, *23* (10), 5746–5751. https://doi.org/10.1021/la063551x.
(257) Ren, H.; Chen, D.; Shi, Y.; Yu, H.; Fu, Z. A Carboxylic Azo Monomer and Its Homopolymer: Synthesis, Self-Organization and Fluorescence Behaviour in Solution. *Polym. Chem.* **2015**, *6* (2), 270–277. https://doi.org/10.1039/C4PY01062K.
(258) Takagishi, T.; Katayama, A.; Konishi, K.; Kuroki, N. The Solubilities of Azobenzene Derivatives in Water. *Kolloid-Z. Z. Für Polym.* **1969**, *232* (1), 693–699. https://doi.org/10.1007/BF01500166.
(259) Nicolai, T.; Colombani, O.; Chassenieux, C. Dynamic Polymeric Micelles versus Frozen Nanoparticles Formed by Block Copolymers. *Soft Matter* **2010**, *6* (14), 3111–3118. https://doi.org/10.1039/B925666K.

(260) Lu, Y.; Zou, H.; Yuan, H.; Gu, S.; Yuan, W.; Li, M. Triple Stimuli-Responsive Supramolecular Assemblies Based on Host-Guest Inclusion Complexation between β-Cyclodextrin and Azobenzene. *Eur. Polym. J.* **2017**, *91*, 396–407. https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.04.028.
(261) Jug, M.; Mura, P. Grinding as Solvent-Free Green Chemistry Approach for Cyclodextrin Inclusion Complex Preparation in the Solid State. *Pharmaceutics* **2018**, *10* (4), 189. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10040189.
(262) Thomas, P.; Smart, T. G. HEK293 Cell Line: A Vehicle for the Expression of Recombinant Proteins. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2005**, *51* (3), 187–200. https://doi.org/10.1016/j.vascn.2004.08.014.
(263) Majkut, S.; Idema, T.; Swift, J.; Krieger, C.; Liu, A.; Discher, D. E. Heart-Specific Stiffening in Early Embryos Parallels Matrix and Myosin Expression to Optimize Beating. *Curr. Biol.* **2013**, *23* (23), 2434–2439. https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.10.057.
(264) Dague, E.; Genet, G.; Lachaize, V.; Guilbeau-Frugier, C.; Fauconnier, J.; Mias, C.; Payré, B.; Chopinet, L.; Alsteens, D.; Kasas, S.; Severac, C.; Thireau, J.; Heymes, C.; Honton, B.; Lacampagne, A.; Pathak, A.; Sénard, J.-M.; Galés, C. Atomic Force and Electron Microscopic-Based Study of Sarcolemmal Surface of Living Cardiomyocytes Unveils Unexpected Mitochondrial Shift in Heart Failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2014**, *74*, 162–172. https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.05.006.
(265) Shapira-Schweitzer, K.; Seliktar, D. Matrix Stiffness Affects Spontaneous Contraction of Cardiomyocytes Cultured within a PEGylated Fibrinogen Biomaterial. *Acta Biomater.* **2007**, *3* (1), 33–41. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2006.09.003.
(266) Jacot, J. G.; Kita-Matsuo, H.; Wei, K. A.; Chen, H. S. V.; Omens, J. H.; Mercola, M.; Mcculloch, A. D. Cardiac Myocyte Force Development during Differentiation and Maturation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2010**, *1188*, 121–127. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05091.x.
(267) Hadden, W. J.; Young, J. L.; Holle, A. W.; McFetridge, M. L.; Kim, D. Y.; Wijesinghe, P.; Taylor-Weiner, H.; Wen, J. H.; Lee, A. R.; Bieback, K.; Vo, B.-N.; Sampson, D. D.; Kennedy, B. F.; Spatz, J. P.; Engler, A. J.; Choi, Y. S. Stem Cell Migration and Mechanotransduction on Linear Stiffness Gradient Hydrogels. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2017**, *114* (22), 5647–5652. https://doi.org/10.1073/pnas.1618239114.
(268) Mosqueira, D.; Pagliari, S.; Uto, K.; Ebara, M.; Romanazzo, S.; Escobedo-Lucea, C.; Nakanishi, J.; Taniguchi, A.; Franzese, O.; Di Nardo, P.; Goumans, M. J.; Traversa, E.; Pinto-do-Ó, P.; Aoyagi, T.; Forte, G. Hippo Pathway Effectors Control Cardiac Progenitor Cell Fate by Acting as Dynamic Sensors of Substrate Mechanics and Nanostructure. *ACS Nano* **2014**, *8* (3), 2033–2047. https://doi.org/10.1021/nn4058984.
(269) Buschmann, M. D.; Gluzband, Y. A.; Grodzinsky, A. J.; Kimura, J. H.; Hunziker, E. B. Chondrocytes in Agarose Culture Synthesize a Mechanically Functional Extracellular Matrix. *J. Orthop. Res.* **1992**, *10* (6), 745–758. https://doi.org/10.1002/jor.1100100602.
(270) Pauly, H. M.; Place, L. W.; Haut Donahue, T. L.; Kipper, M. J. Mechanical Properties and Cell Compatibility of Agarose Hydrogels Containing Proteoglycan Mimetic Graft Copolymers. *Biomacromolecules* **2017**, *18* (7), 2220–2229. https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b00643.
(271) Mayfield, A. E.; Tilokee, E. L.; Latham, N.; McNeill, B.; Lam, B.-K.; Ruel, M.; Suuronen, E. J.; Courtman, D. W.; Stewart, D. J.; Davis, D. R. The Effect of Encapsulation of Cardiac Stem Cells within Matrix-Enriched Hydrogel Capsules on Cell Survival, Post-Ischemic Cell Retention and Cardiac Function. *Biomaterials* **2014**, *35* (1), 133–142. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.09.085.
(272) Ahearne, M.; Yang, Y.; El Haj, A. J.; Then, K. Y.; Liu, K.-K. Characterizing the

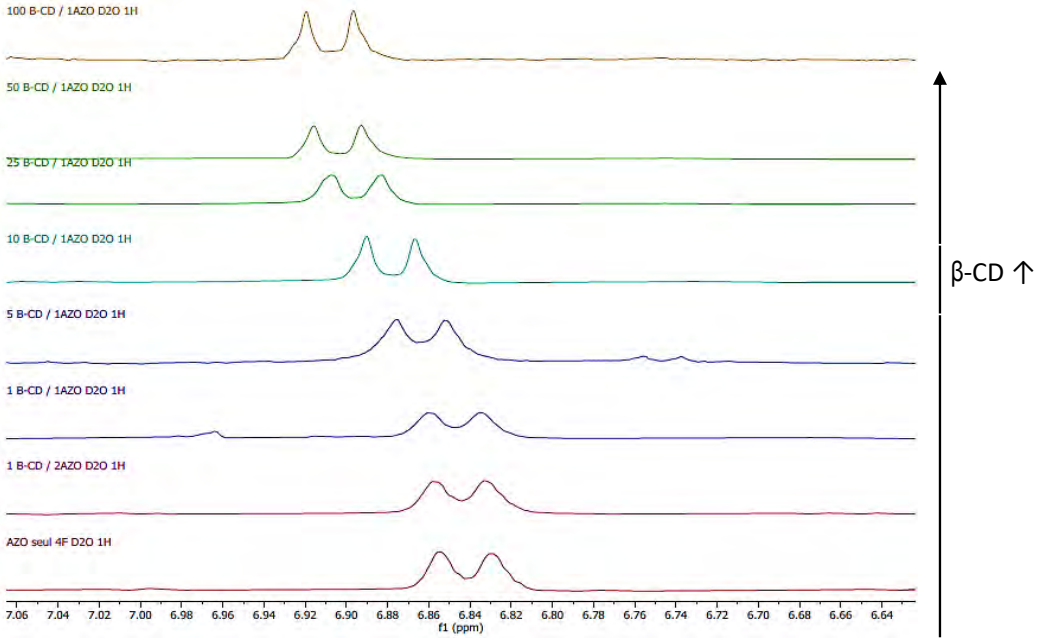
Viscoelastic Properties of Thin Hydrogel-Based Constructs for Tissue Engineering Applications. *J. R. Soc. Interface* **2005**, *2* (5), 455–463. https://doi.org/10.1098/rsif.2005.0065.
(273) Buckley, C. T.; Thorpe, S. D.; O'Brien, F. J.; Robinson, A. J.; Kelly, D. J. The Effect of Concentration, Thermal History and Cell Seeding Density on the Initial Mechanical Properties of Agarose Hydrogels. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2009**, *2* (5), 512–521. https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2008.12.007.
(274) Pan, H.-A.; Hung, Y.-C.; Sui, Y.-P.; Huang, G. S. Topographic Control of the Growth and Function of Cardiomyoblast H9c2 Cells Using Nanodot Arrays. *Biomaterials* **2012**, *33* (1), 20–28. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.09.054.
(275) Alcantar, N. A.; Aydil, E. S.; Israelachvili, J. N. Polyethylene Glycol–Coated Biocompatible Surfaces. *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, *51* (3), 343–351. https://doi.org/10.1002/1097-4636(20000905)51:3<343::AID-JBM7>3.0.CO;2-D.
(276) Zuluaga-Vélez, A.; Cómbita-Merchán, D. F.; Buitrago-Sierra, R.; Santa, J. F.; Aguilar-Fernández, E.; Sepúlveda-Arias, J. C. Silk Fibroin Hydrogels from the Colombian Silkworm Bombyx Mori L: Evaluation of Physicochemical Properties. *PLOS ONE* **2019**, *14* (3), e0213303. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213303.
(277) Münch, J.; Abdelilah-Seyfried, S. Sensing and Responding of Cardiomyocytes to Changes of Tissue Stiffness in the Diseased Heart. *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *9*, 403. https://doi.org/10.3389/fcell.2021.642840.
(278) Pawley, J. B. Fundamental Limits in Confocal Microscopy. In *Handbook Of Biological Confocal Microscopy*; Pawley, J. B., Ed.; Springer US: Boston, MA, 2006; pp 20–42. https://doi.org/10.1007/978-0-387-45524-2_2.
(279) Power, R. M.; Huisken, J. A Guide to Light-Sheet Fluorescence Microscopy for Multiscale Imaging. *Nat. Methods* **2017**, *14* (4), 360–373. https://doi.org/10.1038/nmeth.4224.
(280) Voie, A. H.; Burns, D. H.; Spelman, F. A. Orthogonal-Plane Fluorescence Optical Sectioning: Three-Dimensional Imaging of Macroscopic Biological Specimens. *J. Microsc.* **1993**, *170* (3), 229–236. https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1993.tb03346.x.
(281) Huisken, J.; Swoger, J.; Del Bene, F.; Wittbrodt, J.; Stelzer, E. H. K. Optical Sectioning Deep Inside Live Embryos by Selective Plane Illumination Microscopy. *Science* **2004**, *305* (5686), 1007–1009. https://doi.org/10.1126/science.1100035.
(282) Gebhardt, J. C. M.; Suter, D. M.; Roy, R.; Zhao, Z. W.; Chapman, A. R.; Basu, S.; Maniatis, T.; Xie, X. S. Single-Molecule Imaging of Transcription Factor Binding to DNA in Live Mammalian Cells. *Nat. Methods* **2013**, *10* (5), 421–426. https://doi.org/10.1038/nmeth.2411.
(283) Holekamp, T. F.; Turaga, D.; Holy, T. E. Fast Three-Dimensional Fluorescence Imaging of Activity in Neural Populations by Objective-Coupled Planar Illumination Microscopy. *Neuron* **2008**, *57* (5), 661–672. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.01.011.
(284) Wang, F.; Wan, H.; Ma, Z.; Zhong, Y.; Sun, Q.; Tian, Y.; Qu, L.; Du, H.; Zhang, M.; Li, L.; Ma, H.; Luo, J.; Liang, Y.; Li, W. J.; Hong, G.; Liu, L.; Dai, H. Light-Sheet Microscopy in the near-Infrared II Window. *Nat. Methods* **2019**, *16* (6), 545–552. https://doi.org/10.1038/s41592-019-0398-7.
(285) Bailar Jr., J. C.; Jones, E. M.; Booth, H. S.; Grennert, M. Trioxalato Salts (Trioxalatoaluminiate, -Ferriate, -Chromiate, and -Cobaltiate). In *Inorganic Syntheses*; John Wiley & Sons, Ltd, 1939; pp 35–38. https://doi.org/10.1002/9780470132326.ch13.
(286) Brynn Hibbert, D.; Thordarson, P. The Death of the Job Plot, Transparency, Open Science and Online Tools, Uncertainty Estimation Methods and Other Developments in Supramolecular Chemistry Data Analysis. *Chem. Commun.* **2016**, *52* (87), 12792–12805. https://doi.org/10.1039/C6CC03888C.

(287) Payre, B.; Gontier, E.; Jarray, A.; Martinez, Y.; Laugier, J. P.; Delalleau, A.; Gaillard, B. M.; Anselme, I.; Goudounèche, D.; Fourquaux, I.; Hemati, M.; Gerbaud, V.; Delisle, M. B.; Guilbeau-Frugier, C. A New HPF Specimen Carrier Adapter for the Use of High-Pressure Freezing with Cryoscanning Electron Microscope: Two Applications: Stearic Acid Organization in a Hydroxypropyl Methylcellulose Matrix and Mice Myocardium. *J. Microsc.* **2018**, *271* (3), 255–265. https://doi.org/10.1111/jmi.12713.
(288) Brandrup, J.; Immergut, E. H.; McDowell, W. *Polymer Handbook.*; Wiley: New York, 1975.
(289) Wang, R.; Macartney, D. H. Cucurbit[7]Uril Host–Guest Complexes of the Histamine H2-Receptor Antagonist Ranitidine. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6* (11), 1955–1960. https://doi.org/10.1039/B801591K.
(290) Rajaram, R.; Sundararajalu, K. N.; Meenakshisundaram, S. Unusual Excited State Characteristics of 6-Aminobenzothiazole with β-Cyclodextrin. *J. Fluoresc.* **2011**, *21* (2), 521–529. https://doi.org/10.1007/s10895-010-0738-6.
(291) Ge, X.; He, J.; Yang, Y.; Qi, F.; Huang, Z.; Lu, R.; Huang, L.; Yao, X. Study on Inclusion Complexation between Plant Growth Regulator 6-Benzylaminopurine and β-Cyclodextrin: Preparation, Characterization and Molecular Modeling. *J. Mol. Struct.* **2011**, *994* (1–3), 163–169. https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2011.03.013.
(292) Nowakowski, M.; Ejchart, A. Complex Formation of Fenchone with α-Cyclodextrin: NMR Titrations. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2014**, *79* (3–4), 337–342. https://doi.org/10.1007/s10847-013-0356-4.
(293) Sun, D.-Z.; Li, L.; Qiu, X.-M.; Liu, F.; Yin, B.-L. Isothermal Titration Calorimetry and 1H NMR Studies on Host–Guest Interaction of Paeonol and Two of Its Isomers with β-Cyclodextrin. *Int. J. Pharm.* **2006**, *316* (1–2), 7–13. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.02.020.
(294) Hamai, S. Inclusion of Methyl 2-Naphthalenecarboxylate and Dimethyl 2,3-, 2,6-, and 2,7-Naphthalenedicarboxylates by Cyclodextrins in Aqueous Solution. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2010**, *83* (12), 1489–1500. https://doi.org/10.1246/bcsj.20100214.
(295) Nagai, Y.; Tsutsumi, Y.; Nakashima, N.; Fujigaya, T. Synthesis of Single-Walled Carbon Nanotubes Coated with Thiol-Reactive Gel via Emulsion Polymerization. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140* (27), 8544–8550. https://doi.org/10.1021/jacs.8b03873.
(296) Dolci, E.; Froidevaux, V.; Joly-Duhamel, C.; Auvergne, R.; Boutevin, B.; Caillol, S. Maleimides As a Building Block for the Synthesis of High Performance Polymers. *Polym. Rev.* **2016**, *56* (3), 512–556. https://doi.org/10.1080/15583724.2015.1116094.

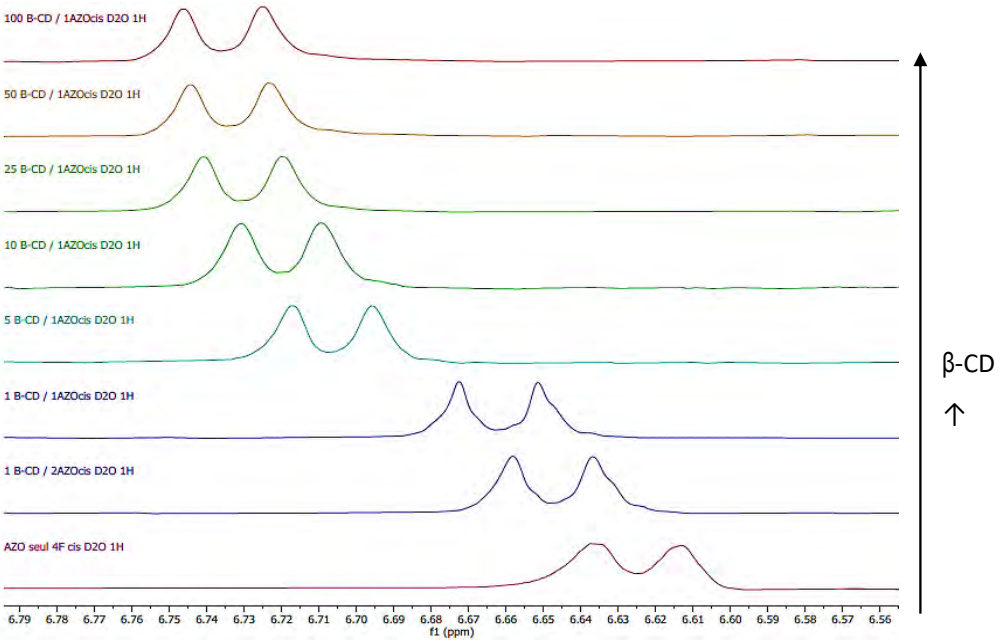
Annexe 1 : Avantages et inconvénients des différentes techniques utilisées dans la littérature pour déterminer les caractéristiques de complexes hôte-invité.

Inconnue	Méthode	Technique	Avantages	Limites	Références
Stœchiométrie	Job Plot	UV-Visible	-facile à mettre en œuvre	-nécessite un écart assez important entre les spectres de la molécule invitée et du complexe	289,290
		RMN	-complexation facilement repérable -indices sur la géométrie du complexe -méthode précise	-plus couteux	291
		Dichroïsme circulaire	-facile à mettre en œuvre -informe sur la géométrie du complexe	-analyses chronophages	184
	Titrage	UV-Visible	-facile à mettre en œuvre		289
		RMN	-analyses précises	-plus couteux	292
		ITC	-donne accès aux paramètres thermodynamiques		195,293
		Dichroïsme circulaire	-facile à mettre en œuvre	-analyses chronophages	140
		Fluorescence	-permet d'étudier les complexes où l'invité est présent sous forme de dimères		294
Constante d'association	Titrage	UV-Visible	-facile à mettre en œuvre	-difficile de déterminer des constantes trop faibles (<1000 $L.mol^{-1}$)	195,289
		RMN	-méthode précise -permet de calculer de très faibles constantes	-plus couteux	164,292
		ITC	-méthode précise -donne accès aux paramètres thermodynamiques de la réaction de complexation -permet de calculer de très faibles constantes		195, 293
		Fluorescence	-permet d'étudier les complexes où l'invité est présent sous forme de dimères		290,294

Annexe 2 : Dosage du 4F-AZO-POE trans et cis par la β-CD par RMN



Spectres ^{1}H RMN montrant le déplacement du signal du proton H3 du 4F-AZO-POE-T dans D_2O en présence de concentrations croissantes de β-CD.



Spectres ^{1}H RMN montrant le déplacement du signal du proton H3' du 4F-AZO-POE-C dans D_2O en présence de concentrations croissantes de β-CD.

ANNEXE 3 : Synthèse du terpolymère à partir de trois synthons par Specific Polymers

Synthèse du monomère méthacrylate-POE-maléimide (POE-MA-m_p) :

Réalisée en deux étapes, cette synthèse met en jeu la synthèse d'un synthon maléimide protégé par la réaction de Diels-Alder entre le maléimide et le DMFu puis le greffage de ce synthon par la réaction de Mitsunobu avec le POE-MA-OH (500 g.mol^{-1})[295]. (Figure 188)

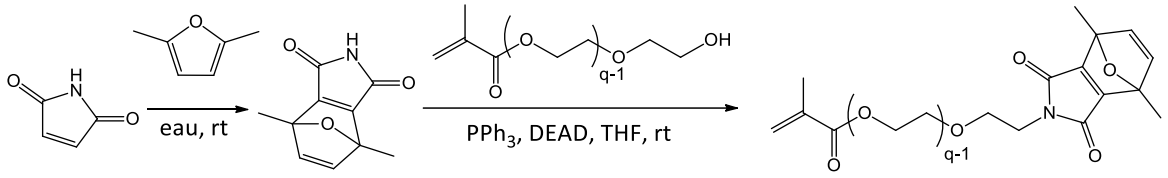


Figure 188: Voie de synthèse en deux étapes pour l'obtention du POE-MA-m_p.

La première étape de Diels-Alder entre le maléimide et le diméthylfurane fonctionne (SP-GELLIGHT-27), et permet l'obtention du maléimide protégé diméthylfurane avec un rendement de 75% (30g) et une pureté de 95%. Le spectre RMN ^{1}H du produit final est présenté en Figure 189

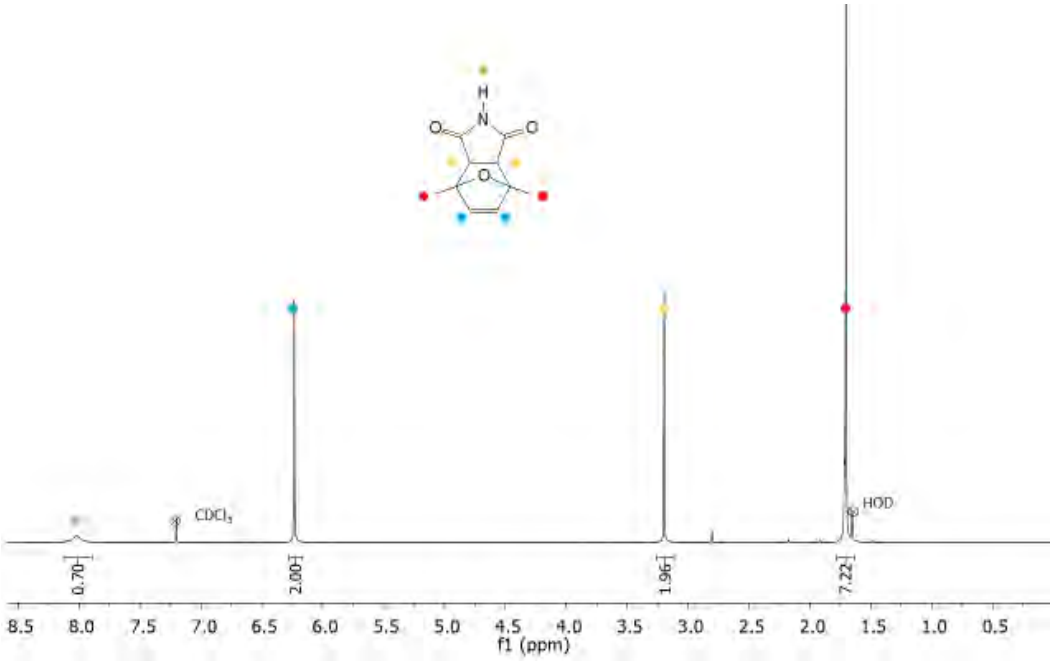


Figure 189 : Spectre RMN ^{1}H du maléimide protégé diméthylfurane (SP-GELLIGHT-27).

La seconde étape de Mitsunobu entre le maléimide protégé et le POE-MA-OH (SP-GELLIGHT-28) fonctionne également. Cependant, malgré une purification par chromatographie sur colonne de silice (éluant DCM/MeOH), la pureté du produit obtenu n'est

que de 70%. Des impuretés provenant du POE-MA-OH commercial, des résidus de diéthylazodicarboxtlate mais également d'autres signaux non identifiés sont présents sur le spectre RMN ^{1}H du produit final. Le rendement est par ailleurs assez faible (37%), probablement du fait de pertes lors de la purification sur colonne. Un lot de 10g de POE-MA-m_p a ainsi été obtenu.

A l'issue de la seconde synthèse (SP-GELLIGHT-51), les conditions d'élution lors de la purification sur colonne sont optimisées, ce qui permet d'obtenir un lot de POE-MA-m_p ayant une pureté améliorée de 85%wt (au lieu de 70%wt). Le produit contient encore des résidus de DEAD et d'impuretés issues du POE-MA-OH commercial (Figure 190). Par ailleurs, le rendement est très faible, de l'ordre de 25%, correspondant à 9g de produit final.

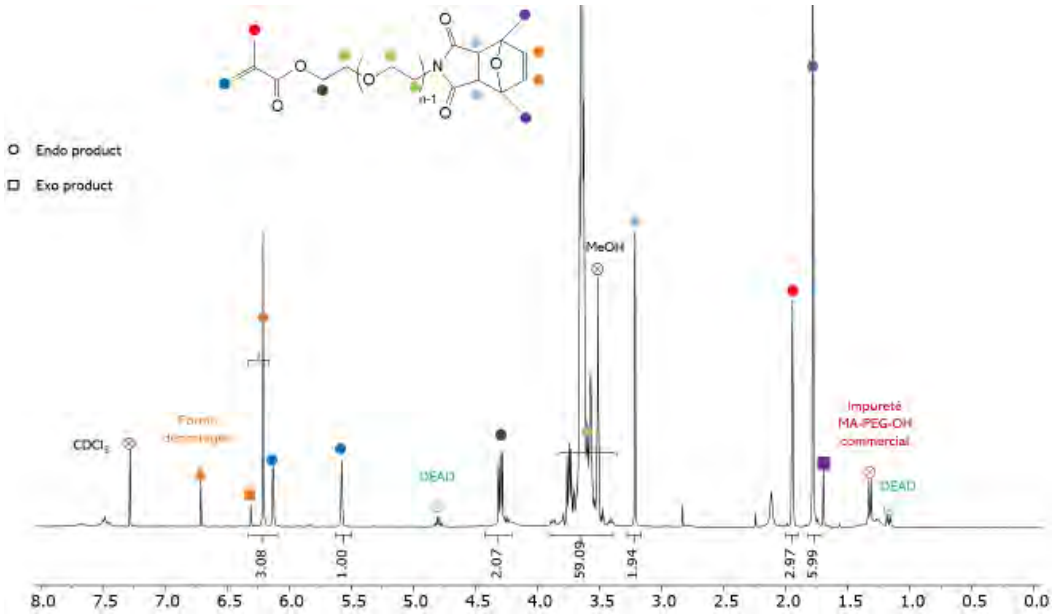


Figure 190: Spectre RMN ^{1}H du POE-MA-m_p diméthylfurane (SP-GELLIGHT-51).

Protocole expérimental :

Dans un ballon de 500mL, le maléimide (20.00g, 0.206mol, 1eq) et le 2,5-diméthylfurane (33.67, 0.350mol, 1.7eq) sont additionnés dans 240mL d'eau, puis mis sous agitation magnétique pendant 72h à température ambiante. Le précipité formé dans le milieu réactionnel est filtré sur fritté Por4 puis séché au dessiccateur afin d'obtenir une poudre blanche.

Le POE-MA-OH (26.82g,0.052mol, 1eq), le maléimide protégé (SP-GELLIGHT-48 : 20.00g, 0.104mol, 2eq) et la triphénylphosphine (31.23g,0.089mol, 2.3eq) sont solubilisés dans 780g de THF anhydre. Le ballon est refroidi à 0°C avant d'ajouter au goutte à goutte, en 30 minutes, le DEAD (40%) (51.83g, 0.119mol, 2.3eq). Le milieu est ensuite laissé sous agitation une nuit à température ambiante. Le THF est évaporé à l'évaporateur rotatif avec une température de bain maximum de 30°C. Le produit est repris dans 300mL d'eau puis extrait deux fois avec

1200mL de dichlorométhane. La phase organique est séchée sur Na_2SO_4, filtrée puis évaporée. Le produit est séparé en trois fractions puis purifié sur colonne chromatographique de silice (DCM/MeOH). La colonne avec une élution isocratique (DCM/MeOH 99/1vol)) apporte la meilleure purification afin d'obtenir un produit visqueux marron.

Synthèse du monomère 4F-AZO-POE-MA

La synthèse du POE-MA-4FAZO consiste en la méthacrylation au chlorure de méthacryloyle de la fonction hydroxyle du POE-MA-4FAZO (Figure 191).

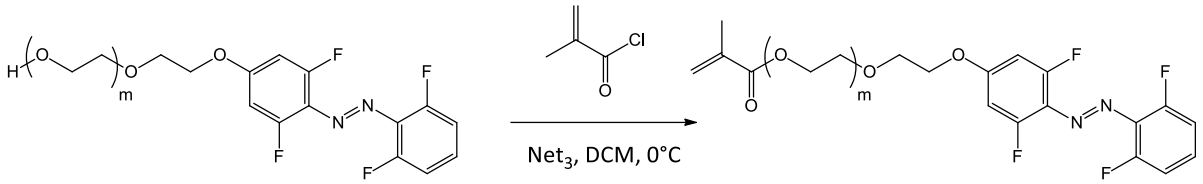


Figure 191: Voie de synthèse pour l'obtention du 4FAZO-POE-MA.

La synthèse est réalisée sur 9,5 g de POE-MA-4FAZO, en ajoutant directement 1,5 éq de chlorure de méthacryloyle, ce qui permet d'atteindre une conversion totale sans ajout de réactif. L'optimisation des conditions de synthèse et de purification permet d'obtenir un le POE-MA-4FAZO avec un rendement de 93% et une pureté de 94% en masse. Les spectres RMN ^{1}H et ^{19}F du monomère sont présentés en Figure 192 et Figure 193 et montrent la conformité de sa structure chimique. La fonction diazobenzène-4F n'a pas isomérisé au cours de la synthèse. Le produit obtenu sous la forme d'un liquide visqueux orange est stocké à 4°C à l'abri de la lumière afin d'éviter une isomérisation ultérieure du diazobenzène.

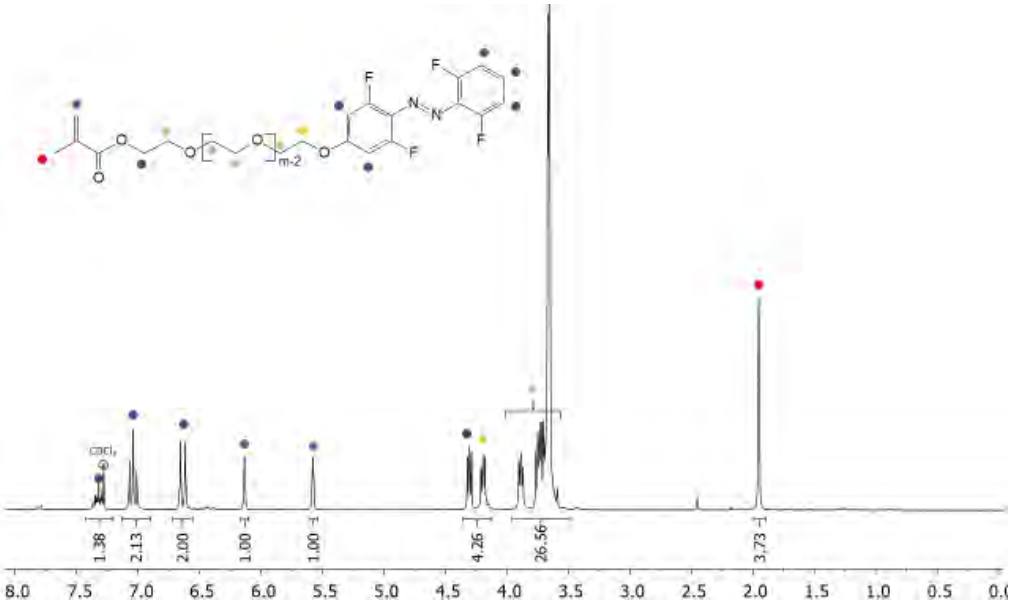


Figure 192: Spectre RMN ^{1}H du POE-MA-4FAZO (SP-GELLIGHT-38)

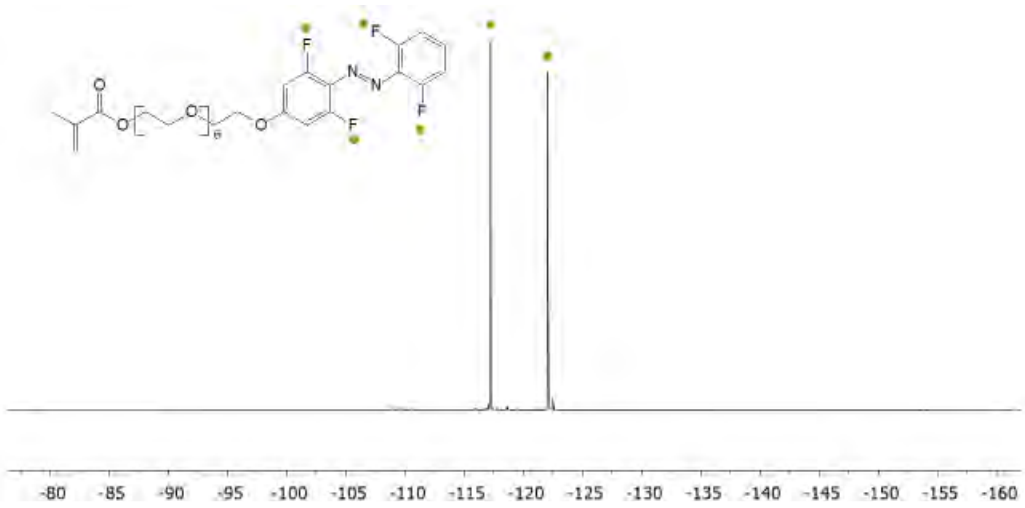


Figure 193: Spectre RMN ^{19}F du POE-MA-4FAZO (SP-GELLIGHT-38)

Protocole expérimental :

Le POE-MA-4FAZO (m=9.5g, 0.016mol, 1eq) et la triéthylamine (m=2.83g, 0.028mol, 1.7eq) sont solubilisés dans 100 mL de dichlorométhane. Le bi-col est inerté sous argon puis plongé dans un bain d'eau glacée avant d'ajouter le chlorure de méthacryloyle (m=2.58g, 2.6mmol, 1.5eq) au goutte à goutte. Une fois l'ajout terminé, le mélange est laissé revenir à température ambiante puis laissé sous agitation pendant 1h30. Le produit est dilué dans 400mL de dichlorométhane puis extrait une fois avec 15mL d'une solution d'HCl 0.5M. La phase organique est mise sous forte agitation avec 50mL de soude 1M pendant 2h, trois fois. La phase organique est ensuite séchée sur Na_2SO_4, filtré puis évaporé à l'évaporateur rotatif afin d'obtenir un produit visqueux marron.

Synthèse du terpolymère par RAFT

Le terpolymère est synthétisé par une polymérisation RAFT (Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfert). Le produit final possédant une fonction maléimide protégée thermosensible, une polymérisation à faible température doit être privilégiée. L'amorceur utilisé est le V-70 dont la structure est présentée Figure 194. Le temps de demi-vie du V-70 à 30°C est $t_{1/2}$ = 10h.

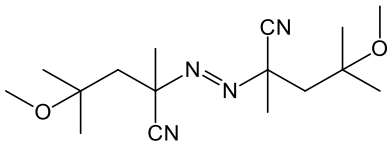


Figure 194: Structure de l'amorceur V-70.

Le terpolymère est synthétisé en deux lots : un premier lot de 0.8 g (SP-Gellight-52) et un second lot de 5.6 g (SP-Gellight-55), dans les conditions suivantes (Figure 195). Les spectre

RMN montrent dans les deux cas la présence de maléimides déprotégés à 6.7 ppm (Figure 196, pic d'intégration 0.05)

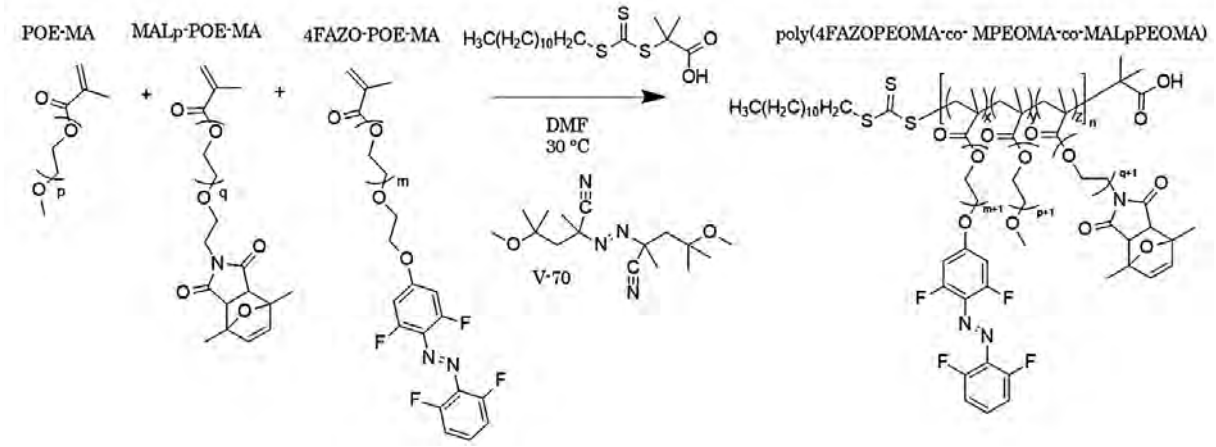


Figure 195: Synthèse du terpolymère par RAFT à 30 °C amorcée au V-70.

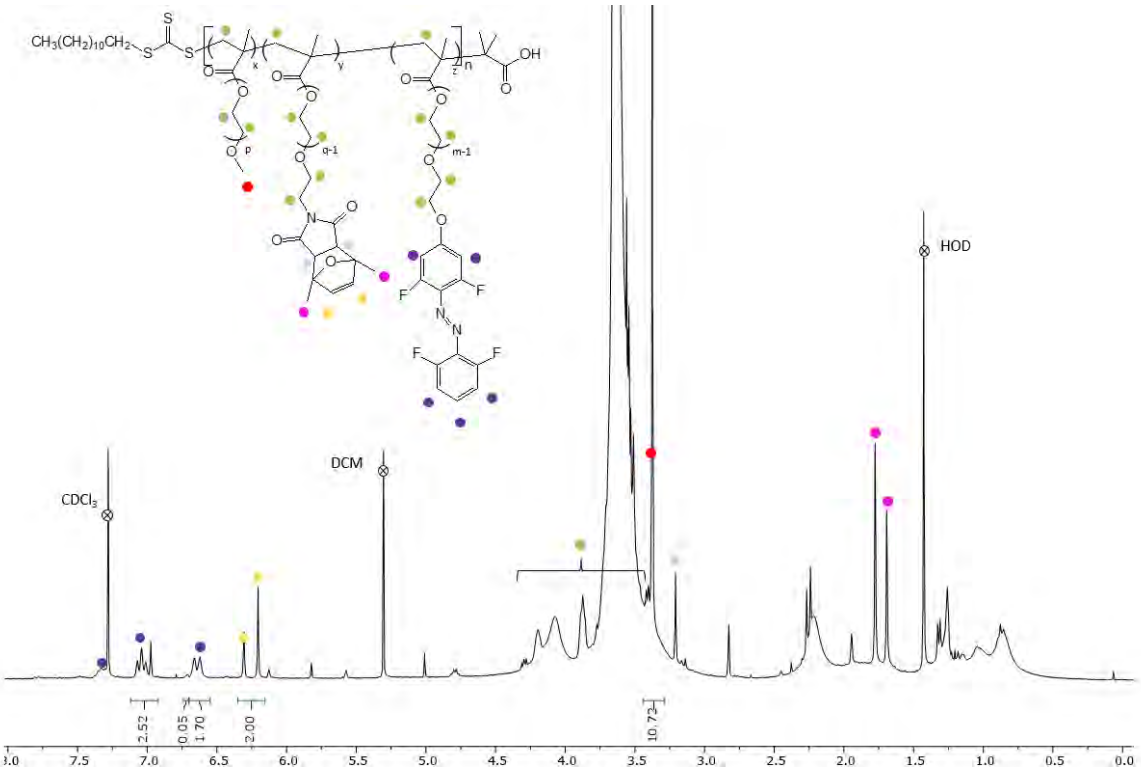


Figure 196: Spectre RMN ^{1}H de SP-Gellight-54.

La polymérisation est arrêtée à au bout de 28h à 30°C, correspondant à un taux de conversion de 68% Le profil GPC est monomodal, et le produit n'est pas réticulé. Après purification par dialyse et précipitation dans un mélange éther/pentane 95/5 v/v, un lot de 0.8g de terpolymère est obtenu sous la forme d'un produit visqueux orange avec un rendement de 31%. Ses caractéristiques, déterminées par RMN ^{1}H et GPC-THF, sont présentées dans le Tableau 53.

	MA-PEG OMe	MA-PEG Maléimide	MA-PEG Diazobenzène	Mn (RMN ^{1}H)	Mn (GPC-THF)
Alimentation	x = 0.55	y=0.30	z=0.15	21400g/mol	/
SP-GELLIGHT-52	x=0.656	y=0.156	z=0.188	21000 g/mol	19100 g/mol
	15.2 unités	3.6 unités *1,5 déprotégée* *2,1 protégées*	4.3 unités		

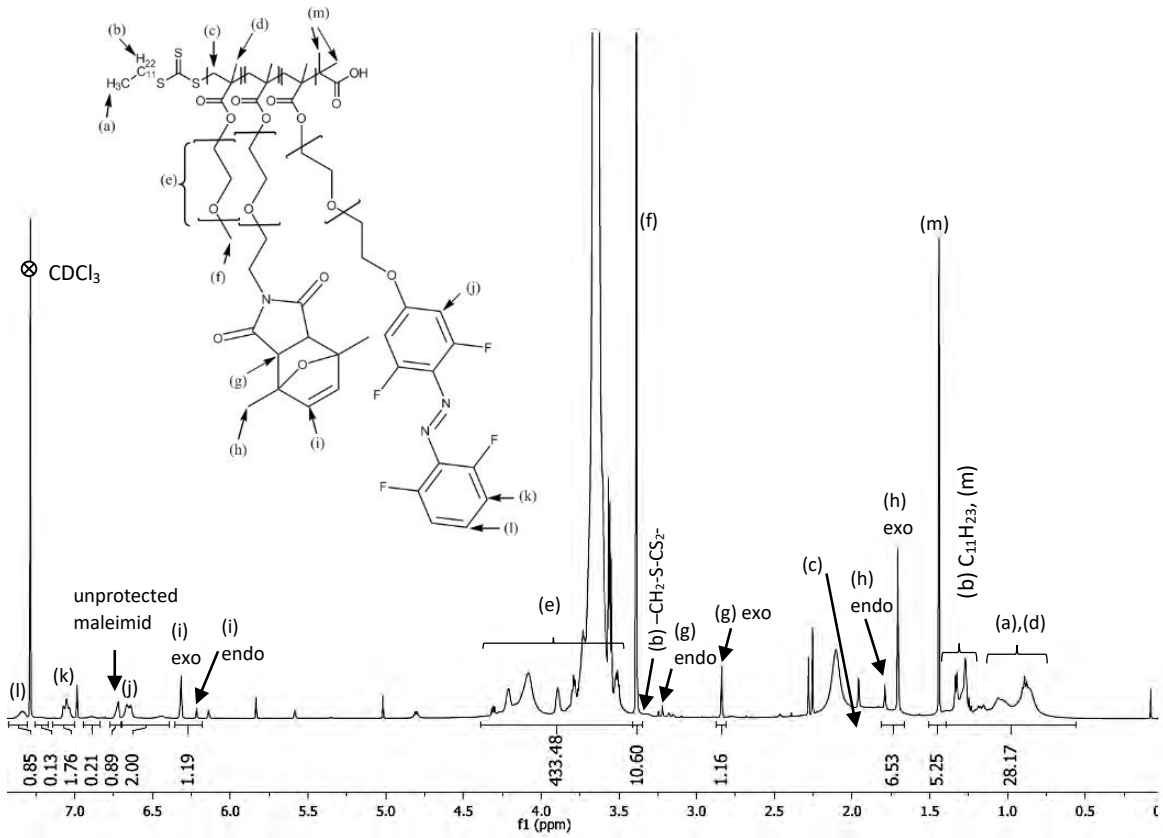
Tableau 53 : Caractérisation du terpolymère SP-GELLIGHT-52.

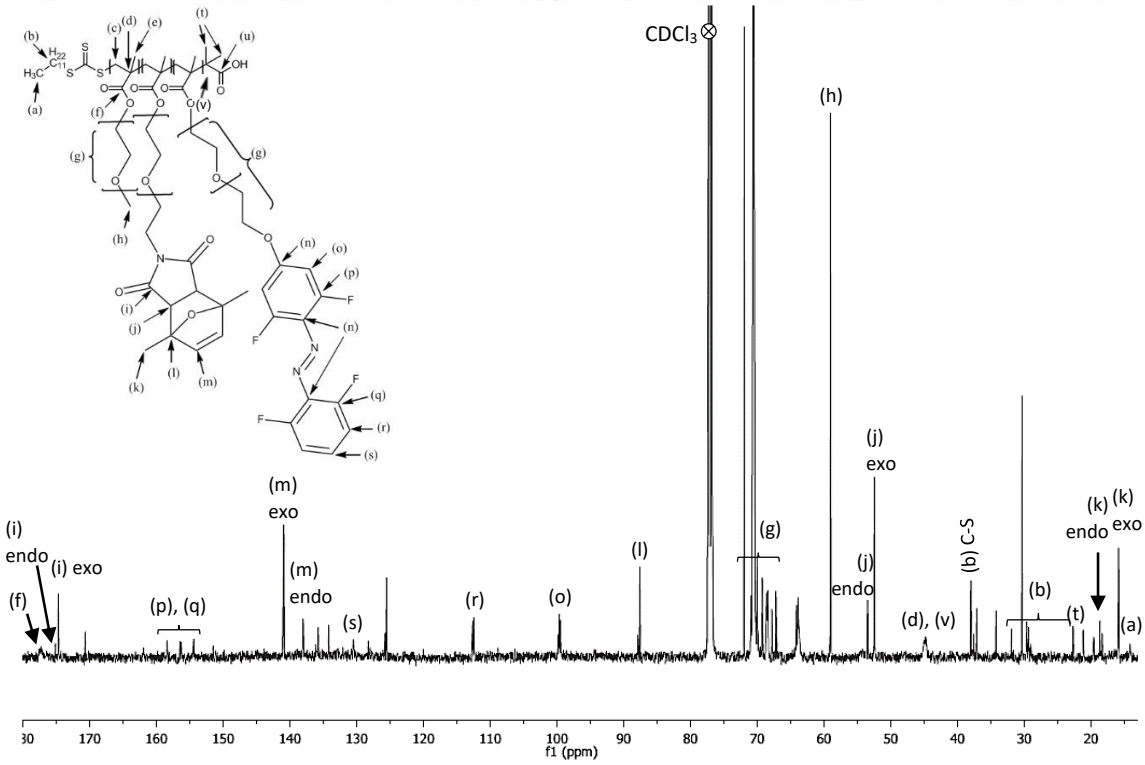
Un pourcentage élevé de fonctions maléimide déprotégé est observé (42%) malgré une température de polymérisation faible (30°C). Le terpolymère possède environ 3.6 unités maléimide par chaîne et est entièrement soluble dans l'eau. La polymérisation par RAFT à 30°C dans le DMF avec un agent de transfert de type trithiocarbonate (DDMAT) et l'amorceur V-70 sont les conditions optimales pour la synthèse d'un terpolymère MA-PEG-OMe/MA-PEG-Maléimide/ POE-MA-4FAZO.

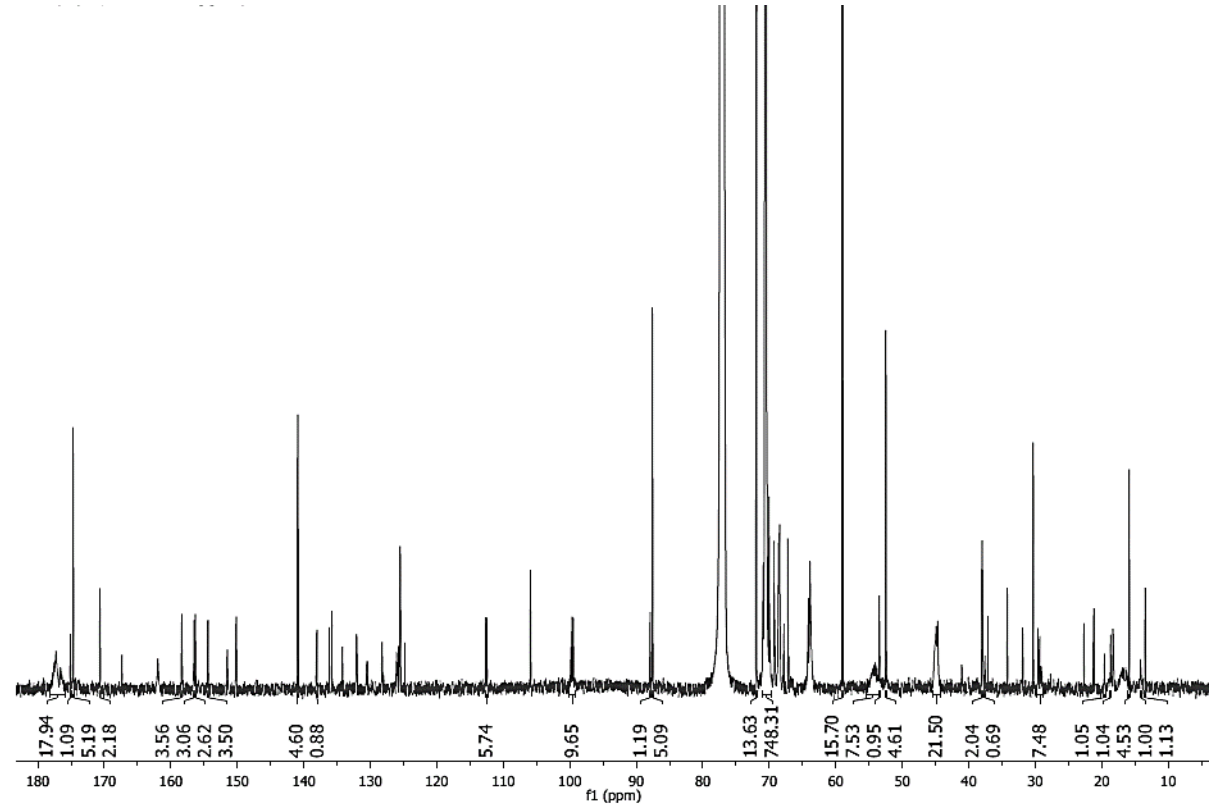
Ces conditions de synthèse sont reproduites à plus grande échelle donnant SP-GELLIGHT-54. La polymérisation est reproductible, puisque le polymère obtenu présente une composition et une masse molaire similaires à celles de SP-GELLIGHT-52. Tout comme lors de l'essai précédent, une déprotection partielle des groupements maléimide est observée. Une dernière étape de reprotection par réaction de Diels-Alder avec le diméthylfurane produisant SP-GELLIGHT-55 est finalement réalisée afin d'éviter la dégradation du polymère lors du stockage. Les caractéristiques de ce nouveau lot sont présentées dans le Tableau 54.

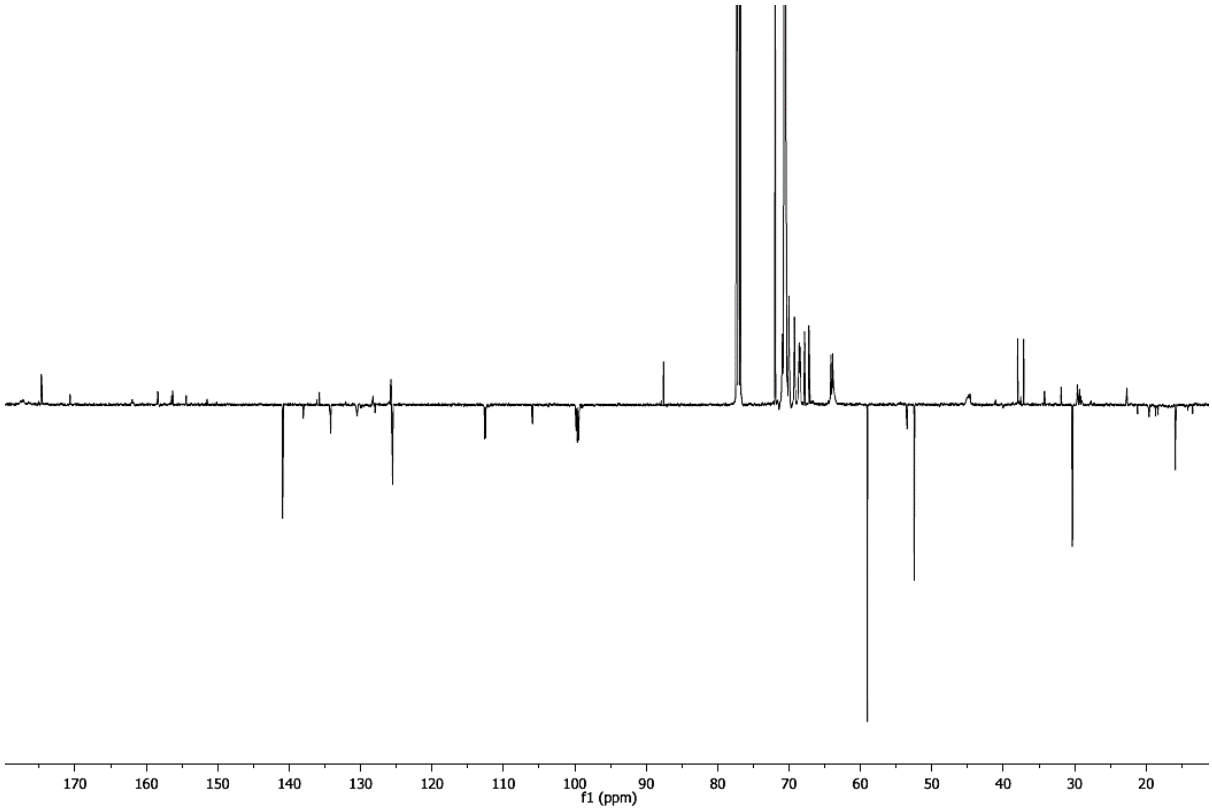
	MA-PEG OMe	MA-PEG Maléimide	MA-PEG Diazobenzène	Mn (RMN ^{1}H)	Mn (GPC-DMF)
SP-GELLIGHT-54 avant reprotection	x=0.628	y=0.165	z=0.207	19200 g/mol	15300 g/mol
	13.4 unités	3.5 unités *1.5 déprotégée* *2.0 protégées*	4.4 unités		
SP-GELLIGHT-55 après reprotection	x=0.656	y=0.188	z=0.156	20000 g/mol	15400 g/mol
	14.3 unités	4.1 unités *0.1 déprotégée* *4 protégées*	3.4 unités		

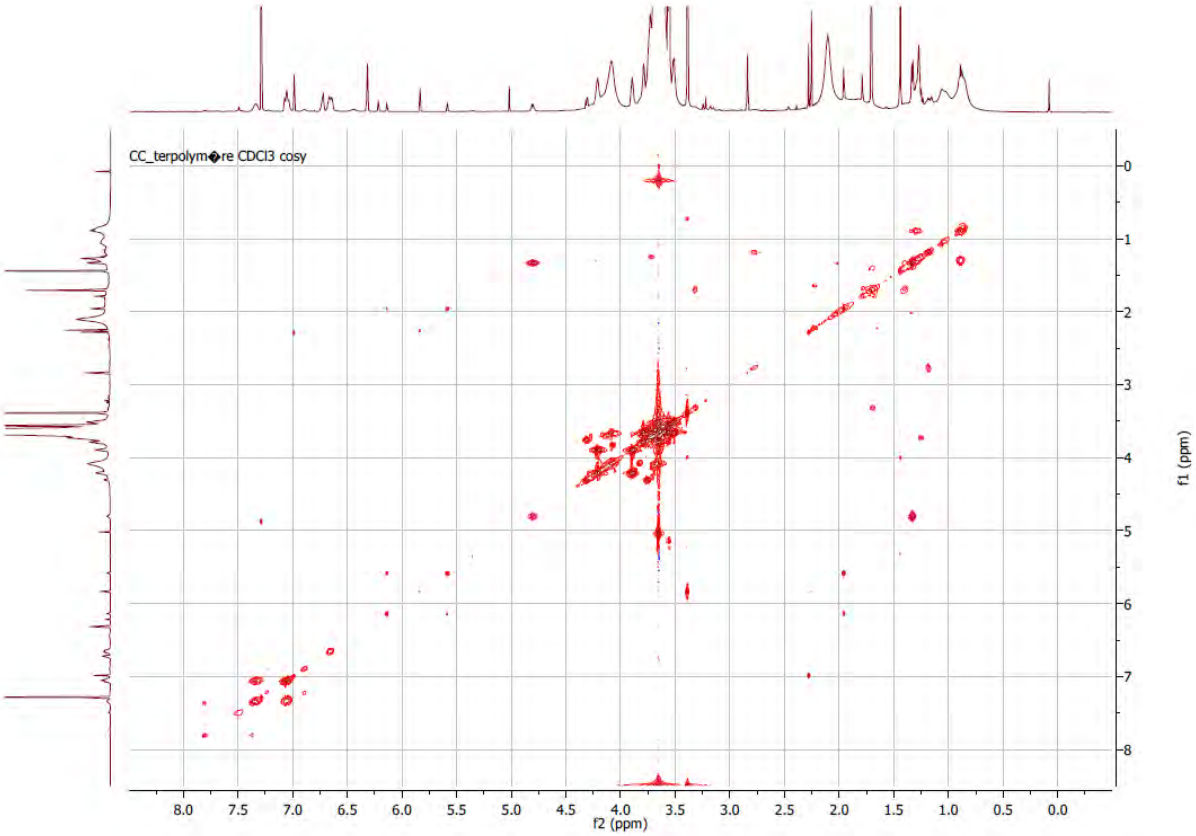
Tableau 54 : Caractéristiques des terpolymères SP-GELLIGHT-54 et SP-GELLIGHT-55.

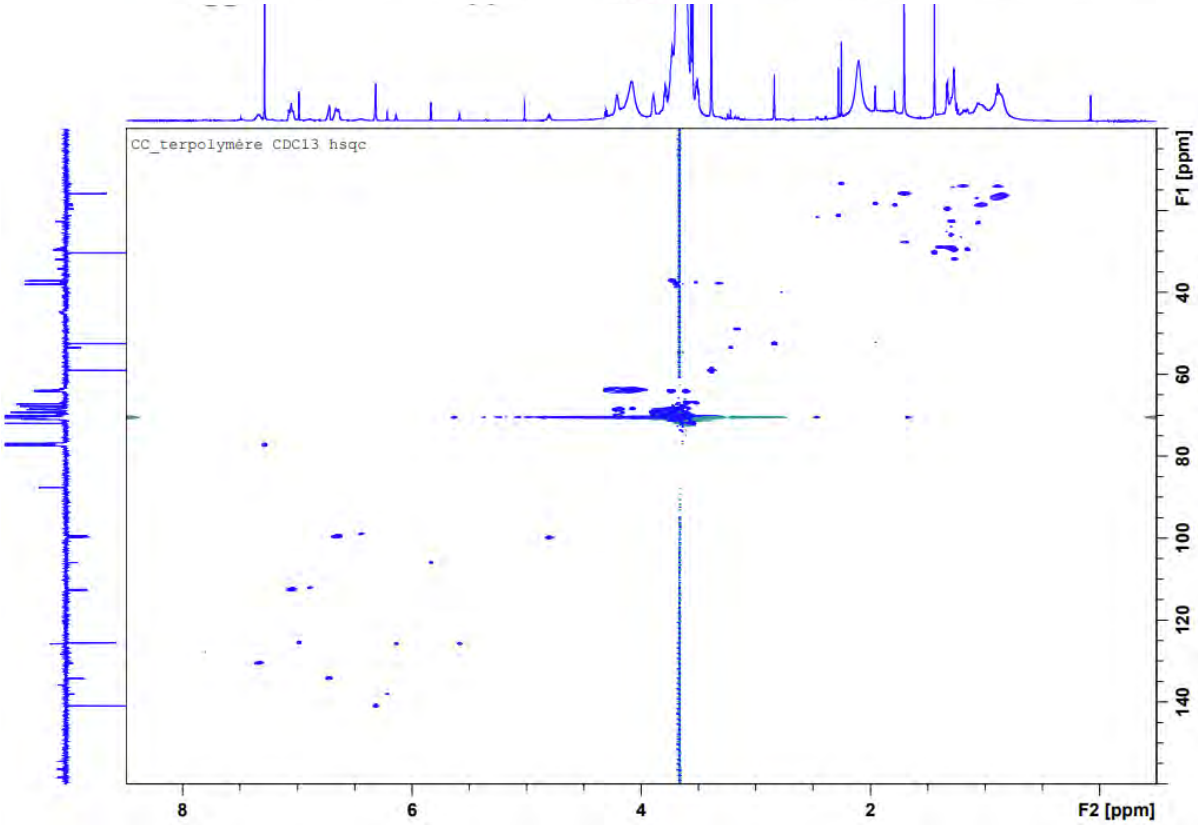

CDCl3
unprotected maleimid
(l)
(k)
(j)
(i) exo
(i) endo
(e)
(f)
(b) –CH2-S-CS2-
(g) endo
(g) exo
(c)
(h) endo
(h) exo
(m)
(b) C11H23, (m)
(a),(d)
0.85
0.13
1.76
0.21
0.89
2.00
1.19
433.48
10.60
1.16
6.53
5.25
28.17
f1 (ppm)


CDCl3
(h)
(j) exo
(j) endo
(g)
(l)
(o)
(r)
(s)
(m) endo
(m) exo
(i) endo
(i) exo
(f)
(p), (q)
(d), (v)
(b) C-S
(b)
(t)
(k) endo
(k) exo
(a)
f1 (ppm)


17.94
1.09
5.19
2.18
3.56
3.06
2.62
3.50
4.60
0.88
5.74
9.65
1.19
5.09
13.63
748.31
15.70
7.53
0.95
4.61
21.50
2.04
0.69
7.48
1.05
1.04
4.53
1.00
1.13
180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10
f1 (ppm)


170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20
f1 (ppm)


CC_terpolym◆re CDCl3 cosy
f2 (ppm)
f1 (ppm)


CC_terpolymère CDCl3 hsqc
F1 [ppm]
F2 [ppm]

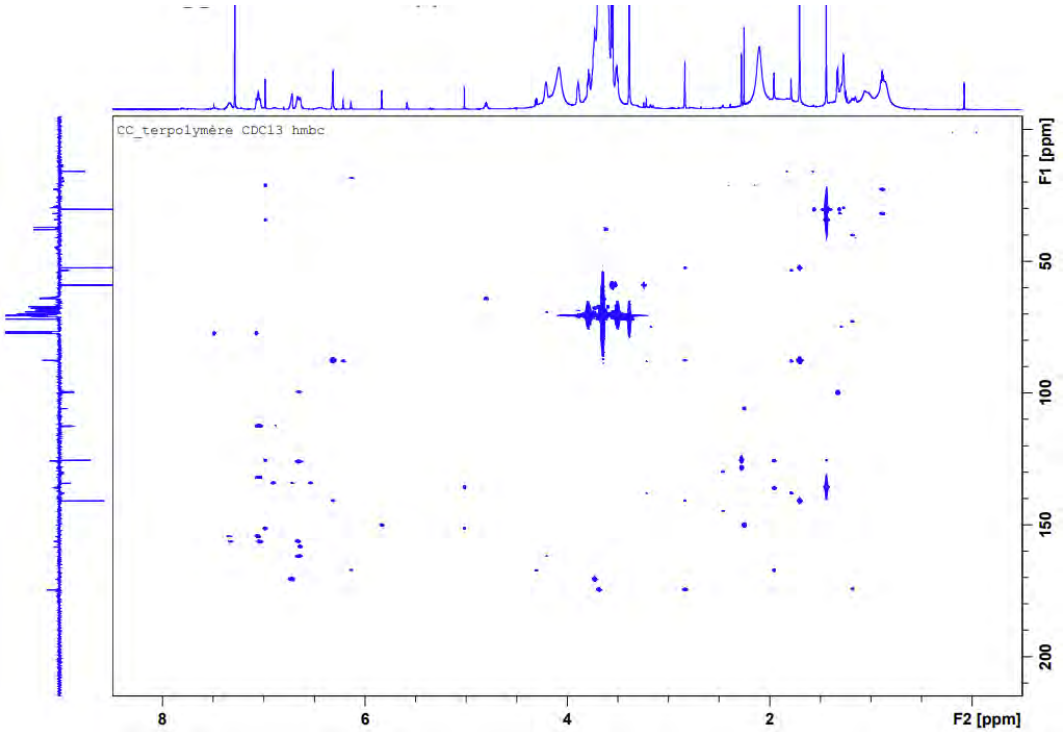


Figure 197 : Spectres RMN ^{1}H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz), ^{13}C quantitative, COSY, HSQC, HMBC du terpolymère (SP-GELLIGHT-55) dans $CDCl_3$.

Protocole expérimental :

Le POE-MA (6.0g, 6.32mmol, 18.8eq), le POE-MA-m_p (SP-GELLIGHT-51 : 3.2g, 3.36mmol, 10eq), le POE-MA-4FAZO (SP-GELLIGHT-38 : 1.09g, 1.69mmol, 5eq), le DDMAT (0.122g, 0.335mmol, 0.5eq) et le V-70 (0.042g, 0.136mmol, 0.4eq) sont solubilisés dans 22.3mL de DMF dans un schlenk de 100mL. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation 46h à 30°C. Le milieu est dilué dans 240mL de THF afin de le dialyser (membrane 1kDa). Le contenu des boudins est ensuite évaporé, puis précipité dans 240mL un mélange pentane/éther (95/5 vol). Le précipité est solubilisé dans du DCM puis évaporé à l'évaporateur rotatif afin d'obtenir un produit visqueux orange.

Dans un ballon monocol, le terpolymère (10.0g) est solubilisé dans 1.5 de dichlorométhane. Puis, 0.67mL de diméthylfurane sont ajoutés. L'ensemble est laissé sous agitation à température ambiante pendant 24h. En fin de réaction, le dichlorométhane est éliminé par évaporation sous vide à 30°C. Le produit final est obtenu sous la forme d'un produit visqueux orange avec un rendement de 63% (5.6g).

<u>Méthode de calcul de la masse molaire du terpolymère</u>

Le calcul de la masse molaire du terpolymère est effectué par RMN ^{1}H. Il est nécessaire de connaitre l'avancement réactionnel au moment de l'arrêt de la réaction et la composition finale du composé. A partir du taux d'avancement on peut déterminer le nombre total d'unités ayant réagi en appliquant ce

pourcentage au nombre initial d'unités engagés pour l'ensemble des monomères. Le nombre total d'unités ayant réagi connu, il faut y appliquer le pourcentage de chaque unité : x, y et z. Ainsi le nombre d'unité de chaque monomère est connu. Il faut ensuite multiplier le nombre d'unités de chaque POE par sa masse molaire respective. Enfin, il faut rajouter à cette valeur la masse molaire de l'agent de transfert utilisé qui correspond au bout de chaîne du polymère.

Annexe 4 : Synthèse des β-CD maléimide par Specific Polymers

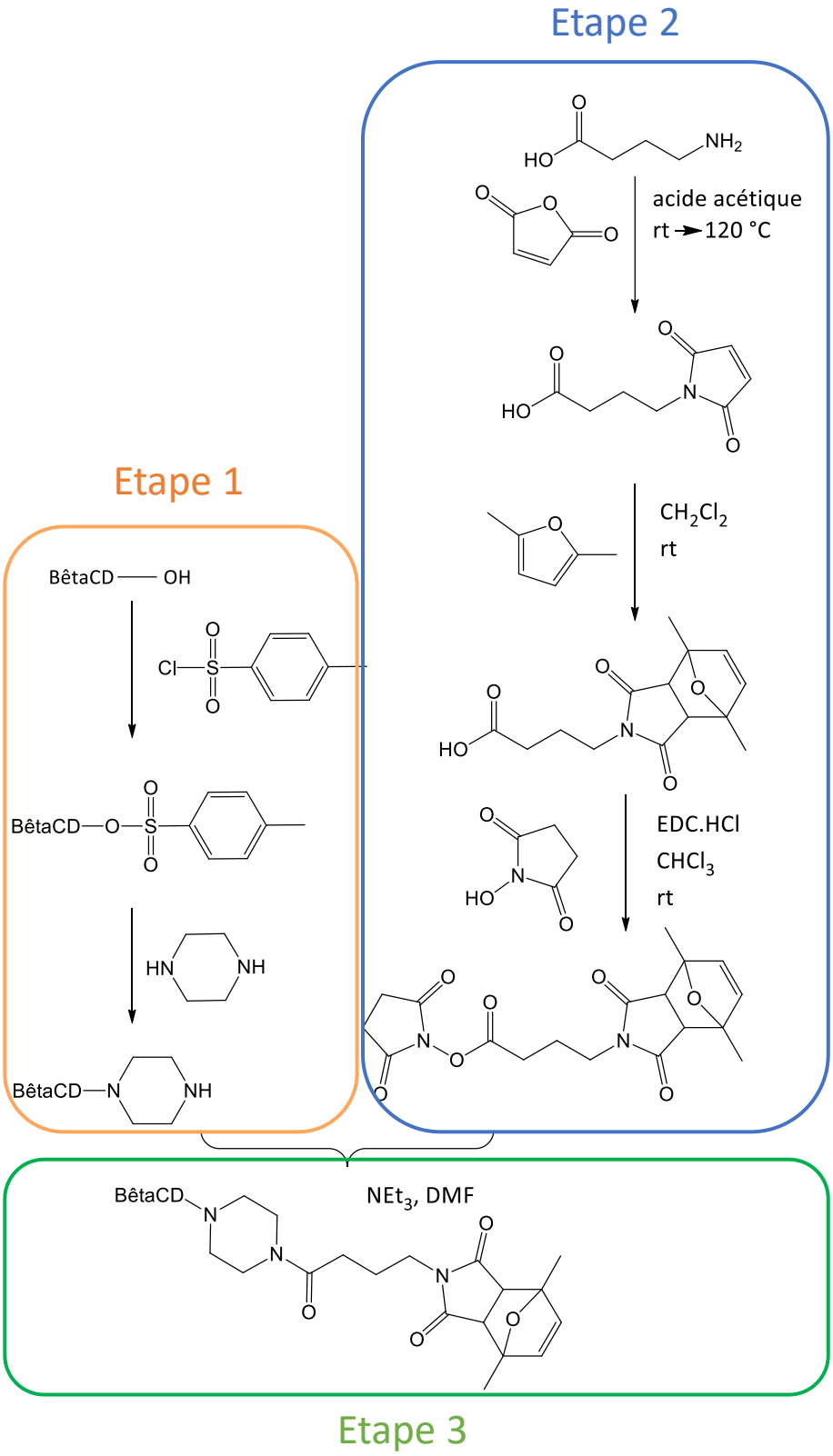


Figure 198 : Synthèse multi-étape de la β-CD-maléimide protégée (β-CD-m_p)

Etape 1 : Synthèse de la β-CD-pipérazine

Cette voie de synthèse nécessite deux étapes comme décrit précédemment (Figure 199). La première étape consiste en la formation de fonctions tosylates par réaction du chlorure de tosyle sur les fonctions hydroxyles de la β-CD. La seconde étape consiste à substituer les fonctions tosylates par la pipérazine.

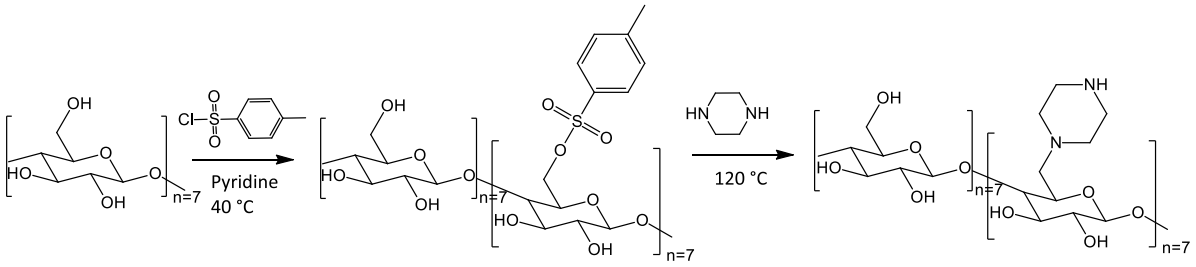


Figure 199: Voie de synthèse de la β-CD-pipérazine.

L'objectif de la tosylation est de greffer un bon groupement partant sur la position 6 (alcool primaire) de la β-Cyclodextrine. Les tosylates sont en effet des fonctions de choix pour les réactions de substitution, et réagissent avec les nucléophiles de la même façon que les halogénures d'alkyle. De cette façon, la β-CD tosylate pourra aisément être convertie en β CD pipérazine lors de l'étape suivante. De plus, seules les fonctions en position C6 sont a priori réactives vis-à-vis de la tosylation, du fait d'une meilleure accessibilité du réactif aux positions C6 externes, qui sont également des alcools primaires plus réactifs que les alcools secondaires des positions C2 et C3.

La réaction de tosylation de la fonction alcool sur le carbone C6 est effectuée avec du chlorure de tosyle dans la pyridine. La pyridine a un double rôle, elle sert à la fois de solvant mais également de base pour capter l'acide chlorhydrique (HCl) libéré lors de la réaction. Les conditions ont été adaptées d'après un article de la littérature décrivant la synthèse de β-CD ditosylate[221].

Afin d'empêcher l'hydrolyse du chlorure de tosyle lors de la réaction, la cyclodextrine est séchée à l'étuve à 80°C pendant une heure avant utilisation. D'après le suivi gravimétrique réalisé avant et après séchage, la β-CD commerciale contient environ 15%wt d'eau (ce qui est cohérent avec les spécifications du certificat d'analyse). La pyridine utilisée est quant à elle préalablement distillée, puis conservée en milieu anhydre sur tamis moléculaire. La tosylation est donc réalisée avec 7 équivalents de chlorure de tosyle. Après 30 min à 40°C, la réaction est arrêtée à l'aide d'un bain d'eau glacée, puis rapidement purifiée pour obtenir la β-CD-tosylée sous la forme d'une poudre blanche avec un rendement de 92% (46g). La β-CD obtenue possède alors une fonctionnalité moyenne de 4.3, déterminée par RMN ^{1}H (Figure 200).

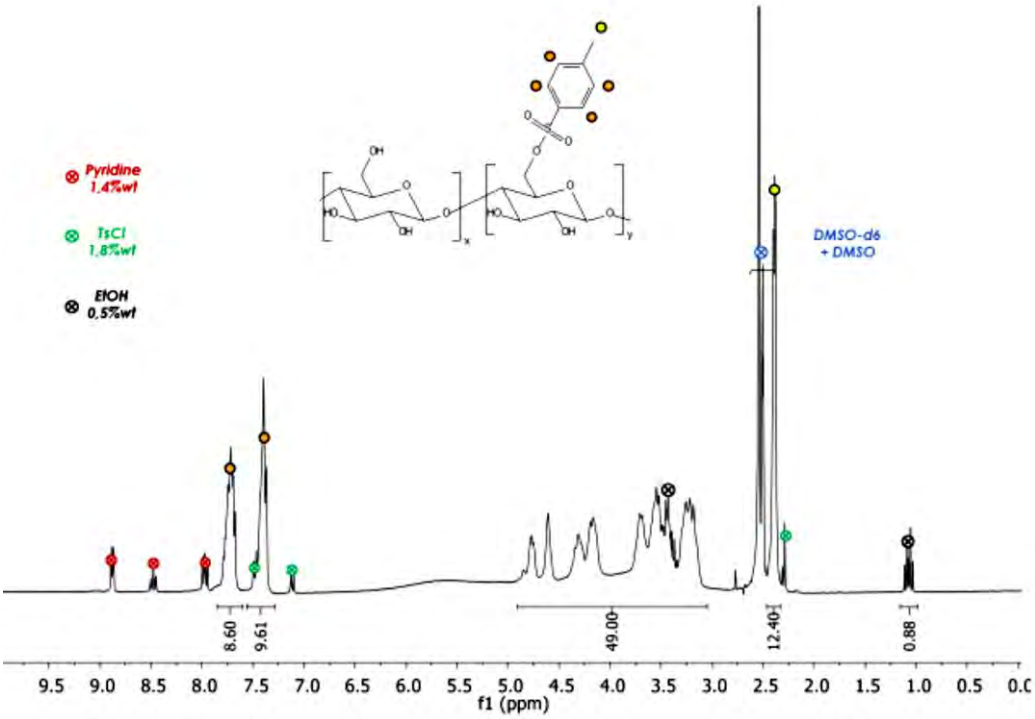


Figure 200: Spectre RMN ^{1}H de la β-CD-OTs : SP-GELLIGHT-21.

L'objectif de la seconde étape de synthèse est d'effectuer une réaction de substitution de la pipérazine sur le groupement tosylate. Les conditions expérimentales ont été adaptées et optimisées d'après un protocole de la littérature[165]. La pipérazine est utilisée comme réactif mais également comme solvant de réaction. La synthèse se fait donc en masse à une température de réaction supérieure à la température de fusion de la pipérazine, c'est-à-dire à 120°C (la température de fusion de la pipérazine étant de 106°C). L'analyse RMN ^{1}H montre que la réaction a fonctionné, puisque la disparition des protons aromatiques du groupement tosylate est observée à 7.35 et 7.7 ppm. L'analyse RMN ^{1}H montre également que le taux de greffage est total, puisqu'aucun signal caractéristique de la fonction tosylate n'est observé sur le spectre final. En revanche, la présence d'APTS résiduel est observée. Afin d'éliminer cette impureté, le composé est purifié à l'aide de résine Amberlite IRA-400. Il s'agit d'une résine échangeuse d'ions porteuse de fonctions ammonium quaternaire qui permettent de fixer les molécules d'APTS. L'analyse RMN ^{1}H du produit après purification montre une disparition totale de l'APTS. Après purification sur résine, 16.5g de produit sont obtenus sous la forme d'une poudre marron clair avec un rendement de 48%.

La comparaison des valeurs d'intégration des signaux caractéristiques du noyau de la cyclodextrine avec ceux de la pipérazine (cf. calcul de la fonctionnalité de la β-CD-pipérazine) permettent d'évaluer la fonctionnalité de la β-CD-pipérazine, qui est estimée à 5.2. Une légère différence est observée par rapport à la β-CD-OTs (fonctionnalité = 4.3), mais ceci est attribué

à la marge d'erreur provenant de l'intégration du spectre RMN ^{1}H du fait du fort étalement des signaux. Cependant, l'ordre de grandeur valide une réaction de couplage totale avec des valeurs de fonctionnalité cohérentes avant et après greffage de la pipérazine.

La β-CD-pipérazine est obtenue en deux étapes avec un rendement global de 44% (Tableau 55). Dans un premier temps le greffage des fonctions tosylates sur la position C6 de la β-CD a été réalisé, suivi de la substitution de ces groupements par la pipérazine. Une quantité de 16.5g de cyclodextrine pipérazine est disponible pour le couplage avec le synthon maléimide.

	β-CD-OTs	β-CD-pipérazine
Manipulation	SP-GELLIGHT-21	SP-GELLIGHT-23
Rendement	92%	48% (Rendement global = 44%)
Quantité	46g	16.5g
Fonctionnalité	4.3	5.2

Tableau 55 : Résultats de la synthèse de la β-CD-pipérazine.

Protocole expérimental

La β-Cyclodextrine (30.00g, 0.026mol, 1éq), préalablement séchée à l'étuve dans un cristallisoir à 80°C pendant 1h, est introduite dans un ballon bicol de 500mL contenant 210g (80%) de pyridine anhydre. Le milieu réactionnel est placé à 40°C sous bullage d'argon. Le chlorure de tosyle (35.28g, 0.185mol, 7eq) est solubilisé dans 50g de pyridine anhydre, puis introduit à l'aide d'une ampoule à addition avec un goutte à goutte rapide sous courant d'argon. Le milieu est laissé sous agitation magnétique à 40°C pendant 30min, puis est directement précipité dans un mélange éther/éthanol (1/1) (3.6L), afin d'obtenir une poudre blanche. Le précipité est solubilisé dans un minimum de DMSO puis précipité à nouveau dans un mélange éther/éthanol (8/2), filtré. Une troisième précipitation dans les mêmes conditions est réalisée, puis le précipité obtenu est mis à l'étuve 3h à 60°C afin d'obtenir une poudre blanche.

La pipérazine (202.73g, 2.354mol, 100eq) est introduite dans un ballon monocol de 250mL sous argon. Le ballon est plongé quasi-intégralement dans un bain d'huile, chauffé à 120°C, afin de faire fondre la pipérazine ($T°_{fusion}$=106°C), puis la β-CD-OTs (45.00g, 0.024mol, 1eq) (SP-GELLIGHT-21) est additionnée et le milieu réactionnel est mis sous agitation magnétique à 120°C pendant 4h. Un volume de 200mL d'eau est additionné dans le ballon afin de faire précipiter l'ensemble dans 2*2000mL d'acétone, puis le précipité est filtré sur fritté Por4. L'opération de précipitation est répétée six fois, avec un volume d'eau de 100mL et un volume d'acétone de 1800mL. Enfin le précipité est mis à sécher au dessiccateur afin d'obtenir une poudre marron. La totalité du précipité est repris dans 300mL et mis sous agitation avec 6g de

résine Amberlite IRA-400. La résine est filtrée sur coton puis le filtrat est précipité dans 2000mL d'un mélange éthanol/acétone (1/1vol) puis filtré sur fritté Por4 afin d'obtenir une poudre beige.

Etape 2 : Synthèse du synthon maléimide protégé

Le synthon maléimide protégé est obtenu par une voie de synthèse en trois étapes (Figure 198). La première étape consiste à synthétiser l'acide maléimidobutyrique via l'ouverture de l'anhydride maléique par l'acide aminobutyrique suivie de la formation du maléimide par déshydratation et cyclisation de l'acide amique. Le maléimide est ensuite protégé par le diméthylfurane grâce à une réaction de Diels-Alder. Enfin la formation d'un ester activé NHS est effectuée par réaction du N-hydroxysuccinimide sur la fonction acide carboxylique du synthon.

La première étape consiste en une réaction entre l'acide 4-aminobutyrique et l'anhydride maléique dans l'acide acétique. La réaction s'effectue en deux étapes, avec une première étape à température ambiante pour l'ouverture de l'anhydride maléique par la fonction amine de l'acide, puis une seconde étape à reflux pour effectuer la refermeture du maléimide par déshydratation. La réaction est effectuée sur deux lots de 20g (SP-GELLIGHT-11 et SP-GELLIGHT-16). La pureté des produits est obtenue après évaporation totale de l'acide acétique et filtration sur silice et sont respectivement de 95%wt et 97%wt. Les deux synthèses permettent d'obtenir au total 40g d'acide 4-maléimidobutyrique, avec un rendement moyen de 55%.

La fonction maléimide étant fortement réactive, par addition de Michael ou en addition radicalaire (thermique ou UV), il est important de la protéger pour la préserver lors des prochaines étapes de fonctionnalisation ainsi que lors du stockage de la β-CD maléimide. La protection est réalisée par le diméthylfurane à l'aide d'une réaction de Diels-Alder à température ambiante. Il est possible de déprotéger ultérieurement la fonction maléimide grâce à une réaction de rétro Diels-Alder activée thermiquement. La synthèse est effectuée à température ambiante dans le chloroforme. Une première réaction (SP-GELLIGHT-12) sur 23g de composé maléimide est réalisée avec 3.15 équivalents de diméthylfurane. Une quantité de 8g de poudre blanche est obtenue avec une pureté de 92% (rendement de 22%). Il s'agit d'un mélange de composé endo et d'exo (95/5). Lors de la seconde synthèse (SP-GELLIGHT-17), le nombre d'équivalents de diméthylfurane par rapport à l'acide 4-aminobutyrique est diminué en passant de 3.15 à 1.95, dans le but de faciliter la purification et ainsi améliorer le rendement et la pureté finale. Après purification, 23g d'une poudre blanche sont obtenus avec une pureté de 96% (rendement de 53%). Le produit est majoritairement endo (98.5%).

La troisième étape de synthèse consiste à former un ester activé par réaction du N-hydroxysuccinimide sur la fonction acide carboxylique du synthon. Cette réaction permet de générer une fonction réactive pour le greffage sur la β-cyclodextrine-pipérazine. Le groupement NHS est en effet un bon groupement partant, ce qui permettra à la pipérazine de réagir facilement sur l'acide afin de former une fonction amide. La synthèse est effectuée à température ambiante dans le chloroforme en présence d'EDC.HCl. Les conditions expérimentales sont validées sur 7g de réactif dans les conditions décrites précédemment. La réaction permet d'obtenir 7.5g du produit souhaité, sous la forme d'une poudre blanche avec une pureté de 94%, et un rendement de 82%. Le composé final contient majoritairement la forme endo (89%), peu de forme exo (6%) et une fraction de forme déprotégée (5%). Le rapport endo/exo est du même ordre que celui du composé de départ. Effectivement, cette réaction est effectuée sur SP-GELLIGHT-12 qui contient 5% de produit exo. La déprotection, provenant d'une réaction de rétro Diels-Alder, a pu avoir lieu lors de l'évaporation du solvant à l'évaporateur rotatif, malgré une température de bain maintenue à (30°C)[296]. La seconde synthèse, réalisée dans les mêmes conditions que la précédente à partir de 23g de synthon, permet d'obtenir 27.5g d'une poudre blanche avec une pureté de 95% pour un rendement de 89%. Le produit final contient 2% de forme exo, tout comme son précurseur (SP-GELLIGHT-17), ce qui vient confirmer qu'un changement de configuration n'a pas lieu lors de cette réaction. Toutefois la présence de produit déprotégé après purification (8%) est encore observée. Ainsi, il n'est pas possible de s'affranchir de la déprotection d'une partie des fonctions maléimides, qui a lieu partiellement même à basse température (30°C).

Protocole expérimental :

Synthèse de l'acide 4-maléimidobutyrique :

L'anhydride maléique (20.00g, 0.204mol, 1eq) est solubilisé dans 220g d'acide acétique dans un ballon monocol de 1000mL. L'acide 4-aminobutyrique (21.03g, 0.204mol, 1eq) est solubilisé dans 100g d'acide acétique puis additionné au goutte à goutte à l'aide d'une ampoule à addition sur l'anhydride maléique. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation magnétique pendant 3h à température ambiante. Le ballon est équipé d'un réfrigérant puis le milieu réactionnel est porté à reflux à 120°C pendant 18h, en recouvrant le ballon de papier aluminium. L'acide acétique est évaporé à l'évaporateur rotatif puis 300mL d'eau sont ajoutés et le produit est extrait trois fois avec 300mL d'acétate d'éthyle, avant d'être séché sur Na_2SO_4, filtré puis évaporé à nouveau. Enfin 100mL dichlorométhane sont ajoutées afin de filtrer le produit sur un dépôt de silice. Le dépôt est élué avec 1000mL de dichlorométhane puis le filtrat est évaporé pour obtenir 17.6g de poudre blanche.

Synthèse de l'acide 4-maléimidobutyrique protégé diméthylfurane :

L'acide 4-maléimidobutyrique (23.00g, 0.126mol, 1eq) est solubilisé dans 765g de chloroforme dans un ballon monocol de 2000mL. Le 2,5-diméthylfurane (38.03g, 0.396mol, 1.9eq) est additionné dans le milieu réactionnel puis mis sous agitation magnétique à température ambiante pendant trois jours. Le chloroforme est évaporé à l'évaporateur rotatif à 30°C, puis le solide obtenu est trituré avec 60mL d'un mélange dichlorométhane / hexane (1/1 vol), enfin le produit est filtré sur fritté afin d'obtenir une poudre blanche.

Synthèse de l'ester activé-NHS-4-maléimidobutyrique protégé diméthylfurane :

L'acide 4-maléimidobutyrique protégé (22.80g, 0.082mol, 1eq) et le N-Hydroxysuccinimide (9.87g, 0.086mol, 1.05eq) sont solubilisés dans 130g de chloroforme. L'EDC.HCl (16.44g, 0.086mol, 1.05eq) est solubilisé dans 70g de chloroforme et additionnée au goutte à goutte sur le milieu réactionnel sous courant d'argon. Le précipité formé en court de réaction est filtré puis le filtrat est évaporé à l'évaporateur rotatif. Le produit est repris dans 500mL de dichlorométhane puis lavé avec 100mL d'eau, deux fois. La phase organique est séchée sur Na_2SO_4, filtrée puis évaporée jusqu'à obtention d'un volume de 250mL. Le produit est précipité dans 1800mL d'hexane afin d'obtenir une poudre blanche.

<u>Etape 3 : Synthèse de la β-CD-m</u>

La dernière étape de synthèse consiste à greffer le synthon maléimide ester activé sur la β-CD-pipérazine, de façon à obtenir la β-CD-maléimide. La cyclodextrine devra contenir au minimum deux fonctions maléimides nécessaires à la formation de l'hydrogel. Dans un premier temps, le couplage entre la cyclodextrine pipérazine et le synthon maléimide protégé sera réalisé. Dans un second temps, les conditions de déprotection par retro Diels-Alder devront être validées afin de s'assurer qu'elles permettent une régénération efficace des fonctions maléimides sans dégradation de la β-CD.

La réaction d'amidification est réalisée entre les fonctions amines secondaires des groupements pipérazines portées par la β-CD et la fonction ester activé NHS du synthon maléimide. Le couplage entre la β-CD-pipérazine purifiée et un nouveau lot du synthon 4-Maléimidobutyrique ester-NHS (SP-GELLIGHT-29) est effectué sur les 16.5g de β-CD-pipérazine disponibles. La réaction de couplage fonctionne, comme le montre le spectre RMN ^{1}H en Figure 201 sur lequel apparaissent les signaux du maléimide greffé entre 6 et 7 ppm. Le produit obtenu possède une fonctionnalité d'environ 5.6 (3.9 maléimides protégés + 1.7 maléimides déprotégés), ce qui est en accord avec les valeurs du précurseur β-CD-pipérazine (SP-GELLIGHT-23 : fonctionnalité de 5.2). La fonctionnalisation est donc totale. Le rendement de la réaction est de 74% et permet

d'obtenir 23g d'une poudre blanche.

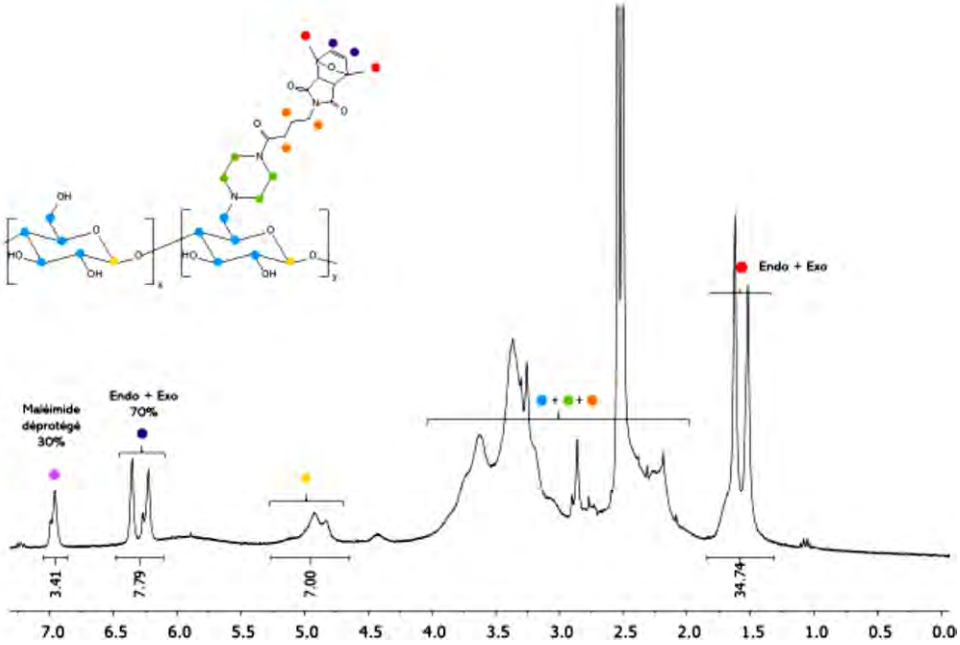


Figure 201: Spectre RMN 1H de la β-CD-m (SP-GELLIGHT-30).

Tout comme lors de la synthèse précédente, un phénomène important de déprotection des fonctions maléimides est observé. Ainsi, la déprotection a lieu malgré l'élimination de l'APTS résiduel dans la β-CD-pipérazine. Sachant que la réaction de *retro* Diels-Alder est activée thermiquement, le fait de chauffer le produit pendant trois jours à 40°C (durée de la réaction d'amidification) peut être à l'origine de ce phénomène. Malgré tout, le taux de greffage est de 100% et la cyclodextrine conserve une fonctionnalité similaire avant et après greffage du synthon maléimide (Tableau 56).

	β-CD-pipérazine	β-CD-maléimide
Manipulation	SP-GELLIGHT-23	SP-GELLIGHT-30
Rendement	48%	74%
Quantité	16.5g	23g
Fonctionnalité	5.2	5.6

Tableau 56: Résultats de la synthèse de la β-CD-m.

Protocole expérimental :

Dans un ballon de 1000mL, l'ester diméthylfurane butyrate NHS (26.02g, 0.070mol, 6.3eq) et la triéthylamine (7.89g, 0.078mol, 7eq) sont solubilisés dans 450g de DMF. Le ballon est placé sous argon dans un bain de glace avant d'ajouter au goutte à goutte la β-CD-pipérazine (SP-GELLIGHT-23 : 16.5g, 0.011mol, 1eq) solubilisé dans 150g de DMF. Le bain de glace est enlevé afin de faire revenir le ballon à température ambiante puis la chauffe est allumée à 40°C

pour le weekend. Le milieu réactionnel est directement précipité dans 2000mL d'un mélange éther/éthanol (80/20vol). Le précipité obtenu est solubilisé dans un minimum de DMSO avec d'être précipité dans les mêmes conditions afin d'obtenir une poudre beige.

Remarque : A chaque étape, le taux de greffage de la β-CD a été total, ce qui a permis de conserver la fonctionnalité fixée lors de la tosylation (Tableau 57). La variation dans les valeurs de fonctionnalités obtenues après chaque étape provient de la marge d'erreur due à l'interprétation du spectre RMN 1H. La disparition des signaux caractéristiques souhaités confirme que le taux de greffage est de 100% à chaque étape de synthèse. La β-cyclodextrine finale obtenue possède une fonctionnalité de 5,6.

	β-CD-OTs	β-CD-pipérazine	β-CD-maléimide
Nom de manipulation	SP-GELLIGHT-21	SP-GELLIGHT-23	SP-GELLIGHT-30
Rendement	92%	48%	74% (Rendement global = 32%)
Quantité	46g	16.5g	23g
Fonctionnalité	4.3	5.2	5.6 (3.9 protégé + 1.7 déprotégé)

Tableau 57: Résultats des propriétés réactionnelle des synhèses de la β-CD-m.