



**HAL**  
open science

# Élaboration d'hydrogels thermosensibles injectables à base d'exopolysaccharides marins pour l'ingénierie tissulaire

Arnaud Fillaudeau

► **To cite this version:**

Arnaud Fillaudeau. Élaboration d'hydrogels thermosensibles injectables à base d'exopolysaccharides marins pour l'ingénierie tissulaire. Matériaux. Nantes Université, 2023. Français. NNT : 2023NANU4041 . tel-04597588

**HAL Id: tel-04597588**

**<https://theses.hal.science/tel-04597588v1>**

Submitted on 3 Jun 2024

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

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

# THESE DE DOCTORAT

NANTES UNIVERSITE

ÉCOLE DOCTORALE N° 642

École doctorale Végétal, Animal, Aliment, Mer, Environnement

Spécialité : Chimie macromoléculaire – Biopolymères et Matériaux Biosourcés

Par

**Arnaud FILLAUDEAU**

## Élaboration d'hydrogels thermosensibles injectables à base d'exopolysaccharides marins pour l'ingénierie tissulaire

Thèse présentée et soutenue à Nantes le 29 novembre 2023

Unités de recherche : Laboratoire EM<sup>3</sup>B, Unité MASAE, Centre Atlantique de l'Ifremer

Laboratoire PMN, Institut des Matériaux Jean Rouxel (IMN), Nantes Université

### Rapporteurs avant soutenance :

Rachel AUZÉLY-VELTY

Professeure des Universités, Université de Grenoble Alpes, CERMAV

Jérôme SOHIER

Chargé de recherche CNRS HDR, Université Claude Bernard Lyon 1, LBTI

### Composition du Jury :

Président :

Jean LE BIDEAU

Professeur des Universités, Nantes Université, IMN

Examineurs :

Catherine BOISSON-VIDAL

Directrice de recherche CNRS, Inserm, Université Paris Descartes

Chrystel LOPIN-BON

Professeure des Universités, Université d'Orléans, ICOA

Dir. de thèse :

Sylvia COLLIEC-JOUAULT

Cadre de recherche HDR, Ifremer

Co-dir. de thèse :

Agata ZYKWINSKA

Cadre de recherche HDR, Ifremer

Stéphane CUENOT

Maître de conférences HDR, Nantes Université, IMN

Invités :

Catherine LEVISAGE

Directrice de recherche, Inserm, Nantes Université, RMeS

Yvette TRAN

Maître de conférences HDR, Sorbonne Université, ESPCI







# THESE DE DOCTORAT

NANTES UNIVERSITE

ÉCOLE DOCTORALE N° 642

École doctorale Végétal, Animal, Aliment, Mer, Environnement

Spécialité : Chimie macromoléculaire – Biopolymères et Matériaux Biosourcés

Par

**Arnaud FILLAUDEAU**

## Élaboration d'hydrogels thermosensibles injectables à base d'exopolysaccharides marins pour l'ingénierie tissulaire

Thèse présentée et soutenue à Nantes le 29 novembre 2023

Unité de recherche : Laboratoire EM<sup>3</sup>B, Unité MASAE, Centre Atlantique de l'Ifremer

Laboratoire PMN, Institut des Matériaux Jean Rouxel (IMN), Nantes Université

### Rapporteurs avant soutenance :

Rachel AUZÉLY-VELTY

Professeure des Universités, Université de Grenoble Alpes, CERMAV

Jérôme SOHIER

Chargé de recherche CNRS HDR, Université Claude Bernard Lyon 1, LBTI

### Composition du Jury :

Président :

Jean LE BIDEAU

Professeur des Universités, Nantes Université, IMN

Examineurs :

Catherine BOISSON-VIDAL

Directrice de recherche CNRS, Inserm, Université Paris Descartes

Christel LOPIN-BON

Professeure des Universités, Université d'Orléans, ICOA

Dir. de thèse :

Sylvia COLLIEC-JOUAULT

Cadre de recherche HDR, Ifremer

Co-dir. de thèse :

Agata ZYKWINSKA

Cadre de recherche HDR, Ifremer

Stéphane CUENOT

Maître de conférences HDR, Nantes Université, IMN

Invités :

Catherine LEVISAGE

Directrice de recherche, Inserm, Nantes Université, RMeS

Yvette TRAN

Maître de conférences HDR, Sorbonne Université, ESPCI



# Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier la Pr. Rachel Auzély-Velty ainsi que le Dr. Jérôme Sohier pour votre évaluation de ce travail de thèse. Je souhaite également exprimer ma reconnaissance envers la Dr. Catherine Boisson-Vidal, la Pr. Chrystel Lopin-Bon, le Pr. Jean Le Bideau, la Dr. Catherine Levisage et la Dr. Yvette Tran, pour avoir accepté de participer à ce jury. Je remercie une nouvelle fois la Dr. Yvette Tran ainsi que le Pr. Pierre Weiss pour leur écoute et leurs conseils lors des réunions annuelles du comité de suivi individuel.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers Marie Hennetier (plateforme TFFFC), Corinne Siquin (Ifremer), le Dr. Serge Perez (CERMAV), la Dr. Olga Makshakova (Institut de Biochimie et Biophysique de Kazan), le Dr. Emiliano Bedini ainsi que la Dr. Serena Traboni (Université de Naples Federico II) pour votre précieuse contribution à ce projet ainsi qu'à la rédaction de mon premier article scientifique. Merci également à Nicolas Stephant pour les images obtenues en microscopie électronique à balayage. Merci à la Dr. Marion Desdouts pour m'avoir fait découvrir ce monde inconnu qu'était pour moi la culture cellulaire. Merci également aux collègues du LSEM qui m'ont accueilli dans leurs locaux pour ces manipulations !

Après trois années, et dans mon cas bien plus, j'adresse mes plus sincères remerciements à ma directrice de thèse, la Dr. Sylvia Collic-Jouault (Trugarez Sylvia !), ainsi qu'à mes co-directeurs, la Dr. Agata Zykwincka et le Dr. Stéphane Cuenot, pour votre expertise, vos précieux conseils, votre implication, votre soutien de tous les jours. Travailler à vos côtés sur ce sujet passionnant fut pour moi un véritable plaisir. Encore une fois merci pour tout !

Sabrina, tu as été et tu resteras ma première stagiaire dont je suis, je l'avoue, particulièrement satisfait. J'ai apprécié ta rigueur et ta bonne humeur et j'espère être amené à collaborer de nouveau avec toi à l'avenir !

A mes chères et chers collègues d'EM<sup>3</sup>B, quelques mots ne pourront suffire à exprimer toute l'affection que je vous porte. Le temps passe si vite ! Je ne connais pas la moitié d'entre vous aussi bien que je le voudrais, néanmoins j'ai apprécié tous les moments passés à vos côtés et garderai précieusement en mémoire nos soirées extra-labo ! Je ne me risquerai pas à citer tous vos prénoms, par peur d'en oublier, mais j'embrasse chacune et chacun d'entre vous et

exprime tout particulièrement à Véronique et Nathalie, un profond remerciement pour nos discussions quotidiennes et notre relation particulière. A toutes et tous je vous dis à bientôt, avec un gâteau c'est promis ! Votre père Fouras, votre boule noire, votre tonnerre, votre lapin et bien entendu votre fidèle Lutin, toujours à votre service !

Bien entendu, un très grand merci à ma famille : mes grands-parents, mes frères, ma sœur, mes oncles et tantes, mes cousins et cousines (Adeline ;) ) et très probablement le reste de mon arbre généalogique... mais tout particulièrement mes parents pour leur présence et leur soutien depuis toujours ! Je vous aime fort ! Merci à ma sœur pour la relecture de ce manuscrit, qui a gentilleusement accepté d'endosser la responsabilité de toutes les fautes d'orthographe restantes (je plaisante) !

Théo, tomoyo, anata o waki ni oite okanakereba narimasen! Kangaete mireba, subete wa ofisu kara hajimari, mōsugu Nihon e ryokō ni iku koto ni narimasuga, jinsei ni wa umaku iku koto mo arimasu. Izure ni seyo, burutānyu no okuchi kara Monperie o keiyu shite (naze Reunion-jimade wa nai nodeshou?), Toho demo, rōrāburēdo demo, doko ni iku koto ni kimete mo, itsu demo watashi o tayori ni shite kudasai. Anata wa watashi ga shitte iru saikō no Temtem torēnādeari, naniyori mo watashi no shin'yūdesu, keshite kawaranaide kudasai!

Enfin, je ne pouvais terminer ces remerciements par quelqu'un d'autre que toi Fanny. La thèse sans toi ... je ne peux même pas l'imaginer. On a partagé tant de bons moments, des instants de doutes également. Tu as été ma confidente, mon soutien de tous les instants en particulier en ce qui concerne l'informatique et ma révulsion de l'administratif ! Ta présence tout au long de ce parcours universitaire était inestimable et le sera davantage pour le reste de ma vie. Tu es une merveilleuse amie, pas seulement pour les fabuleux mojitos dont tu as le secret, mais surtout pour la personne que tu es. Toi non plus ne change jamais !

# Avant-propos

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de deux laboratoires :

- Le laboratoire Ecosystèmes Microbiens et Molécules Marines pour les Biotechnologies (EM<sup>3</sup>B) de l'unité MASAE, au Centre Atlantique de l'Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer (Ifremer), Nantes.
- Le laboratoire Physique des Matériaux et Nanostructures (PMN), de l'Institut des Matériaux Jean Rouxel (IMN), Nantes.

En collaboration avec :

- La Plateforme Toulouse Field-Flow Fractionation Center (TFFFC), École d'Ingénieur de Purpan, Toulouse.
- Le Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales (CERMAV), Grenoble.
- L'Institut de Biochimie et Biophysique de Kazan, Russie.
- L'Université de Naples Federico II, Italie.

À ce jour, ce travail de thèse a donné lieu à l'écriture de deux articles en tant qu'auteur principal destinés à un journal international à comité de lecture :

- **Fillaudeau, A.**, Cuenot, S., Makshakova, O., Traboni, S., Siquin, C., Hennetier, M., Bedini, E., Perez, S., Collic-Jouault, S., & Zykwinska, A., 2024. Glycosaminoglycan-mimetic infernan grafted with poly(N-isopropylacrylamide): toward a thermosensitive polysaccharide. *Carbohydrate Polymers*, 326, 121638.
- **Fillaudeau, A.**, Desdouits, M., Siquin, C., Collic-Jouault, C., Zykwinska, A., & Cuenot, S. Mechanical and biological properties of thermosensible hydrogels based on infernan, a marine bacterial exopolysaccharide (en préparation).

Je suis également co-auteur d'un article scientifique portant sur la sulfatation assistée par micro-ondes de l'exopolysaccharide infernane :

- Collic-Jouault, S., Esposito, F., Ledru, H., Siquin, C., Marchand, L., **Fillaudeau, A.**, Routier, S., Buron, F., Lopin-Bon, C., Cuenot, S., Bedini, E., Zykwinska, A., 2023. Glycosaminoglycan Mimetics Obtained by Microwave-Assisted Sulfation of Marine Bacterium Sourced Infernan Exopolysaccharide. *Biomacromolecules*, 24, 1, 462-470. IF

6.2. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.2c01277>.

Les résultats de ce travail de thèse ont été communiqués lors des journées des doctorants (à l'IMN : présentation orale en anglais, 2022 ; à l'Ifremer : présentation orale en français, 2020) et lors de la participation à des congrès internationaux :

- **Fillaudeau, A.**, Zykwinska, A., Siquin, C., Marchand, L., Cuenot, S., Collic-Jouault, S. Elaboration of injectable thermosensitive hydrogels based on marine exopolysaccharides for tissue engineering. EPNOE, 7<sup>th</sup> International Polysaccharide Conference, 11-15 octobre 2021, Nantes, France (Poster).
- **Fillaudeau, A.**, Zykwinska, A., Siquin, C., Cuenot, S., Collic-Jouault, S. Elaboration of Injectable Thermosensitive Hydrogels Based on Infernan: a Marine Glycosaminoglycan-Mimetic Exopolysaccharide for Tissue Engineering. ESB, 32<sup>th</sup> annual conference, 4-8 septembre 2022, Bordeaux, France (Poster).

Enfin, j'ai également encadré le stage de Sabrina Guinio réalisé dans le cadre de sa formation de Master 1 Chimie-Biologie (Nantes Université, 5 mois, 2023), sur un sujet complémentaire à celui de mon travail de thèse intitulé : « Elaboration d'hydrogels thermosensibles et injectables à base d'exopolysaccharides (EPS) marins : impact de la masse molaire de l'EPS sur les propriétés thermosensibles ».

# Table des matières

---

Liste des figures .....	
Liste des tableaux .....	
Liste des abréviations .....	
Introduction générale .....	
<b>Chapitre I : Etude bibliographique .....</b>	<b>5</b>
<b>1. Le cartilage articulaire .....</b>	<b>7</b>
1.1. Généralités sur l'articulation synoviale .....	7
1.2. Fonction du cartilage articulaire.....	8
1.3. Composition du cartilage articulaire .....	8
1.3.1. Les chondrocytes.....	9
1.3.2. Le collagène .....	9
1.3.3. Les glycosaminoglycanes (GAG) et protéoglycanes.....	10
1.4. Structure du cartilage articulaire.....	13
1.5. Homéostasie tissulaire mécano-dépendante.....	14
1.6. Altération du cartilage .....	16
<b>2. Régénération du cartilage .....</b>	<b>17</b>
2.1. Les stratégies actuelles.....	17
2.1.1. Les traitements palliatifs .....	17
2.1.2. Les traitements curatifs.....	17
2.1.3. La médecine régénératrice : le concept de l'ingénierie tissulaire .....	19
<b>3. Les hydrogels .....</b>	<b>22</b>
3.1. Nature du réseau .....	22
3.2. Nature des constituants du réseau .....	23
3.2.1. Polymères synthétiques .....	23
3.2.2. Polymères naturels : cas des polysaccharides .....	24
3.3. Propriétés mécaniques des hydrogels.....	33
<b>4. Hydrogels injectables : cas des hydrogels thermosensibles .....</b>	<b>34</b>
4.1. Polymères thermosensibles .....	36
4.1.1. Polymères thermosensibles d'origine naturelle .....	36
4.1.2. Polymères thermosensibles d'origine synthétique.....	37
4.2. Le poly(N-isopropylacrylamide), pNIPAM .....	41

4.2.1.	Généralités .....	41
4.2.2.	Application des hydrogels à base de pNIPAM .....	45
4.2.3.	Les associations polysaccharide/pNIPAM .....	47
<b>Chapitre II : Conception &amp; Caractérisation d'un EPS thermosensible .....</b>		<b>57</b>
<b>1.</b>	<b>Introduction.....</b>	<b>59</b>
1.1.	Essais préliminaires de greffage de l'EPS par le pNIPAM.....	60
1.1.1.	Stratégie 1 : greffage des acides carboxyliques de l'EPS par un pNIPAM-NH <sub>2</sub> ..	60
1.1.2.	Stratégie 2 : greffage des acides carboxyliques de l'EPS par un pNIPAM-COOH médié par un linker ADH.....	61
1.1.3.	Modification de la stratégie 1 .....	63
<b>2.</b>	<b>Matériels et méthodes .....</b>	<b>67</b>
2.1.	Production de l'infernane natif par fermentation d' <i>Alteromonas infernus</i> et caractérisation physico-chimique.....	67
2.2.	Greffage de pNIPAM-NH <sub>2</sub> sur l'infernane natif par la chimie des carbodiimides .....	67
2.3.	Caractérisation moléculaire des polymères greffés EPS-pNIPAM .....	69
2.3.1.	Simulations de dynamique moléculaire (DM).....	69
2.3.2.	Frit Inlet-Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation couplé à des détecteurs de diffusion de la lumière multi-angle et d'indice de réfraction (FI-AF4-MALS-dRI) .....	71
2.3.3.	Dosages spectroscopiques .....	72
2.3.4.	Réflexion totale atténuée - Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (ATR-FTIR) .....	74
2.3.5.	Résonance magnétique nucléaire (RMN) .....	74
2.4.	Détermination des propriétés thermosensibles des polymères greffés EPS-pNIPAM . .....	75
2.4.1.	Spectroscopie UV-visible .....	75
2.4.2.	Diffusion dynamique de la lumière (DLS).....	75
2.4.3.	Imagerie par microscopie de force atomique (AFM) .....	75
2.5.	Étude des associations inter-chaînes d'EPS-pNIPAM par des simulations de Monte Carlo .....	76
<b>3.</b>	<b>Résultats et discussion .....</b>	<b>79</b>
3.1.	Simulations de dynamique moléculaire (DM) d'infernane greffé avec des chaînes de pNIPAM.....	79
3.2.	Caractérisation physico-chimique des polymères EPS-pNIPAM greffés.....	82
3.2.1.	Greffage d'infernane, masse molaire moyenne et conformation par FI-AF4- MALS-dRI.....	84

3.2.2.	Estimation de la présence de pNIPAM libre par dosages spectroscopiques.....	94
3.2.3.	Analyse du greffage par réflexion totale atténuée - Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (ATR-FTIR).....	98
3.2.4.	Analyse du greffage par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) .....	100
3.3.	Caractérisation des propriétés thermosensibles de l'infernane greffé. ....	104
3.3.1.	Détermination de la LCST dans des solutions semi-diluées d'infernane greffé ....	104
3.3.2.	Étude de la morphologie de la chaîne d'infernane greffée par microscopie de force atomique (AFM).....	109
3.4.	Formation d'un réseau connecté de chaînes d'EPS-pNIPAM par des simulations de Monte Carlo.....	113
<b>4.</b>	<b>Conclusion .....</b>	<b>117</b>
<b>Chapitre III : Caractérisation &amp; Cytocompatibilité des hydrogels d'EPS-pNIPAM.....</b>		<b>121</b>
<b>1.</b>	<b>Introduction.....</b>	<b>123</b>
<b>2.</b>	<b>Matériels et méthodes .....</b>	<b>125</b>
2.1.	Test de gélification et stabilité des hydrogels d'EPS greffés en condition de test <i>in vitro</i> .....	125
2.2.	Estimation de la cinétique de transition sol/gel des EPS greffés .....	125
2.3.	Mesure du gonflement des hydrogels d'EPS greffés en condition de test <i>in vitro</i> .	126
2.4.	Détermination de la structure des hydrogels d'EPS-pNIPAM par microscopie électronique à balayage (MEB).....	127
2.5.	Mesure des propriétés mécaniques des hydrogels d'EPS greffés par AFM en condition de test <i>in vitro</i> .....	127
2.6.	Evaluation de la cytocompatibilité des hydrogels d'EPS-greffés .....	129
2.6.1.	Tests de désinfection/stérilisation des hydrogels d'EPS greffés.....	129
2.6.2.	Culture cellulaire adhérente : HEK293 .....	132
2.6.3.	Ensemencement cellulaire et mesure de la viabilité .....	133
<b>3.</b>	<b>Résultats et discussion .....</b>	<b>139</b>
3.1.	Estimation de la cinétique de transition sol/gel des EPS greffés .....	141
3.2.	Mesure du gonflement des hydrogels d'EPS greffés en condition de test <i>in vitro</i> .	143
3.3.	Propriétés mécaniques des hydrogels d'EPS greffés par AFM en condition de test <i>in vitro</i> .....	149
3.3.1.	Micro-rhéologie par microscopie de force atomique .....	149
3.3.2.	Réponses poroélastiques ou viscoélastiques des hydrogels .....	155
3.4.	Evaluation de la cytocompatibilité des hydrogels d'EPS greffés.....	169

3.4.1. Tests de désinfection/stérilisation des hydrogels d'EPS greffés.....	169
3.4.2. Ensemencement de cellules HEK293 dans un hydrogel de Cultrex et mise en place du test de viabilité <i>in vitro</i> .....	180
3.4.3. Ensemencement de cellules HEK293 dans les gels d'EPS-pNIPAM et mesure de la viabilité cellulaire .....	186
<b>4. Conclusion .....</b>	<b>195</b>
<b>Conclusion générale &amp; Perspectives .....</b>	<b>199</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>209</b>
<b>Références.....</b>	<b>215</b>

# Liste des figures

---

Figure 1. A) Localisation anatomique des différents types de cartilage (d'après Krishnan & Grodzinsky, 2018). B) Schéma des constituants d'une articulation synoviale (Mazières et al., 2018).....	7
Figure 2. Schéma de la structure d'un macro-agrégat hyaluronane-protéoglycane (agrécan) (d'après Bajpayee & Grodzinsky, 2017). .....	11
Figure 3. Schéma résumant la structure et la composition du cartilage articulaire (Wei & Dai, 2021).	14
Figure 4. Schéma des acteurs principaux de la matrice péri-cellulaire (PCM) du chondrocyte impliqués dans la mécanotransduction (Xu et al., 2022).....	15
Figure 5. Classification ICRS. Grade 1 : lésions superficielles ; Grade 2 : les lésions atteignent jusqu'à 50 % de la profondeur du cartilage ; Grade 3 : les lésions atteignent plus de 50 % de la profondeur du cartilage, allant jusqu'à l'os ; Grade 4 : les lésions touchent l'os sous chondral (d'après Theses, 2019). .....	16
Figure 6. Chronologie des traitements chirurgicaux du cartilage (d'après Wei & Dai, 2021).....	18
Figure 7. A) Les principaux acteurs de l'ingénierie tissulaire (inspiré de Doblado et al., 2021). B) Proportion des stratégies utilisant des biomatériaux seuls ou associés à des cellules et/ou des morphogènes (d'après Lesage et al., 2022). .....	19
Figure 8. A) Types de cellules utilisées pour la régénération du cartilage ou étendue à la lésion ostéo-chondrale : chondrocytes (Chondro), cellules souches mésenchymateuses (MSC) ou cellules dérivées de MSC de la moelle osseuse (BM), du tissu adipeux (Adip), du sang du cordon ombilical (UCB), des tissus synoviaux (Synov) ou d'autres sources, ainsi que d'autres cellules ou de mélange de cellules. B) Molécules bioactives utilisées pour la régénération du cartilage ou étendue à la lésion ostéo-chondrale : le plasma riche en plaquettes (PRP), fibrine riche en plaquettes (PRF), TGF- $\beta$ 1, BMP-2,-4,-7, IGF-1, membre de la famille des Wnt (Wnt5a), mélange de facteurs de croissance ou d'autres types de molécules bioactives (d'après Lesage et al., 2022). .....	20
Figure 9. Caractéristiques recherchées pour développer une matrice 3D en ingénierie tissulaire (inspiré de Chauhan et al., 2022). .....	21
Figure 10. A) Liaisons covalentes dynamiques réversibles. B) Liaisons physiques (d'après Xiao et al., 2022).....	23
Figure 11. A) Photographie du sous-marin Nautille. B) Repère cartographique de la région du bassin des Guaymas. C) Photographie prise lors de la campagne océanographique Guaynaut de <i>Riftia pachyptila</i> à proximité de suintements hydrothermaux profonds. D) Unité répétitive d'inferrane : nonasaccharide monosulfate (R = Glc) ou octasaccharide disulfate (R = SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> Na <sup>+</sup> ) (Roger et al., 2004 ; Collic-Jouault et al., 2023). E) Modélisation de la structure hélicoïdale d'inferrane (Makshakova et al., 2022). .....	30
Figure 12. Schéma du comportement des matrices élastiques et viscoélastiques sous la contrainte exercée par des cellules confinées (d'après Chaudhuri et al., 2016).....	33

Figure 13. Gélification <i>in situ</i> d'une solution après l'application d'un stimulus de nature physique (température, électrique, lumière, champ magnétique), chimique (pH, redox, ions, molécules) ou enzymatique (inspiré de Strecanska et al., 2022). .....	34
Figure 14. Diagramme de phase montrant les températures UCST (rouge) et LCST (noir) pour un polymère thermosensible (Tenhu & Niskanen, 2016). .....	35
Figure 15. Exemples de polymères thermosensibles A) naturels ou B) après modification chimique. 37	
Figure 16. Exemples de dérivés des poly(éther) thermosensibles : poly(éthylène glycol) (PEG), Pluronic® F127 et poly(méthylvinyléther) (PMVE). .....	38
Figure 17. Exemples de dérivés des poly(ester) thermosensibles, poly(N-vinylcaprolactame) (PNVCL) et acide poly(ε-caprolactone-co-lactique)-poly(éthylène glycol)-acide poly(ε-caprolactone-co-lactique) (PCLA-PEG-PCLA). .....	39
Figure 18. Structure du peptide thermosensible glycine-valine-glycine-valine-proline (GVGVP). .....	39
Figure 19. Exemples de dérivés poly(2-oxazoline) thermosensibles : poly(2-éthyl-2-oxazoline) (PEtOx), poly(2-n-propyl-2-oxazoline) (PnPrOx), poly(2-cyclopropyl-2-oxazoline) (PcPrOx), poly(2-isopropyl-2-oxazoline) (PiPrOx) (d'après Hoogenboom & Schlaad, 2017). .....	40
Figure 20. Exemples de dérivés poly(acrylamide N-substitué) : poly(N,N-diméthylacrylamide) (pDMAM), poly(N-éthylacrylamide) (pEAM), poly(N,N-éthylméthacrylamide) (pEMAM), poly(N-isopropylacrylamide) (pNIPAM), poly(N,N-diéthylacrylamide) (pDEAM), poly(N-n-propylacrylamide) (pnPAM), poly(N-n-butylacrylamide) (pnBAM) (d'après Zhang et al., 2019). .....	41
Figure 21. Structure de référence du pNIPAM et exemples de dérivés fonctionnalisés (D'après Sigma-Aldrich et Polymer Source). .....	42
Figure 22. A) Détails des composantes hydrophiles (rouge) et hydrophobes (bleu) du pNIPAM (d'après Lanzalaco & Armelin, 2017). B) Interaction en solution du pNIPAM en fonction de la température (d'après T.-Y Wu et al., 2018). C) Transition moléculaire du pNIPAM au-dessus de la LCST (d'après Tavagnacco et al., 2018). .....	43
Figure 23. A) Série de Hofmeister. B) Impact de la série de Hofmeister sur la LCST du pNIPAM (d'après Zhang et al., 2005). .....	44
Figure 24. Nombre de publications traitant du pNIPAM de 1968 à 2017. L'utilisation du pNIPAM dans le domaine biomédical en 2017 est détaillée (d'après Lanzalaco & Armelin, 2017). .....	45
Figure 25. Représentation schématique des produits obtenus <i>via</i> la chimie des carbodiimides. (1) Activation du carboxyle et formation du dérivé O-acylisourée. (2) Réaction d'une amine primaire sur le dérivé O-acylisourée pour conduire à l'amide. (3) Réaction du carboxyle sur le dérivé O-acylisourée puis attaque d'une amine primaire pour conduire à l'amide. (4) Réaction d'un hydroxyle sur le dérivé O-acylisourée puis attaque d'une amine primaire pour conduire à l'amide. (5) Hydrolyse du composé O-acylisourée. (6) Réarrangement N→O conduisant au N-acylurée. .....	48
Figure 26. Mécanisme réactionnel conduisant à la formation d'un amide à partir du dérivé O-acylisourée en présence de N-hydroxysuccinimide (NHS). .....	49

Figure 27. Photographie de l'EPS infernane lyophilisé et structure de l'unité répétitive octasaccharidique disulfate d'infernane (avec $R = SO_3^- Na^+$ ). Les fonctions carboxyliques ciblées pour le greffage par le pNIPAM sont entourées en bleu.....	59
Figure 28. Réaction de greffage EPS/pNIPAM-NH <sub>2</sub> par la chimie des carbodiimides (EDC) en présence de NHS.....	60
Figure 29. Réaction de greffage EPS/pNIPAM-COOH par la chimie des carbodiimides (EDC) en présence de NHS. A) Première étape permettant le greffage d'une extrémité ADH sur l'EPS. B) Deuxième étape permettant le greffage du pNIPAM-COOH sur l'extrémité ADH restante de l'EPS-ADH. ....	62
Figure 30. Masse finale obtenue après réaction du dérivé infernane 265 000 g/mol (EPS <sub>265</sub> ) et de l'EPS natif 1 100 000 g/mol (EPS <sub>1100</sub> ) avec le pNIPAM-NH <sub>2</sub> (5 500 g/mol) par la chimie des carbodiimides (EDC) en présence de NHS ajoutés en une ou quatre fois (tous les 24 h) selon un ratio molaire COOH:EDC:NHS de 1:1:1 ou 1:10:10. ....	64
Figure 31. Schéma des différentes étapes permettant le greffage de l'EPS par le pNIPAM-NH <sub>2</sub> .....	68
Figure 32. Représentation schématique des systèmes moléculaires d'infernane greffé construits pour les simulations de dynamique moléculaire. A) Squelette infernane ramifié partiellement greffé à l'un des deux acides glucuroniques (GlcA) de la chaîne latérale (trois chaînes de pNIPAM pour neuf AU) et B) squelette infernane ramifié entièrement greffé aux trois résidus AU par unité répétitive (neuf chaînes de pNIPAM pour neuf AU). ....	69
Figure 33. A) Charges partielles dérivées du champ de force AMBER. Les charges atomiques partielles ont été dérivées des calculs de mécanique quantique au niveau B3LYP/6-31* en utilisant la méthode du potentiel électrostatique restreint (RESP), puisque les charges RESP sont fortement connectées au champ de force AMBER (Cornell et al., 1995) et au champ de force GLYCAM (Kirschner et al., 2008). Les paramètres d'interactions-liées pour le groupe amide formé à l'interface des deux champs de force utilisés (GLYCAM06j pour les AU et GAFF pour le linker) ont été tirés du champ de force Amber14SB. B) Schéma de l'infernane greffé par du pNIPAM sur un résidu latéral GlcA. Les charges partielles sont données en A).....	70
Figure 34. Principe du dosage à la fluorescamine pour la quantification du pNIPAM-NH <sub>2</sub> libre.....	72
Figure 35. Principe du dosage au TNBS pour la quantification du pNIPAM-NH <sub>2</sub> libre.....	73
Figure 36. Simulations de dynamique moléculaire. A) Unité octasaccharidique disulfate d'infernane natif ( $R = SO_3^- Na^+$ ) (Akoumany et al., 2019; Collic-Jouault et al., 2023), (B) quatre unités répétitives d'octasaccharide d'infernane montrant un squelette linéaire ramifié à GalA2S avec trois chaînes latérales, (C, C') infernane ramifié entièrement greffé à trois résidus AU par unité répétitive, conduisant à neuf chaînes de pNIPAM greffées pour neuf AU (100 %) et (D, D') infernane ramifié partiellement greffé à l'un des GlcA de la chaîne latérale par unité répétitive, soit trois chaînes de pNIPAM greffées pour neuf AU (33 %). ....	80
Figure 37. La distance de bout en bout du squelette dans 0) infernane (système 0, Tableau IX) A) infernane partiellement greffé aux GlcA latéraux (système A, Tableau IX) B) infernane totalement greffé à GalA2S et aux GlcA (système B, Tableau IX). ....	81
Figure 38. Représentation schématique du système FI-AF4 (Ramirez et al., 2021). ....	84

Figure 39. Fractogrammes FI-AF4-MALS-dRI de l'EPS et du pNIPAM p5 (1 mg/mL).....	86
Figure 40. Fractogrammes FI-AF4-MALS-dRI des EPS-p5 et des EPS-p20 (1 mg/mL en EPS). L'EPS-p5-0% présente une composition massique en EPS et pNIPAM identique à l'EPS-p5-2% mais sans greffage covalent du pNIPAM (Tableau VIII). .....	86
Figure 41. Coefficients hydrodynamiques $\nu$ calculés à partir de la pente du tracé log-log du rayon de giration ( $R_g$ ) en fonction de la masse molaire moyenne en poids ( $M_w$ ) obtenus en FI-AF4-MALS-dRI pour A) les EPS-p5 et B) les EPS-p20 (à 1 mg/ml en EPS). .....	90
Figure 42. Composition des produits finaux issus du greffage EPS/p5 et EPS/p20. L'EPS-p5-0% est une association non covalente entre l'EPS et le pNIPAM. ....	93
Figure 43. Composition détaillée des polymères greffés, EPS-pNIPAM, en EPS et pNIPAM greffé. Le schéma représente la densité de greffage (Tableau XI) d'une chaîne d'EPS simplifiée modélisée par 100 acides uroniques successifs (en bleu) greffés par x chaînes de pNIPAM (en rouge) .....	93
Figure 44. Spectres ATR-FTIR d'échantillons A) d'EPS-p5 et B) d'EPS-p20.....	99
Figure 45. Spectres RMN- $^1\text{H}$ ( $\text{D}_2\text{O}$ , 600 MHz, 40 °C) du p5 (noir), de l'EPS (violet), de l'EPS-p5-0% (rouge) et de l'EPS-p5-2% (bleu). Les signaux marqués d'un astérisque sont liés à des contaminants de faible masse molaire, comme le démontre leur absence dans les spectres RMN- $^1\text{H}$ diffusionnelle (DOSY, voir Figure S1). .....	101
Figure 46. Structure chimique du pNIPAM et de l'EPS greffé. Région agrandie des spectres RMN- $^1\text{H}$ et $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ -DEPT-HSQC (600 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ , 40 °C) des échantillons p5 (noir), EPS-p5-0% (rouge) et EPS-p5-2% (bleu) (groupements $\text{CH}_2$ en noir, rouge et bleu, groupements $\text{CH}$ et $\text{CH}_3$ en gris, orange et bleu clair dans les spectres DEPT-HSQC de p5, EPS-p5-0% et EPS-p5-2%, respectivement). Les signaux marqués d'un astérisque sont liés à des contaminants de faible masse molaire, comme en témoigne leur absence dans les spectres RMN- $^1\text{H}$ diffusionnelle (DOSY, voir Figure S1). Les flèches relient les signaux liés aux protons sur les atomes de carbones adjacents, comme le révèlent les spectres COSY (voir Figures S2-S4). Les spectres RMN complets $^1\text{H}$ et $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ -DEPT-HSQC sont présentés sur les Figures S5-S7. ....	102
Figure 47. Évolution de l'absorbance avec la température pour des solutions semi-diluées (1 mg/mL, PBS, pH 7,4) A) de p5 et d'EPS-p5, et B) de p20 et d'EPS-p20. Des photographies illustrent l'évolution de la turbidité de la solution de p5 avec la température.....	105
Figure 48. Taille des particules des solutions semi-diluées (1 mg/mL, PBS, pH 7,4) en dessous (25 °C) et au-dessus (38 °C) de la LCST. A) EPS et p5 à 25 °C et 38 °C, B) EPS et p20 à 25 °C et 38 °C, C) EPS-p5 à 25 °C, D) EPS-p5 à 38 °C, E) EPS-p20 à 25 °C et F) EPS-p20 à 38 °C. Voir Tableau XIII pour plus de détails. ....	106
Figure 49. Représentation schématique de l'évolution conformationnelle d'une chaîne isolée d'EPS-pNIPAM hypothétique en dessous et au-dessus de sa LCST médiée par les interactions intramoléculaires entre les chaînes de pNIPAM greffées. Les interactions intermoléculaires ne sont pas représentées mais participent néanmoins au changement conformationnel.....	107
Figure 50. A) Images de hauteurs AFM (2 $\mu\text{m}$ x 2 $\mu\text{m}$ ou 10 $\mu\text{m}$ x 10 $\mu\text{m}$ ) obtenues en contact intermittent dans l'air et B) distribution de hauteurs de l'EPS, du p5 et du p20 à 20 °C et 37 °C. ....	110

Figure 51. A) Images de hauteurs AFM (2  $\mu\text{m}$  x 2  $\mu\text{m}$ ) obtenues en contact intermittent dans l'air et B) distribution de hauteurs d'EPS-p5-16%, d'EPS-p5-8%, d'EPS-p20-3% et d'EPS-p20-1% à 20 °C et 37 °C. Pour l'EPS-p20-1%, les flèches bleues indiquent la présence d'assemblages nanométriques de chaînes de pNIPAM greffées tandis que les flèches rouges indiquent la présence supposée de nanoparticules de pNIPAM libre associées au pNIPAM greffé sur la chaîne de polysaccharide. .... 111

Figure 52. Représentation schématique issue de Guo et al. (2015) des assemblages micellaires de pNIPAM greffés indiqués par des flèches bleues dans l'échantillon d'EPS-p20-1%. Les flèches rouges indiquent la présence supposée de nanoparticules de pNIPAM libre associées aux micelles de pNIPAM greffés sur la chaîne de polysaccharide. .... 112

Figure 53. A) Résultats de la simulation de Monte Carlo sur un réseau carré de 2  $\mu\text{m}$  montrant la formation progressive de clusters à partir de chaînes d'EPS-pNIPAM connectées pour différentes probabilités d'occupation de 3,1 %, 6,2 % et 8 %. Les mêmes simulations montrant des chaînes d'EPS en bleu et de pNIPAM repliées en rouge ont été présentées en dessous (pour une meilleure visualisation, la largeur de ligne a été multipliée par cinq). B) Courbes de probabilité de percolation en fonction de la probabilité d'occupation pour différentes tailles du réseau carré. C) Courbe maîtresse de la probabilité de percolation en fonction de la probabilité d'occupation normalisée. .... 114

Figure 54. Résultats de la simulation de Monte Carlo montrant la formation progressive de clusters à partir de chaînes d'EPS-pNIPAM connectées, A) sur un réseau carré de 5  $\mu\text{m}$  pour différentes probabilités d'occupation de 5,0 %, 7,5 % et 7,6 % (de gauche à droite), et B) sur un réseau carré de 10  $\mu\text{m}$  pour différentes probabilités d'occupation de 3,8 %, 5,6 % et 8,3 % (de gauche à droite). Les mêmes simulations montrant les chaînes d'EPS en bleu et de pNIPAM repliées en rouge ont été présentées en dessous (pour une meilleure visualisation, la largeur de la ligne a été multipliée par cinq par rapport à la représentation du-dessus). .... 115

Figure 55. A) Photographie d'un microscope inversé surmonté d'un système AFM Nanowizard® (JPK, Allemagne). B) Photographie d'un hydrogel d'EPS-p5-8% préparé pour la mesure par AFM (30  $\mu\text{L}$ , 10 % m/v PBS, gélifié 30 min à 37 °C et recouvert par du milieu DMEM). .... 128

Figure 56. Photographie du montage de désinfection par UV-C des solutions d'EPS à une distance D de la lampe. Ici D = 5 cm. .... 130

Figure 57. A) Aspect du milieu de culture recouvrant le Cultrex (30  $\mu\text{L}$ ) contenant les cellules HEK293 avant test AlamarBlue. B) Test AlamarBlue (20 % v/v DMEM, 5h). C) Aspect du Cultrex contenant les cellules HEK293 après prélèvement du surnageant. .... 135

Figure 58. Schéma général du protocole permettant la mesure de la viabilité de cellules HEK293 ensemencées dans les hydrogels d'EPS-pNIPAM par le réactif AlamarBlue® (G-Biosciences) 3 jours (J3) et 7 jours (J7) après leur ensemencement. .... 137

Figure 59. Aspect des solutions d'EPS greffés à température ambiante. A) De gauche à droite : EPS-p5-16%, EPS-p5-8% (10 % m/v PBS), EPS-p5-3% et EPS-p5-2% (7 % m/v PBS), B) de gauche à droite : EPS-p20-6%, EPS-p20-3%, EPS-p20-1% et EPS-p20-0,2% (10 % m/v PBS). La concentration en EPS (% m/v) est indiquée sur les photographies. .... 139

Figure 60. Test de gélification des EPS greffés en condition de culture cellulaire. J0-A) 30  $\mu\text{L}$  d'EPS-p20, d'EPS-p5-16%/8%, de p5, de p20 à 10 % m/v PBS et 30  $\mu\text{L}$  d'EPS-p5-3%/2%/0% à 7 % m/v PBS ont été

déposés. J0-B) Les solutions ont été placées en incubateur 37 °C (5 % CO <sub>2</sub> , humidité contrôlée) pendant 1 h. J0-C) 1 mL de milieu DMEM thermostaté à 39 °C a été déposé. J3/J7) Les hydrogels ont été photographiés 3 jours et 7 jours après gélification.....	140
Figure 61. Suivi de l'absorbance des solutions A) de p5/d'EPS-p5 (EPS-p5-16%/8% à 10 % m/v PBS et EPS-p5-3%/2% à 7 % m/v PBS) et B) de p20/d'EPS-p20 (10 % m/v PBS) à 37 °C au cours du temps..	142
Figure 62. Évolution du taux de gonflement au cours du temps des hydrogels A) d'EPS-p5 (10 % m/v PBS pour les EPS-p5-16%/8% et 7 % m/v PBS pour les EPS-p5-3%/2%) et B) d'EPS-p20 (10 % m/v PBS) en milieu DMEM.....	144
Figure 63. Représentation schématique de la structure hypothétique de 3 hydrogels d'EPS-p5 prenant en compte la densité de greffage et le taux d'EPS respectifs. La réticulation du réseau s'établit par les interactions inter-chaînes entre les chaînes de pNIPAM greffées. L'hydrogel le plus greffé (EPS-p5-16%) gonfle peu contrairement aux 2 autres (le gonflement est possible par l'écartement des chaînes menant à la rupture de liaisons physiques, comme discuté dans cette section). Les chaînes d'EPS sont de couleur bleue et les chaînes de pNIPAM sont de couleur rouge. ....	145
Figure 64. Photographies illustrant le gonflement au cours du temps des hydrogels d'EPS-p5 (100 µL, 10 % m/v PBS pour les EPS-p5-16%/8% et 7 % m/v PBS pour les EPS p5-3%/2%) recouverts de milieu DMEM à 37 °C (5 % CO <sub>2</sub> , humidité contrôlée). En bleu est précisé le taux d'EPS au sein de l'hydrogel. ....	147
Figure 65. Photographies illustrant le gonflement au cours du temps des hydrogels d'EPS-p20 (100 µL, 10 % m/v PBS) recouverts de milieu DMEM à 37 °C (5 % CO <sub>2</sub> , humidité contrôlée). En bleu est précisé le taux d'EPS au sein de l'hydrogel.....	148
Figure 66. Procédure AFM pour enregistrer une courbe de relaxation de force : A) (1) dans la partie approche, la pointe initialement au-dessus de la surface de l'échantillon indente l'échantillon jusqu'à atteindre une profondeur prédéfinie $\delta_0$ , B) (2) dans la phase de maintien, la décroissance de la force est mesurée en fonction du temps (ici 5 s) tandis que l'indentation est maintenue constante, (3) la pointe est finalement rétractée de l'échantillon pour revenir à sa position initiale (partie retrait). Illustration A) issue de Cuenot et al. (2022).....	150
Figure 67. A) Courbe de relaxation de force pour une indentation constante de 950 nm mesurée sur l'EPS-p5-8% (10 % m/v PBS). B) Module de relaxation de cisaillement, $G(t)$ , mesuré pour l'EPS-p5-8% (10 % m/v PBS). ....	151
Figure 68. Modules de stockage $G'(\omega)$ et de perte $G''(\omega)$ mesurés sur les différents hydrogels d'EPS-p5 (10 % m/v PBS sauf l'EPS-p5-3%, 7 % m/v PBS) en fonction des fréquences angulaires comprises entre 0,3 Hz et 200 Hz.....	153
Figure 69. Modules de stockage $G'(\omega)$ et de perte $G''(\omega)$ mesurés sur les différents hydrogels d'EPS-p20 (10 % m/v PBS) en fonction des fréquences angulaires comprises entre 0,3 Hz et 200 Hz.....	153
Figure 70. Courbes force-indentation mesurées sur les hydrogels d'EPS-p5-3% (7 % m/v PBS), d'EPS-p5-8% et d'EPS-p5-16% (10 % m/v PBS), avec l'ajustement du modèle de Hertz (en rouge) sur la partie approche.....	155

Figure 71. Valeurs du module élastique déterminé par le modèle de Hertz à partir des courbes force-indentation pour les différents hydrogels A) d'EPS-p5 (10 % m/v PBS sauf l'EPS-p5-3%, 7 % m/v PBS) et B) d'EPS-p20 (10 % m/v PBS).....	156
Figure 72. Courbes de relaxation de force mesurées sur un hydrogel d'EPS-p5-16% (10 % m/v PBS) pour différentes indentations.....	158
Figure 73. A) Normalisation de la force des courbes de relaxation de force (Figure 72) mesurées dans un hydrogel d'EPS-p5-16% (10 % m/v PBS) à trois profondeurs d'indentation. B) Superposition des courbes de relaxation de force après les normalisations de la force et du temps révélant le comportement poroélastique de l'hydrogel.....	159
Figure 74. Courbes de relaxation de force mesurées sur un hydrogel d'EPS-p5-8% (10 % m/v PBS) pour différentes indentations.....	160
Figure 75. A) Normalisation de la force des courbes de relaxation de force mesurées dans un hydrogel d'EPS-p5-8% (10 % m/v PBS) à trois profondeurs d'indentation. B) Superposition des courbes de relaxation de force après les normalisations de la force et du temps révélant le comportement poroélastique de l'hydrogel. ....	160
Figure 76. Superposition des courbes de relaxation de force après normalisation des forces et du temps et ajustement du modèle poroélastique de Hu pour A) l'hydrogel d'EPS-p5-16% (10 % m/v PBS) et B) l'hydrogel d'EPS-p5-8% (10 % m/v PBS).....	161
Figure 77. Courbes de relaxation de force mesurées à différentes indentations sur un hydrogel d'EPS-p5-8% (10 % m/v PBS) avec superposition du modèle poroélastique de Hu (en pointillé rouge).....	162
Figure 78. Valeurs du coefficient de diffusion du DMEM dans les différents hydrogels (10 % m/v PBS sauf l'EPS-p5-3%, 7 % m/v PBS).....	163
Figure 79. Valeurs du module élastique mesuré à partir des courbes de relaxation pour les différents hydrogels A) d'EPS-p5 (10 % m/v PBS sauf l'EPS-p5-3%, 7 % m/v PBS) et B) d'EPS-p20 (10 % m/v PBS). ....	164
Figure 80. Valeurs du coefficient de Poisson pour les différents hydrogels A) d'EPS-p5 (10 % m/v PBS sauf l'EPS-p5-3%, 7 % m/v PBS) et B) d'EPS-p20 (10 % m/v PBS).....	165
Figure 81. Images MEB de la structure des hydrogels lyophilisés d'EPS-p5 et d'EPS-p20 préparés à 10 % m/v PBS hormis les EPS-p5-3%/2% (7 % m/v PBS).....	167
Figure 82. Exemples de méthodes de désinfection ou de stérilisation couramment utilisées dans le domaine médical (Galante et al., 2018). ....	169
Figure 83. Masse molaire moyenne en poids (Mw) (HPSEC-MALS-dRI) de l'EPS infernane (GY785) natif avant et après stérilisation, par rayonnement gamma ou beta (dose 15 kGy ou 25 kGy), par plasma froid (CP, mélange de gaz composé d'O <sub>2</sub> (20 %) et de N <sub>2</sub> (80 %) pour 1 h) et par oxyde d'éthylène (EtO, 700 mg/L, 250 min, 50 mbar, 45 °C à 45 % d'humidité) (Rederstorff et al., 2011a). ....	172

Figure 84. Évaluation de la biocharge sur milieu PCA (70 $\mu$ L, 48 h, 30 °C) de l'EPS (2 % m/v eau) A) non stérilisé, B) après chauffage 70°C-60 min, C) après chauffage 80°C-15 min et D) après 14 cm UV-15 min. ....	173
Figure 85. Masse molaire moyenne en poids (Mw) et rayon de giration (Rg) de l'EPS natif (0,2 % m/v) avant (en noir) ou après application des conditions de décontamination par chauffage (en rouge), par UV-C (en bleu) et par filtration à 0,22 $\mu$ m (en violet). Les flèches vertes indiquent les conditions sélectionnées et testées par la suite sur l'EPS-p5-8%. ....	175
Figure 86. Chromatogrammes HPSEC-MALS de l'EPS natif (0,2 % m/v) après décontamination par les 4 conditions les moins dénaturantes en termes de Mw et Rg. ....	176
Figure 87. Coefficients hydrodynamiques $\nu$ calculés à partir de la pente du tracé log-log du rayon de giration (Rg) en fonction de la masse molaire moyenne en poids (Mw) obtenus en HPSEC-MALS-dRI pour l'EPS natif (0,2 % m/v) après décontamination par les 4 conditions les moins dénaturantes en termes de Mw et Rg. ....	176
Figure 88. Évaluation de la biocharge sur milieu PCA (70 $\mu$ L, 48 h, 30 °C) de l'EPS-p5-8% (10 % m/v PBS) A) non stérilisé et B) après traitement 14 cm UV-30 min. ....	177
Figure 89. Aspect de l'hydrogel d'EPS-p5-8% (30 $\mu$ L, 10 % m/v PBS, 37 °C, 5 % CO <sub>2</sub> , humidité contrôlée), A) non stérilisé B) après chauffage 80°C-30 min C) après chauffage 90°C-15 min, D) après traitement 14 cm UV-C-30 min et E) après filtration à 0,22 $\mu$ m. ....	178
Figure 90. Aspect des solutions d'EPS greffés après chauffage 80°C-30 min. A) De gauche à droite : EPS-p5-16 %, EPS-p5-8% (10 % m/v PBS), EPS-p5-3% et EPS-p5-2% (7 % m/v PBS), B) de gauche à droite : EPS-p20-6%, EPS-p20-3%, EPS-p20-1% et EPS-p20-0,2% (10 % m/v PBS). ....	179
Figure 91. Aspect des hydrogels d'EPS greffés (30 $\mu$ L, 37 °C, 5 % CO <sub>2</sub> , humidité contrôlée) après désinfection 80°C-30 min observés après 7 jours d'incubation. A) De gauche à droite : EPS-p5-16 %, EPS-p5-8% (10 % m/v PBS), EPS-p5-3% et EPS-p5-2% (7 % m/v PBS). B) De gauche à droite : EPS-p20-6%, EPS-p20-3%, EPS-p20-1% et EPS-p20-0,2% (10 % m/v PBS). ....	179
Figure 92. Observation au microscope optique de l'aspect des cellules HEK293 FT adhérente ou en suspension (Gx10). ....	180
Figure 93. Principe du test AlamarBlue permettant l'évaluation de la viabilité cellulaire. ....	181
Figure 94. Evolution de la fluorescence (test AlamarBlue, 20 % v/v DMEM, 5h, 37 °C, 5 % CO <sub>2</sub> , humidité contrôlée, ex : 560 nm/em : 590 nm) de différentes concentrations initiales de cellules HEK293 ensemencées dans le Cultrex (30 $\mu$ L) au cours des jours. ....	184
Figure 95. Observation au microscope optique à température ambiante des cellules HEK293 ensemencées à différentes concentrations initiales dans le Cultrex (30 $\mu$ L) de J0 à J7 (Gx10). ....	184
Figure 96. Les hydrogels de p5, de p20, d'EPS-p5 et d'EPS-p20 ont été préparés à 10 % m/v PBS hormis les EPS-p5-3%/2% (7 % m/v PBS). Les cellules HEK293 ont été ensemencées à 1 x 10 <sup>6</sup> cell/mL (30 $\mu$ L) à J0. A) Gélification des hydrogels contenant les cellules HEK293 ensemencées (1 x 10 <sup>6</sup> cell/mL) 1 h à 37 °C (5 % CO <sub>2</sub> , humidité contrôlée). B) Aspect des puits à J3. B') Aspect des hydrogels après prélèvement du milieu de culture à J3. B'') Aspect des puits après test AlamarBlue (400 $\mu$ L, 20 % v/v DMEM, 5h, 37	

°C) à J3. C) Aspect des puits à J5. D) Aspect des puits à J7. D') Aspect des hydrogels après prélèvement du milieu de culture à J7. D'') Aspect des puits après test AlamarBlue (400 µL, 20 % v/v DMEM, 5h, 37 °C) à J7. Le Cultrex a été utilisé en tant que témoin positif. .... 187

Figure 97. Viabilité relative au témoin positif Cultrex par le test AlamarBlue (20 % v/v DMEM, 5h, 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, humidité contrôlée, ex : 560 nm/em : 590 nm) des cellules HEK293ensemencées (à 1 x 10<sup>6</sup> cell/mL) dans les hydrogels d'EPS greffés (10 % m/v PBS sauf EPS-p5-3%/2%, 7 % m/v PBS). \*\* indique que les valeurs sont significativement différentes du témoin positif (Cultrex) (Test t de Student à α = 5 %). .... 188

Figure 98. Observation au microscope optique à température ambiante des cellules HEK293ensemencées dans les hydrogels d'EPS greffés (10 % m/v PBS sauf EPS-p5-3%/2%, 7 % m/v PBS) (Gx10). Le Cultrex a été utilisé en tant que témoin positif. .... 189

Figure 99. Observation au microscope optique (Gx10) à température ambiante à J7 des cellules HEK293 présentes sous forme sphéroïde et adhérente dans A) l'hydrogel d'EPS-p5-2% (7 % m/v PBS) et B) le Cultrex. .... 190

Figure 100. Résumé graphique des principales expériences et caractérisations menées au cours de la thèse. .... 205



# Liste des tableaux

---

Tableau I. Principaux collagènes du cartilage articulaire (d'après Chevalier & Richette, 2005; Poole et al., 2001).....	9
Tableau II. Structure de l'unité répétitive des GAG (d'après Gandhi & Mancera, 2008).....	10
Tableau III. Principaux protéoglycanes du cartilage articulaire (D'après Chevalier & Richette, 2005; Poole et al., 2001; Zhang et al., 2011).....	12
Tableau IV. Exemples de bactéries productrices d'hétéropolysaccharides GAG/GAG-mimétiques ....	27
Tableau V. Applications médicales de l'EPS infernane sous forme native, dépolymérisée par voie radicalaire (DR) et sulfaté (DRS) ou inversement (SDR).....	32
Tableau VI.A/B/C. Conditions de réaction pour le greffage covalent alginate ou acide hyaluronique ou chitosane/pNIPAM par la chimie des carbodiimides (EDC). ....	52
Tableau VII. Masse molaire moyenne en poids (Mw), polydispersité et rayon de giration (Rg) du dérivé infernane 265 000 g/mol (EPS <sub>265</sub> ) et de l'EPS natif 1 100 000 g/mol (EPS <sub>1100</sub> ) avant ou après greffage par l'acide adipique dihydrazide (ADH), obtenus en HPSEC-MALS-dRI.....	63
Tableau VIII. Conditions réactionnelles du greffage de pNIPAM-NH <sub>2</sub> (-NH <sub>2</sub> ) sur l'EPS (-COOH) par la chimie carbodiimide (EDC) en présence de NHS, pour un rapport molaire final COOH:EDC:NHS = 1:1,6:1,6 (sauf condition 4 bis).....	68
Tableau IX. Composition des systèmes moléculaires étudiés en simulation de DM. La structure de l'infernane est limitée à 4 unités répétitives (dont 3 chaînes latérales). La structure du pNIPAM est limitée à 21 unités répétitives.....	70
Tableau X. Conditions de réaction (issues du Tableau VIII) et masses de produits obtenues. ....	83
Tableau XI. Caractérisation des produits finaux obtenus en termes de composition, d'efficacité de la réaction <sup>a</sup> , du nombre d'AU greffés <sup>b</sup> et de la densité de greffage des AU <sup>c</sup> , ainsi que de la masse molaire moyenne en poids (Mw), du rayon de giration (Rg) et du coefficient hydrodynamique (v). Les EPS-pNIPAM (EPS-p5 ou EPS-p20) sont désignés selon leur densité de greffage « x » des AU (%) (EPS-p5-x% ou EPS-p20-x%).....	88
Tableau XII. Pourcentages massiques de pNIPAM libre au sein des produits finaux EPS/p5 obtenus par FI-AF4, par dosage fluorescamine et dosage TNBS (à 1 mg/mL). Pour les dosages spectroscopiques, une gamme de p5 « brut » (Sigma) a été utilisée (0 à 0,4 mg/mL).....	95
Tableau XIII. Distribution en intensité des tailles des particules de solutions semi-diluées de l'EPS, du pNIPAM (p5/p20) et des EPS-p5 et EPS-p20 (1 mg/mL, PBS, pH 7,4) à 25 °C et 38 °C. Associé à la Figure 48.....	108

Tableau XIV. Concentrations cellulaires testées en HEK293 pour l'ensemencement dans l'hydrogel témoin Cultrex.....	134
Tableau XV. Valeurs du module de stockage $G'$ à 1 Hz mesuré par micro-rhéologie AFM sur 2 hydrogels indépendants (10 % m/v PBS sauf l'EPS-p5-3%, 7 % m/v PBS) pour chaque condition. Estimation de la taille des pores $\xi$ par l'équation (9) de Flory.....	154
Tableau XVI. Mesures par AFM en DMEM 30 min à 2 h après gélification. Les hydrogels sont préparés à 10 % m/v PBS hormis l'EPS-p5-3% (7 % m/v PBS). Valeurs du module élastique déterminé par les courbes de force ( $E_{HERTZ}$ ) et de relaxation ( $E$ ). Propriétés des hydrogels poroélastiques : coefficient de diffusion ( $D$ ), temps de relaxation ( $\tau$ ), coefficient de Poisson ( $\nu_{\infty}$ ), perméabilité ( $K$ ) et taille des pores ( $\xi$ ). Les valeurs avec des incertitudes proviennent des ajustements expérimentaux alors que les valeurs sans incertitudes sont issues de calculs à partir des valeurs moyennes.).....	168
Tableau XVII. Efficacité de la décontamination de l'EPS (2 % m/v eau) par chauffage et traitement UV-C. La croix rouge indique qu'un développement bactérien a été observé sur milieu PCA (70 $\mu$ L, 48 h, 30 °C) présenté Figure 84, à l'inverse des conditions présentant un rond vert. ....	173
Tableau XVIII. Résumé des données présentées dans ce mémoire sur les hydrogels d'EPS-p5 et d'EPS-p20. Les hydrogels étant préparés à 10 % m/v PBS, les proportions massiques (% m) des différents constituants sont égales à 10 fois leur concentration (en % m/v) au sein des hydrogels hormis pour les hydrogels d'EPS-p5-3% et d'EPS-p5-2% préparés à 7 % m/v. La concentration en % m/v ( $\times 10$ ) est précisée entre parenthèse en plus du pourcentage massique pour ces hydrogels (composition d'après FI-AF4-MALS-dRI). Les valeurs à l'équilibre (55 h) du gonflement sont relatives aux conditions de mesure. Les mesures de propriétés mécaniques par AFM ont été réalisées environ 30 min à 2 h après gélification dans des conditions de test <i>in vitro</i> : module élastique de relaxation ( $\langle E \rangle$ ), temps de relaxation poroélastique ( $\tau$ ) et taille des pores ( $\xi$ ). La viabilité de cellules HEK293 ensemencées dans les hydrogels d'EPS-pNIPAM est indiquée en pourcentage vis-à-vis de la viabilité dans le témoin positif Cultrex. ....	193

# Liste des abréviations

---

## - A -

**ACI** : implantation autologue de chondrocytes  
**ADAMT** : ang. a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs  
**ADH** : acide adipique dihydrazide  
**ADN** : acide désoxyribonucléique  
**AFM** : microscopie à/de force atomique  
**AMBER** : ang. assisted model building and energy refinement  
**AMIC** : chondrogenèse autologue induite par matrice  
**ARN** : acide ribonucléique  
**ATP** : adénosine triphosphate  
**ATR-FTIR** : réflexion totale atténuée - spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier  
**ATRP** : polymérisation radicalaire par transfert d'atomes  
**AU** : acide uronique

## - B -

**BME** : extrait de membrane basale  
**BMP** : ang. bone morphogenetic protein

## - C -

**CDMP** : ang. cartilage derived morphogenetic protein  
**CHO** : lignée cellulaire issue des ovaires de hamster de Chine  
**COMP** : ang. cartilage oligomeric matrix proteins  
**COSY** : corrélation homonucléaire  
**CP** : plasma froid  
**Cryo-MEB** : microscopie électronique à balayage cryogénique  
**CS** : chondroïtine sulfate (sauf Tableau VII.C : chitosane)

## - D -

**DCC** : dicyclohexylcarbodiimide  
**DEPT** : amélioration sans distorsion du transfert de polarisation  
**DIC** : diisopropylcarbodiimide  
**DIV** : disque intervertébral  
**DLS** : diffusion dynamique de la lumière  
**DM** : dynamique moléculaire  
**DMF** : diméthylformamide  
**DMSO** : diméthylsulfoxyde  
**dn/dc** : incrément d'indice de réfraction spécifique  
**DOSY** : spectroscopie ordonnée par diffusion  
**DR** : dépolymérisé par voie radicalaire  
**dRI** : différence d'indice de réfraction  
**DRS** : dépolymérisé par voie radicalaire puis sulfaté  
**DS** : dermatane sulfate

- E -

**EDC** : 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide

**EMA** : Agence Européenne des Médicaments

**EPS** : exopolysaccharide

**ESCs** : ang. embryonic stem cells

**EtO** : oxyde d'éthylène

**EtOH** : éthanol

- F -

**FDA** : ang. Food and Drug Administration

**FGF** : ang. fibroblast growth factor

**FI-AF4** : ang. frit inlet-asymmetrical flow field-flow fractionation

- G -

**GAFF** : ang. general AMBER force field

**GAG** : glycosaminoglycane

**Gal** : galactose

**GalA** : acide galacturonique

**GalNAc** : N-acétyl-D-galactosamine

**GDF** : ang. growth differentiation factor

**Glc** : glucose

**GlcA** : acide glucuronique

**GlcN** : D-glucosamine

**GlcNAc** : N-acétyl-D-glucosamine

**Gly** : glycine

**GRAS** : ang. generally recognized as safe

- H -

**HA** : acide hyaluronique/hyaluronane

**hATSCs** : ang. human adipose tissue-derived MSCs

**hBM-MSCs** : ang. human bone-marrow derived mesenchymal stem cells

**HEK** : ang. human embryonic kidney

**HOBt** : hydroxybenzotriazole

**Hp** : héparine

**HPSEC** : chromatographie d'exclusion stérique haute performance

**HS** : héparane sulfate

**HSQC** : cohérence quantique unique hétéronucléaire

**HSPG** : ang. heparan sulfate proteoglycan

- I -

**ICRS** : ang. International Cartilage Regeneration & Joint Preservation Society

**IdoA** : acide iduronique

**IGF-1** : ang. insulin-like growth factor-1

**IL-1 $\beta$**  : interleukine 1 $\beta$

**IPN** : réseaux interpénétrés

**IPSCs** : ang. induced pluripotent stem cells

**IRM** : imagerie par résonance magnétique

- **J** -

**J0/1/2/3/4/5/7** : jour 0/1/2/3/4/5/7

- **K** -

**KS** : kératane sulfate

- **L** -

**LCST** : température de solution critique inférieure

**LS** : diffusion de la lumière

- **M** -

**MACI** : implantation autologue de chondrocytes assistée par matrice

**MALS** : diffusion de la lumière multi-angles

**MAPK** : ang. mitogen-activated protein kinases

**MEB** : microscopie électronique à balayage

**MEBE** : microscopie électronique à balayage environnemental

**MEC** : matrice extracellulaire

**MES** : acide 2-(N-morpholino)éthanosulfonique

**MMP** : ang. matrix metalloproteinase

**MMT** : argile de montmorillonite

**Mn** : masse molaire moyenne en nombre

**MSCs** : ang. mesenchymal stem cells

**Mw** : masse molaire moyenne en poids

- **N** -

**NHS** : N-hydroxysuccinimide

**NIPAM** : N-isopropylacrylamide

**NMP** : polymérisation médiée par le nitroxyde

**NPT** : ensemble thermodynamique isotherme isobare

- **P** -

**p5** : pNIPAM-NH<sub>2</sub> Mn 5 500 g/mol

**p20** : pNIPAM-NH<sub>2</sub> Mn 20 000 g/mol

**PBS** : tampon phosphate salin

**PCA** : ang. plate count agar

**PCGA** : acide poly(ε-caprolactone-co-glycolique)

**PCL** : poly(ε-caprolactone)

**PCLA** : acide poly(ε-caprolactone-co-lactique)

**PCM** : matrice péricellulaire

**PcPrOx** : poly(2-cyclopropyl-2-oxazoline)

**pDEAM** : poly(N,N-diéthylacrylamide)

**PDEAOx** : poly(2-diéthylamino-2-oxazoline)

**pDMAM** : poly(N,N-diméthylacrylamide)

**pEAM** : poly(N-éthylacrylamide)

**PEG** : poly(éthylène glycol)

**pEMAM** : poly(N,N-éthylméthacrylamide)

**PEO** : poly(éthylène oxide)  
**PEtOx** : poly(2-éthyl-2-oxazoline)  
**PGA** : acide polyglycolique  
**PiPrOx** : poly(2-isopropyl-2-oxazoline)  
**PLA** : acide polylactique  
**PLGA** : acide poly(lactique-co-glycolique)  
**PMVE** : poly(méthylvinyléther)  
**pnBAM** : poly(N-n-butylacrylamide)  
**pNIPAM** : poly(N-isopropylacrylamide)  
**pnPAM** : poly(N-n-propylacrylamide)  
**PnPrOx** : poly(2-n-propyl-2-oxazoline)  
**PNVCL** : poly(N-vinylcaprolactame)  
**POx** : poly(2-oxazoline)  
**PPG** : poly(propylène glycol)  
**PPO** : poly(propylène oxide)  
**Pro** : proline  
**PSM** : poste de sécurité microbiologique  
**PVA** : alcool polyvinylique  
**PVDF** : polyfluorure de vinylidène  
**PVLA** : acide poly( $\delta$ -valérolactone-co-lactique)

- R -

**RACs** : ang. rabbit articular chondrocytes  
**RAFT** : polymérisation radicalaire contrôlée par transfert de chaîne réversible par addition-fragmentation  
**RDRP** : polymérisation radicalaire par désactivation réversible  
**RESP** : méthode du potentiel électrostatique restreint  
**RGF** : ang. reduced growth factor  
**RMN** : résonance magnétique nucléaire  
**RT-PCR** : réaction en chaîne par polymérase après transcription inverse

- S -

**SEC** : chromatographie d'exclusion stérique  
**SDR** : sulfaté puis dépolymérisé par voie radicalaire  
**SDS** : dodécylsulfate de sodium  
**Si-HPMC** : hydroxypropylméthylcellulose silanisée  
**SLRP** : ang. small leucin-rich proteoglycans

- T -

**TGF- $\beta$**  : ang. transforming growth factor  
**THF** : tétrahydrofurane  
**TIMP** : ang. tissue inhibitors of metalloproteinase  
**TNBS/TNBSA** : acide trinitrobenzènesulfonique  
**TNF- $\alpha$**  : ang. tumor necrosis factor

- U -

**UCST** : température de solution critique supérieure

**UV** : ultraviolet

- V -

**Val** : valine

**VEGF** : ang. vascular endothelial growth factor

**2D** : bidimensionnel

**3D** : tridimensionnel



# Introduction générale

---



Le cartilage articulaire est un tissu conjonctif spécialisé qui revêt les surfaces osseuses des articulations facilitant leur mouvement par la réduction des forces de friction. Les propriétés mécaniques uniques du cartilage lui sont conférées par la composition biochimique et la structure de sa matrice extracellulaire fortement hydratée, riche en collagène et en protéoglycane. Le cartilage est un tissu avasculaire, ce qui limite sa capacité de régénération car les cellules impliquées dans le processus de réparation ne peuvent pas atteindre la zone endommagée aussi facilement que dans d'autres tissus. De plus, les cellules présentes dans le cartilage, appelées chondrocytes, ont un métabolisme relativement faible, ce qui limite aussi leur capacité à renouveler la matrice extracellulaire. Enfin, le cartilage ne contient pas de terminaisons nerveuses. Bien que cela puisse sembler être un avantage, cela signifie que les lésions primaires du cartilage, qui n'entraînent ni inflammations ni douleurs, peuvent passer inaperçues jusqu'à ce qu'elles atteignent un stade avancé. Au fil du temps, les traumatismes répétés ou une sollicitation excessive peuvent engendrer une altération durable de la matrice extracellulaire du cartilage pouvant conduire à une perte fonctionnelle du tissu ou à l'apparition de l'arthrose. En vieillissant, la prévalence de ces problèmes articulaires augmente, ce qui en fait une préoccupation importante de notre société.

Il existe plusieurs techniques de réparation du cartilage (e.g. microfracture, transplantation de cartilage, transplantation cellulaire...), chacune adaptée à des situations spécifiques en fonction de la gravité de la lésion, de sa localisation, de son étendu et de l'âge du patient, mais aucune d'entre elles ne permet de reconstruire durablement la matrice extracellulaire du cartilage natif. Dans ce contexte, l'ingénierie tissulaire offre un espoir tangible en permettant la régénération ciblée de ce tissu essentiel. Ce domaine interdisciplinaire faisant intervenir les techniques des sciences des matériaux, ingénierie et de la biologie vise à développer des approches pour restaurer le cartilage endommagé en associant des cellules et des facteurs de croissance à des biomatériaux. La finalité étant de créer des échafaudages tridimensionnels soutenant la croissance cellulaire, la différenciation et la formation de nouveaux tissus.

Dans ce contexte, concevoir des biomatériaux déformables, comme les hydrogels, favorisant la régénération du cartilage est une stratégie prometteuse et qui suscite actuellement un fort engouement en ingénierie tissulaire. En effet, les hydrogels constitués

d'une matrice polymérique fortement hydratée représentent le support idéal pour mimer la matrice extracellulaire du cartilage et pour optimiser les réponses cellulaires. Parmi les nombreux hydrogels déjà élaborés, les hydrogels injectables possédant une réponse stimulable avec la température (hydrogels thermosensibles) sont particulièrement intéressants pour la régénération du cartilage en raison de leurs caractéristiques uniques qui répondent aux besoins spécifiques de cette application. En effet, sous forme de solution à température ambiante, ces hydrogels thermosensibles peuvent être injectés de manière mini-invasive dans la zone lésée de l'articulation en épousant précisément la forme et la taille de la lésion du cartilage pour permettre une adaptation anatomique optimale. Par la suite, les solutions gélifient sous le seul effet de la température corporelle du patient. Pour l'application visée, ces hydrogels doivent idéalement posséder des propriétés biologiques proches de celles de la matrice extracellulaire du cartilage pour optimiser les processus cellulaires, en favorisant notamment l'adhésion, la prolifération, la migration et la différenciation. Les propriétés mécaniques des hydrogels, modulées par la nature des liens, physiques ou covalents, ainsi que par leur densité, contribuent fortement aux réponses cellulaires observées.

L'Ifremer (Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer) développe depuis plusieurs années des travaux sur la connaissance des océans et leurs ressources. A la suite de l'exploration des sources hydrothermales océaniques profondes, différentes bactéries productrices d'exopolysaccharides (EPS) ont été isolées. En particulier, la bactérie marine *Alteromonas infernus*, capable de sécréter un EPS présentant une structure atypique, a été découverte. Cet EPS, nommé infernane, est un hétéropolysaccharide anionique, fortement ramifié, de haut poids moléculaire ( $> 10^6$  g/mol) et naturellement sulfaté (10 % de groupements sulfates). Sous sa forme native, l'EPS peut être considéré comme un glycosaminoglycane-mimétique par la présence des acides uroniques et des groupements sulfates. Cet EPS possédant naturellement des propriétés biologiques est donc un candidat prometteur pour formuler des hydrogels. Cependant, sous sa forme native, il est exempt de propriétés de gélification et son utilisation actuelle en ingénierie tissulaire est limitée à une supplémentation à un polymère gélifiant intrinsèquement. Sa formulation en hydrogel à part entière, qui requiert une étape de modification supplémentaire, est donc un défi à surmonter.

L'objectif principal de la thèse porte sur le développement d'hydrogels thermosensibles injectables à base d'EPS pour de futures applications en ingénierie tissulaire du cartilage. Dans un premier temps, l'EPS a été fonctionnalisé avec un polymère thermosensible, le poly(N-isopropylacrylamide) (pNIPAM), en modulant les conditions de greffage, avant d'être caractérisé à l'échelle moléculaire par de nombreuses techniques complémentaires. Dans un second temps, les propriétés mécaniques et biologiques des hydrogels d'EPS-pNIPAM formés ont été déterminées, permettant ainsi de comprendre la relation entre la structure des EPS greffés et leurs propriétés fonctionnelles.

**Le présent manuscrit se compose des parties suivantes :**

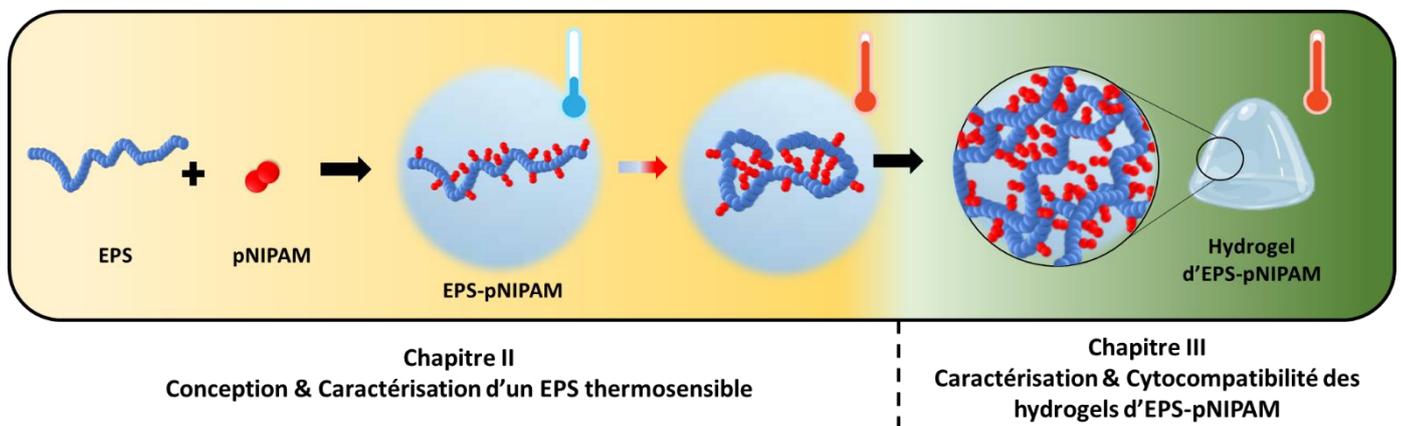
**Le chapitre I** présente une analyse de la littérature portant sur le développement de biomatériaux pour des applications en ingénierie tissulaire du cartilage, en abordant plus particulièrement la conception d'hydrogels thermosensibles.

**Le chapitre II** porte sur la mise au point du greffage du pNIPAM sur l'EPS et la caractérisation des propriétés physico-chimiques des polymères greffés EPS-pNIPAM par une approche multi-technique. Certaines caractérisations ont été réalisées sur la Plateforme TFFFC d'École d'Ingénieur de Purpan de Toulouse (séjour de 2 semaines), ainsi qu'à travers des collaborations avec le CERMAV de Grenoble, l'Institut de Biochimie et Biophysique de Kazan en Russie et l'Université Naples II en Italie.

**Le chapitre III** est consacré à la compréhension de l'influence de la composition et de la densité de greffage des polymères EPS-pNIPAM sur les propriétés mécaniques des hydrogels obtenus ainsi que sur leur cytocompatibilité. L'étude de cytocompatibilité a été réalisée en collaboration avec le laboratoire LSEM à l'Ifremer de Nantes.

Enfin, **la conclusion** constitue la dernière partie de ce manuscrit offrant une synthèse globale de ces travaux de thèse, mettant en lumière les résultats majeurs obtenus et en proposant des perspectives de recherche pour une utilisation future de ces hydrogels en ingénierie tissulaire du cartilage.

**ÉLABORATION D'HYDROGELS THERMOSENSIBLES INJECTABLES À BASE D'EXOPOLYSACCHARIDES MARINS POUR L'INGÉNIERIE TISSULAIRE**



- Résumé introductif des chapitres résultats du mémoire de thèse -

# Chapitre I

## Étude bibliographique

---



# 1. Le cartilage articulaire

## 1.1. Généralités sur l'articulation synoviale

La jonction des extrémités osseuses du système musculosquelettique humain est assurée par des zones anatomiquement distinguables nommées articulations. Il est classiquement répandu de classer les articulations selon leur degré de mobilité mais également de par la nature du cartilage les constituant (Figure 1.A). Les synarthroses, articulations peu mobiles voire immobiles, sont des articulations fibreuses que l'on retrouve notamment sous forme de sutures au niveau du crâne. Les amphiarthroses, sont constituées de pièces cartilagineuses permettant une mobilité restreinte : c'est le cas des articulations intervertébrales. Les mouvements de flexion, d'extension, d'adduction etc, font appel à de multiples configurations osseuses relevant d'un degré de liberté spatial important permis par les diarthroses aussi appelées articulations synoviales (Chevalier & Richette, 2005; Marian et al., 2021; Mazières et al., 2018). Structurées au sein d'un manchon fibreux (capsule articulaire)

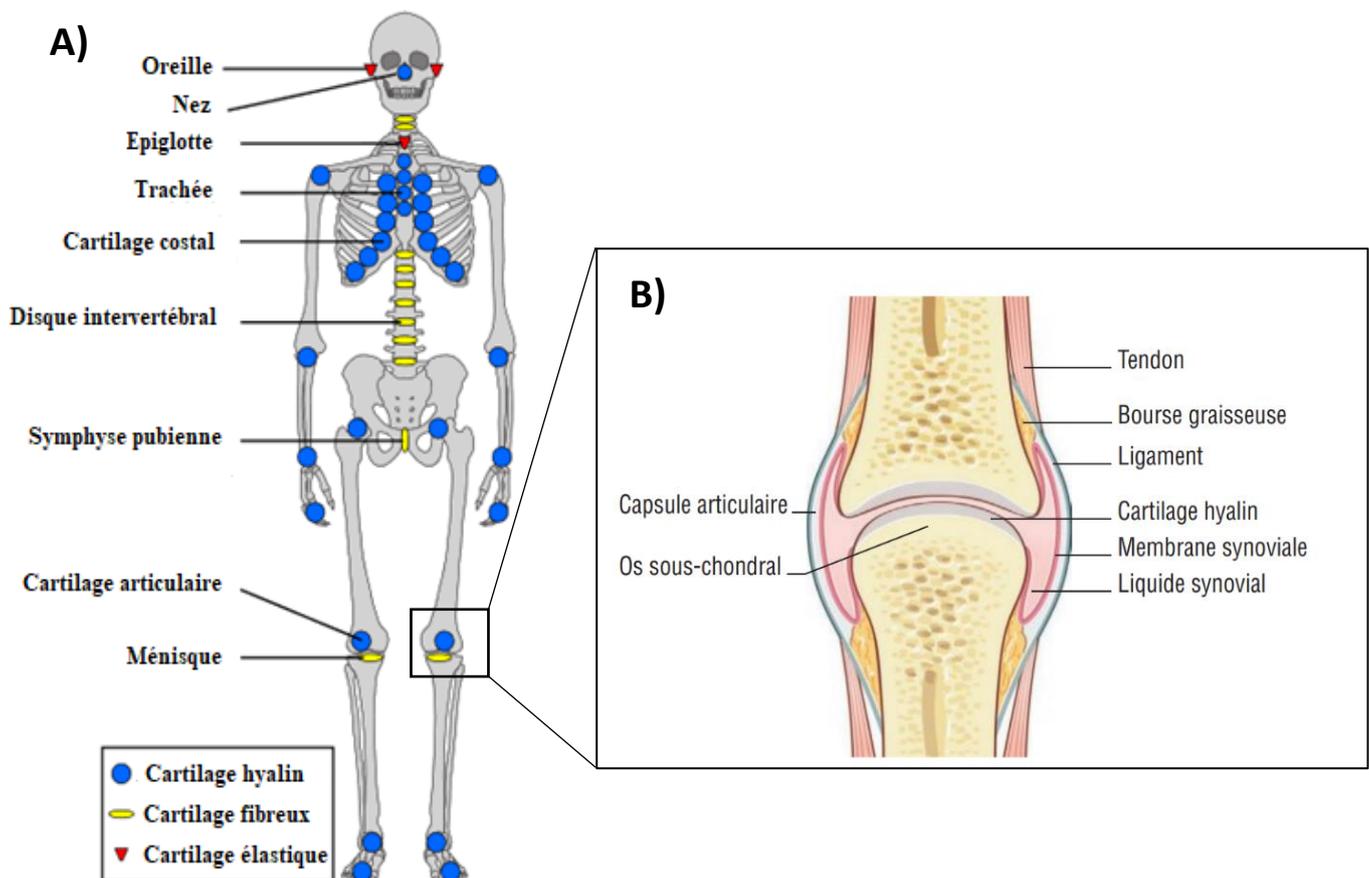


Figure 1. A) Localisation anatomique des différents types de cartilage (d'après Krishnan & Grodzinsky, 2018). B) Schéma des constituants d'une articulation synoviale (Mazières et al., 2018).

stabilisé par les tendons et ligaments, les extrémités osseuses sont recouvertes d'un cartilage hyalin, baignant dans un liquide nommé synovie produit par la membrane synoviale (Figure 1.B). Ce dialysat sélectif du plasma sanguin (concentration similaire en électrolytes) est supplémenté en acide hyaluronique, lubricine, phospholipides et autres protéines telles que l'albumine ou les protéines sériques, qui lui confèrent ses propriétés viscoélastiques. Sous la forme d'un gel visqueux, la synovie a pour fonction la lubrification des articulations et la réduction des forces de compression et de cisaillement locales. Elle joue également un rôle de nutrition vis-à-vis du cartilage par diffusion lors des mouvements et possède des propriétés anti-inflammatoires (Lawry & Bewyer, 2008; Yakut & Tuncer, 2020).

### 1.2. Fonction du cartilage articulaire

Le cartilage articulaire est un tissu conjonctif unique car non innervé et non vascularisé, par conséquent pauvre en oxygène (O<sub>2</sub>). Présentant des coefficients de frottement extrêmement faibles (~ 0,0005 et 0,04) (Han et al., 2011), le cartilage favorise le glissement des surfaces osseuses au niveau de l'articulation. Le cartilage joue également le rôle d'amortisseur vis-à-vis de l'os sous chondral permettant la dissipation de l'énergie mécanique (grâce à ses propriétés viscoélastiques) résultante des contraintes mécaniques telles que la pression et les cisaillements locaux, en synergie avec le liquide synovial. Souple et déformable, le cartilage est donc essentiel pour la mobilité de l'articulation.

### 1.3. Composition du cartilage articulaire

Le cartilage articulaire est un cartilage hyalin principalement constitué d'eau (70 à 85 % du poids humide), de collagène (60 à 86 % du poids sec), de protéoglycane (15 à 40 % du poids sec) et d'autres protéines notamment de liaison (ex : ang. cartilage oligomeric matrix proteins (COMP), matrilines...), organisés au sein d'une matrice extracellulaire (MEC) sécrétée par des cellules spécialisées, les chondrocytes (Wei & Dai, 2021). Environ 30 % de l'eau interstitielle est fortement associée au réseau collagénique. L'eau restante interagit avec les protéoglycanes et est librement échangée lors des changements de pression cycliques au cours des mouvements permettant la lubrification, l'élimination des déchets métaboliques et la nutrition des chondrocytes (Bader & Lee, 2000).

### 1.3.1. Les chondrocytes

Les chondrocytes sont les cellules spécialisées du cartilage dont la forme (sphérique ou ovoïde), le nombre et la taille (30 à 40  $\mu\text{m}$ ) diffèrent selon la zone du cartilage. Les chondrocytes ne représentent que 2 à 5 % du volume tissulaire total soit un volume cellulaire inverse vis-à-vis de nombreux organes (Aigner & Stöve, 2003). Le cartilage étant avasculaire, les chondrocytes se développent en condition anaérobie : le gradient d'hypoxie varie de 1 à 10 % d' $\text{O}_2$  en fonction de la profondeur considérée. A la différence du cartilage de croissance, le processus de maturation cellulaire est extrêmement ralenti au point que l'apoptose est rare dans le tissu cartilagineux sain. Les chondrocytes sont à l'état normal des cellules quiescentes qui ne se divisent que très peu, le renouvellement cellulaire est par conséquent faible. Les chondrocytes sont néanmoins responsables de la synthèse et de la dégradation des constituants de la MEC (Bhosale & Richardson, 2008; Chevalier & Richette, 2005; Mazières et al., 2018; Peng et al., 2021).

### 1.3.2. Le collagène

Le collagène est la protéine la plus abondante de la MEC. Sans être spécifique au cartilage, le collagène de type II est un marqueur de ce tissu, représentant près de 95 % du collagène total. Il se présente sous la forme d'un homotrimère qui s'organise en un réseau fibrillaire rigide à mailles larges structurant la MEC. Les autres collagènes (principalement type VI, IX, X et XI) ont un rôle de soutien et interactionnel avec le collagène II et les autres constituants du cartilage (Tableau I) (Vignon, 2000; Wei & Dai, 2021).

*Tableau I. Principaux collagènes du cartilage articulaire (d'après Chevalier & Richette, 2005; Poole et al., 2001).*

Collagène	Caractéristique	Fonction
<b>Type II</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Homotrimère organisé en macrofibrilles</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Résistance à la tension</li> </ul>
<b>Type VI</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hétérotrimère organisé en microfilaments dans l'espace péricellulaire</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Médiateur du microenvironnement chondrocytaire</li> </ul>
<b>Type IX</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hétérotrimère associé au collagène de type II</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Résistance à la tension</li> </ul>
<b>Type X</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Homotrimère synthétisé par les chondrocytes hypertrophiques</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Processus de minéralisation</li> </ul>
<b>Type XI</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hétérotrimère associé au collagène de type II</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nucléation des fibrilles de collagène de type II</li> </ul>

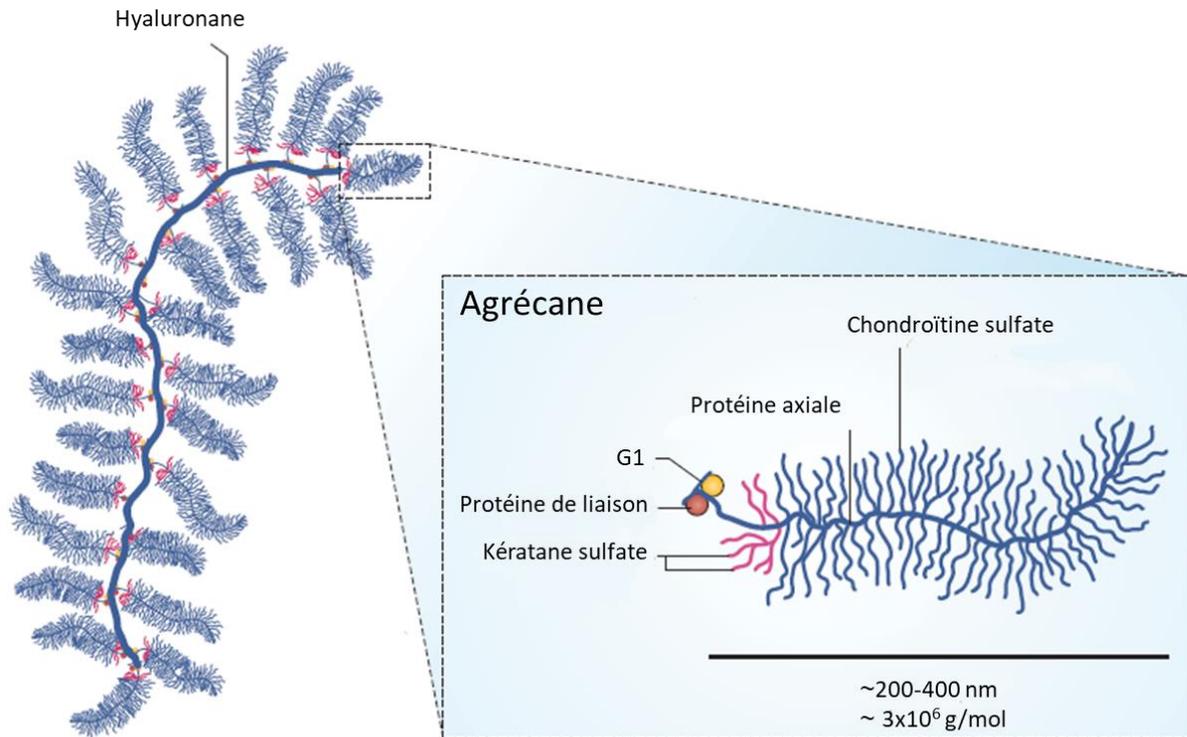
### 1.3.3. Les glycosaminoglycanes (GAG) et protéoglycanes

Les protéoglycanes sont des assemblages covalents entre une protéine axiale porteuse (ang. core protein) et des chaînes polysaccharidiques nommées glycosaminoglycanes (GAG), composants omniprésents de la MEC des tissus conjonctifs animaux (Perez et al., 2023). Les GAG sont des hétéropolysaccharides anioniques linéaires de masse molaire comprise entre 10 et 100 x 10<sup>3</sup> g/mol (sauf l'acide hyaluronique qui se caractérise par sa haute masse molaire, 4 à 8 x 10<sup>6</sup> g/mol). Il existe deux types de GAG : les non sulfatés, cas de l'acide hyaluronique (ou hyaluronane), et les sulfatés incluant la chondroïtine sulfate, la dermatane sulfate, la kératane sulfate, l'héparane sulfate et l'héparine (Tableau II). Les GAG sont constitués de répétitions d'unités disaccharidiques composées d'un acide uronique (ou du galactose (Gal) pour le kératane sulfate), D-glucuronique (GlcA) ou L-iduronique (IdoA) et d'une hexosamine de type N-acétyl-D-galactosamine (GalNAc) ou D-glucosamine (GlcN) (potentiellement N-acétylée, GlcNAc). Les unités d'acide uronique peuvent être sulfatées en position O-2 et dans le cas des hexosamines en position O-3, 4 et 6 et parfois en position N-2. Enfin, la liaison osidique reliant les différentes unités, disaccharidiques de géométrie variable  $\alpha$  ou  $\beta$ , contribue à la diversité structurale des GAG (Gandhi & Mancera, 2008).

Au sein du cartilage, deux GAG, la chondroïtine sulfate et la kératane sulfate, sont majoritairement présents. Les chaînes de ces GAG sont greffées sur une protéine centrale pour former un agrécane, le protéoglycane le plus abondant de la MEC du cartilage. L'agrécane est lié *via* une protéine de liaison à l'acide hyaluronique formant ainsi un macro-agrégat pouvant atteindre 10  $\mu$ m en longueur et une masse molaire de 10<sup>8</sup> g/mol, et dans lequel plus de 300 agrécanes peuvent être associés (Figure 2) (Bajpayee & Grodzinsky, 2017;

Tableau II. Structure de l'unité répétitive des GAG (d'après Gandhi & Mancera, 2008).

Acide hyaluronique (HA)	Kératane sulfate (KS)	Héparine (Hp)	Héparane sulfate (HS)	Chondroïtine sulfate (CS)	Dermatane sulfate (DS)
				<p><b>CS de type A</b></p> D-GlcA-β(1→3)-D-GalpNAc4S-α(1→4)	
				<p><b>CS de type C</b></p> D-GlcA-β(1→3)-D-GalpNAc6S-α(1→4)	



**Figure 2.** Schéma de la structure d'un macro-agrégat hyaluronane-protéoglycane (agrécane) (d'après Bajpayee & Grodzinsky, 2017).

Vignon, 2000). Enchâssé au sein du maillage collagénique, l'agrécane joue principalement un rôle structural sous forme d'édifices supramoléculaires. Les GAG étant chargés négativement, leur nature hydrophile assure l'hydratation basale de la cavité articulaire.

A l'inverse des agrécans, les protéoglycans de petites tailles riches en leucine (ang. small leucin-rich proteoglycans, SLRP) (décorine, biglycane, fibromoduline), aussi présents au sein de la MEC du cartilage, ont davantage un rôle interactionnel que ce soit avec les composants de la MEC, les chondrocytes mais aussi des protéines telles que les cytokines et facteurs de croissance (Praillet et al., 1998; Vignon, 2000). En effet, la densité de charge négative des GAG procure aux protéoglycans une capacité interactionnelle remarquable avec les acides aminés basiques de ces protéines impliquées dans la régulation des processus cellulaires fondamentaux (prolifération, migration, différenciation, angiogenèse), à la fois physiologiques (développement et fonctionnement d'un organe) et pathologiques (inflammation, cancer). Véritable réservoir de facteurs de croissance, les GAG augmentent considérablement leur biodisponibilité (crinopexie) en protégeant les cytokines efficacement vis-à-vis de la dégradation par les protéases extracellulaires (Gandhi & Mancera, 2008; Köwitsch et al., 2018; Ricard-Blum & Perez, 2022; Sivakumar et al., 2022). Les protéoglycans

transmembranaires (syndécane) ou de surface cellulaire (perlécane) à héparane sulfate (ang. heparan sulfate proteoglycans, HSPG) fonctionnent également comme des co-récepteurs pour les facteurs de croissance et les protéines adhésives (fibronectine, laminine, téna-scine, COMP...) de la MEC (Pap & Bertrand, 2013; Rider & Mulloy, 2017). Ainsi en raison de ces interactions, les GAG de ces protéoglycane jouent un rôle essentiel dans la potentialisation de l'activité tissulaire en facilitant la fixation de cytokines aux récepteurs membranaires spécifiques entraînant l'activation des voies métaboliques. Les GAG, ayant également leurs récepteurs propres (les récepteurs aux chondroïtines sulfates ou encore les récepteurs CD44 et RHAMM pour l'acide hyaluronique (Naor, 2016)), contribuent aux interactions cellules-MEC avec de nombreux récepteurs transmembranaires liés aux protéines du cytosquelette (actines) des chondrocytes, les intégrines (Tableau III). L'importance de ces interactions dans l'homéostasie tissulaire mécano-dépendante sera abordée dans la partie I.1.5. Les GAG sont donc les chefs d'orchestre du microenvironnement cellulaire indispensable au développement et au maintien des fonctionnalités du cartilage (Chevalier & Richette, 2005; Poole et al., 2001; Zhang et al., 2011).

**Tableau III. Principaux protéoglycane du cartilage articulaire (D'après Chevalier & Richette, 2005; Poole et al., 2001; Zhang et al., 2011).**

Protéoglycane	Composition	Fonction
<b>Agrécane</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 100 chaînes de chondroïtine sulfate + 30 chaînes de kératane sulfate.</li> <li>• Plus de 300 agrécane peuvent s'associer en macro-agrégats avec l'acide hyaluronique</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Résistance au force de compression</li> </ul>
<b>SLRP</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Décorine</b> : 1 chaîne de chondroïtine sulfate ou dermatane sulfate</li> <li>• <b>Biglycane</b> : 2 chaînes de chondroïtine sulfate et/ou dermatane sulfate</li> <li>• <b>Fibromoduline</b> : 4 chaînes de kératane sulfate</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rôle dans la fibrillogénèse</li> <li>• Interaction cellules-MEC</li> <li>• Interaction avec les cytokines et autres protéines</li> </ul>
<b>HSPG</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Syndécane</b> : 3 chaînes d'héparane sulfate et 2 chaînes de chondroïtine sulfate</li> <li>• <b>Perlécane</b> : 3 chaînes d'héparane sulfate et/ou chondroïtine sulfate</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Interaction cellules-MEC</li> <li>• Interaction avec les cytokines et autres protéines</li> </ul>

#### 1.4. Structure du cartilage articulaire

Le cartilage articulaire, d'une épaisseur de 2 à 4 mm, est structuré en 4 couches anisotropiques qui diffèrent par l'orientation et la proportion de ses constituants acellulaires et cellulaires (protéoglycanes, collagènes, chondrocytes notamment), lui conférant ses propriétés biomécaniques (Figure 3) (Fox et al., 2009; Hunziker, 2010; Wei & Dai, 2021).

- La couche superficielle (ang. superficial zone) (10-20 % de l'épaisseur du cartilage), en contact direct avec le liquide synovial, gouverne la perméabilité du tissu. La sécrétion de lubriline à sa surface participe à la lubrification des extrémités cartilagineuses. L'orientation parallèle des fines fibres de collagène (~ 20 nm) lui octroie une grande résistance aux fortes tensions mécaniques. Les chondrocytes y sont aplatis et la concentration en protéoglycane est faible.
- La couche moyenne (ang. transitional zone) (40-60 % de l'épaisseur du cartilage) présente une orientation isotrope des fibres de collagène. Les chondrocytes y sont relativement sphériques et peu nombreux. La concentration en protéoglycane est plus importante.
- La couche profonde (ang. deep zone) (30 % de l'épaisseur) est constituée de larges fibres de collagène (~ 100 nm) orientées perpendiculairement à la surface. La concentration en protéoglycane y est maximale. Le réseau tridimensionnel (3D) formé assure l'intégrité du tissu face aux forces de compression. Dû à l'orientation anisotrope des fibres de collagène, les chondrocytes sont arrangés en colonne empilée verticalement.
- Délimitée des autres couches par une démarcation basophile nommée « Tidemark », la couche dite calcifiée (ang. calcified cartilage layer) en raison de la présence de cristaux de phosphate de calcium, repose sur l'os sous-chondral (ang. subchondral bone). Les fibrilles de collagène implantées de part et d'autre offrent une excellente intégration structurelle. Les chondrocytes de cette zone expriment un phénotype hypertrophique en synthétisant notamment du collagène de type X.

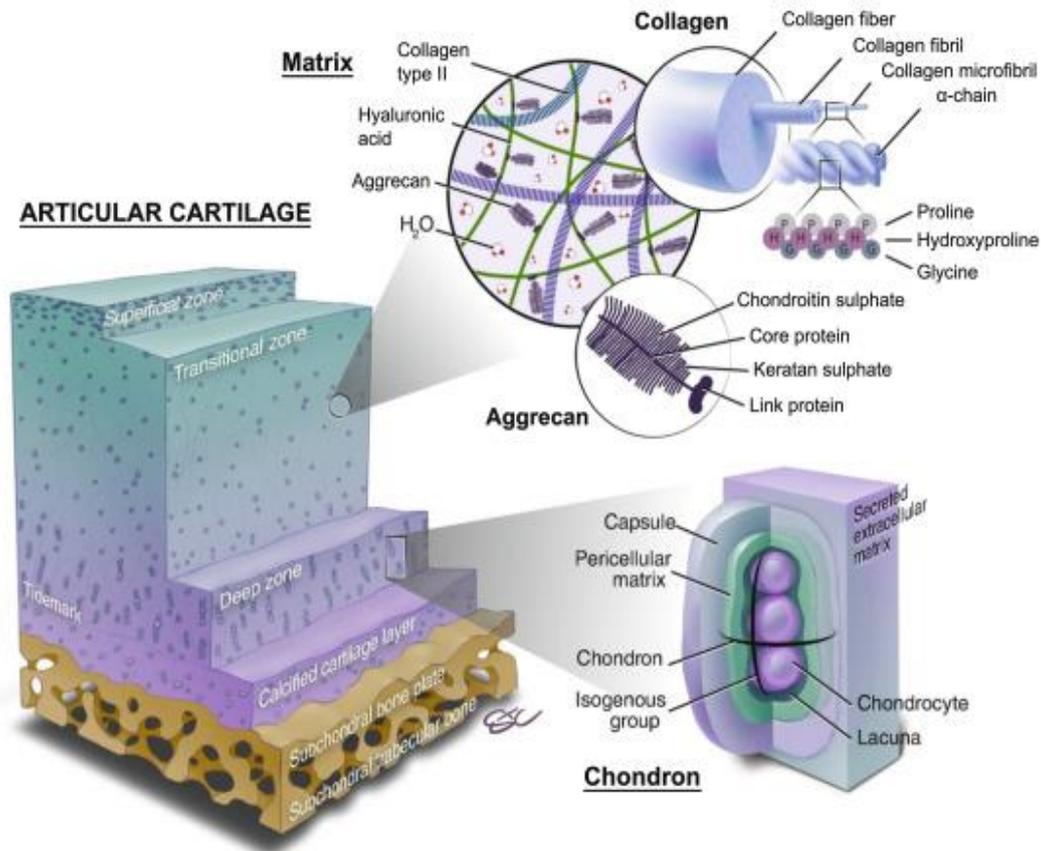


Figure 3. Schéma résumant la structure et la composition du cartilage articulaire (Wei & Dai, 2021).

### 1.5. Homéostasie tissulaire mécano-dépendante

L'homéostasie tissulaire du cartilage est régulée par les contraintes mécaniques (tension, cisaillement et compression) qui conduisent à des déformations répétées de la MEC. L'environnement immédiat du chondrocyte (environ 2  $\mu\text{m}$ ) constitué de la matrice pérircellulaire (PCM) formant ainsi le chondron, joue le rôle d'intermédiaire mécano-senseur entre la MEC et le chondrocyte. Le module élastique du PCM, plus faible que dans le reste du tissu (40-70 kPa contre 0,7-20 MPa) est favorable au développement cellulaire (Xu et al., 2022). Les protéoglycanes (syndécane, perlécane, décorine), les collagènes (type VI notamment) et autres protéines (anchoring, fibronectine, matrilines...) constitutifs de la PCM sont capables d'interagir avec les récepteurs transmembranaires mécano-sensibles, les intégrines, reliés au cytosquelette de la cellule (Raleigh et al., 2017; Loeser, 2014; Peng et al., 2021). Les chondrocytes peuvent également détecter des changements dans leur environnement mécanique à travers une variété de mécanismes (dont les mouvements ioniques générés par les déplacements de fluide) *via* leurs cils primaires ou encore leurs canaux ioniques dépendants du calcium (Xu et al., 2022). La méchanotransduction, processus

qui transcrit un signal mécanique en une réponse biochimique, s'exprime ainsi par l'activation mécano-dépendante de ces acteurs entraînant la synthèse par les chondrocytes des constituants matriciels (collagènes, protéoglycanes, glycoprotéines), des enzymes capables de les dégrader telles que les agrécanases (ADAMT-4 et 5) de la famille des ADAMT (ang. a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs), les collagénases (MMP-1, 8 et 13) de la famille des métalloprotéases, MMP (ang. matrix metalloproteinase) et des cathepsines ou encore des facteurs de régulation tels que les inhibiteurs tissulaires de métalloprotéases, TIMP (ang. tissue inhibitors of metalloproteinase). Les contraintes dynamiques ont ainsi un effet anabolique sur la synthèse de la MEC, tandis que des contraintes statiques ont systématiquement un effet catabolique. L'intensité et la périodicité des contraintes imposées auront également une influence sur le métabolisme chondrocytaire (Gilbert & Blain, 2018; Han et al., 2011; Stoltz et al., 2005). Le remodelage adaptatif de la MEC suit donc un processus rétro-actif en réponse aux contraintes mécaniques cycliques (Figure 4).

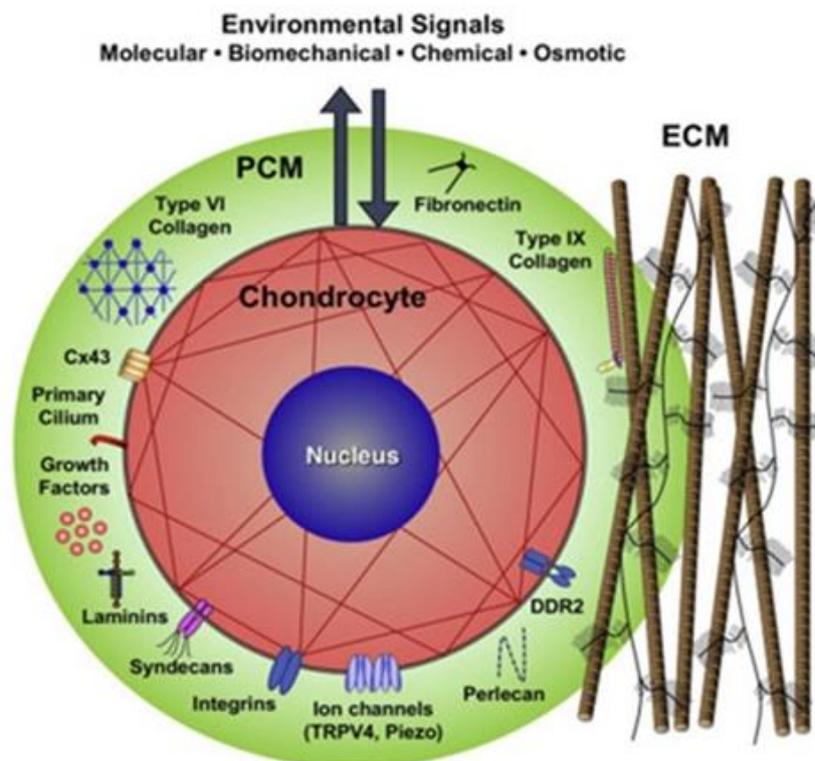
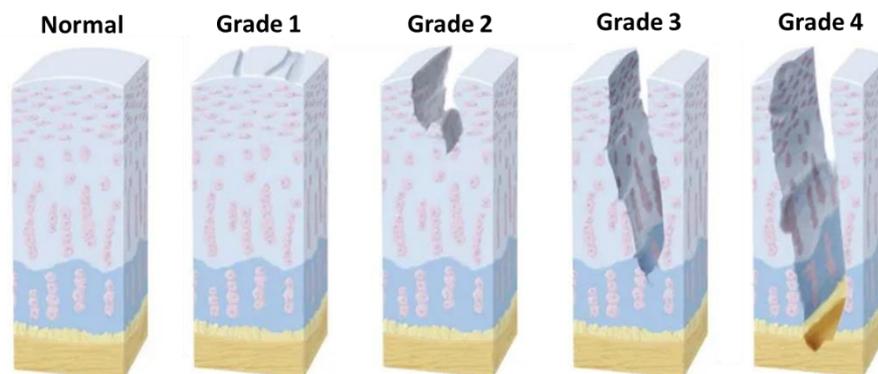


Figure 4. Schéma des acteurs principaux de la matrice péri-cellulaire (PCM) du chondrocyte impliqués dans la méchanotransduction (Xu et al., 2022).

## 1.6. Altération du cartilage

Avec le vieillissement, des modifications qualitatives et quantitatives de la MEC altèrent les propriétés viscoélastiques du cartilage alors moins résistant face aux contraintes mécaniques. Nonobstant, des traumatismes importants associés à des chocs à répétition peuvent également conduire à une usure prématurée du cartilage pouvant causer des lésions irréversibles jusqu'à impacter la microstructure de l'os sous-chondral. L'emplacement, la profondeur, la taille, la surface des défauts ainsi que l'état du cartilage environnant sont les principaux critères de classification des dommages du cartilage décrits par l'ICRS (ang. International Cartilage Regeneration & Joint Preservation Society) (Figure 5) (Baumann et al., 2019; Themes, 2019). Or le cartilage est un tissu dont les capacités de régénération sont limitées. Les composants principaux de la MEC présentent un renouvellement faible, la demi-vie des agrécans varie de 300 à 800 jours contre une centaine d'années pour le collagène (Freyria & Mallein-Gerin, 2012). L'absence de vascularisation restreint l'apport de nutriments et de cellules progénitrices. De plus, les chondrocytes ne représentant qu'une faible proportion du cartilage et étant répartis de manière inhomogène dans les différentes couches, la régénération de la MEC est inégale en fonction de la couche du cartilage (Baei et al., 2023; Zhao et al., 2020). Bien que l'altération du cartilage puisse conduire à la formation d'un fibrocartilage cicatriciel, la dégénérescence en arthrose secondaire, dite post-traumatique (Armiento et al., 2019) est la complication la plus sévère en l'absence de réparation. A l'inverse de l'arthrose primaire idiopathique qui présente une prévalence pour les personnes de plus de 60 ans, l'arthrose post-traumatique affecte davantage des populations jeunes, souvent



**Figure 5. Classification ICRS. Grade 1 : lésions superficielles ; Grade 2 : les lésions atteignent jusqu'à 50 % de la profondeur du cartilage ; Grade 3 : les lésions atteignent plus de 50 % de la profondeur du cartilage, allant jusqu'à l'os ; Grade 4 : les lésions touchent l'os sous chondral (d'après Themes, 2019).**

sportives. Elle représente 12 % des cas d'arthrose (Krishnan & Grodzinsky, 2018) et peut conduire à terme à une incapacité fonctionnelle. La restauration du cartilage en amont est donc nécessaire.

## 2. Régénération du cartilage

Le diagnostic de l'atteinte cartilagineuse est posé *via* un examen clinique et l'utilisation de techniques d'imageries (radiographie, IRM, arthroscanner, arthro-IRM) (Laredo, 2006). Le choix du traitement employé dépend alors du patient (âge, poids, niveau d'activité...) et du degré de sévérité de la lésion. Il est généralement de nature médicale et/ou chirurgicale, à visée palliative ou curative.

### 2.1. Les stratégies actuelles

#### 2.1.1. Les traitements palliatifs

Dans un contexte palliatif, les solutions médicamenteuses sont utilisées en première voie d'intention. Les anti-arthrosiques d'action rapide que sont les traitements antalgiques classiques (du paracétamol aux dérivés d'opiacés et morphiniques), ainsi que les anti-inflammatoires non stéroïdiens et corticoïdes soulagent rapidement le patient et diminuent l'inflammation. Pour une efficacité à plus long terme les anti-arthrosiques d'action lente (glucosamine, chondroïtine sulfate, acide hyaluronique...) par voie orale ou intra-articulaire (visco-supplémentation) font leur preuve bien que leurs utilisations ne soient pas vouées à régénérer le cartilage altéré mais à ralentir sa destruction. D'un point de vue chirurgical, les lavages articulaires combinés au débridement du cartilage (retirer le tissu altéré) restent une solution mini-invasive de substitution afin d'assainir de manière temporaire l'articulation altérée et sont couramment employés en complément d'une technique réparatrice (Clouet et al., 2009; Mueller & Tuan, 2011; Totlis et al., 2021; Wei & Dai, 2021).

#### 2.1.2. Les traitements curatifs

En l'absence de réparation durable, la destruction du cartilage lésé est inéluctable. En France, les techniques curatives reposent principalement sur le recrutement local de cellules sous-chondrales par stimulation de la moelle osseuse (perforation de Pridie, microfracture ou dérivés tels que la chondrogenèse autologue induite par matrice (AMIC)) ou bien à partir de tissus cartilagineux sains greffés au niveau du site lésé. Dans ce deuxième cas, le tissu peut

être issu d'un donneur (allogreffe massive), ou bien du patient lui-même (autogreffe, généralement par mosaïcplastie). Dérivé de l'autogreffe, l'implantation autologue de chondrocytes (ang. autologous chondrocyte implantation, ACI), également très employée en tant que thérapie innovante, vise à augmenter localement la densité chondrocytaire afin de favoriser une auto-régénération par la sécrétion de MEC. Isolés par arthroscopie, des chondrocytes amplifiés *in vitro* sont ainsi réintroduits *in fine* en présence d'un patch périosté ou d'une membrane de collagène (ACI de 1<sup>ère</sup> et 2<sup>e</sup> génération) (Bugbee et al., 2016; Clouet et al., 2009; Gao et al., 2019; Inderhaug & Solheim, 2019; Minas et al., 2016; Müller & Kohn, 1999; Song & Park, 2019).

Bien que ces différentes techniques chirurgicales permettent une amélioration des performances fonctionnelles et de l'état du cartilage pendant quelques années (5 à 15 ans en moyenne), le processus est partiellement curatif, davantage substitutif, posant la question de sa durabilité. En effet, ces traitements conduisent souvent à la formation d'un fibrocartilage présentant des propriétés biomécaniques inférieures, une composition biochimique différente et une intégration partielle au cartilage environnant. De plus, la plupart de ces techniques requièrent la réalisation de plusieurs actes chirurgicaux, pour le prélèvement des cellules/tissus puis pour une réintroduction *in fine*, pouvant conduire à une morbidité au niveau du site donneur sain (Clouet et al., 2009; Mueller & Tuan, 2011; Nukavarapu & Dorcemus, 2013; Stampoultzis et al., 2021; Wei & Dai, 2021).

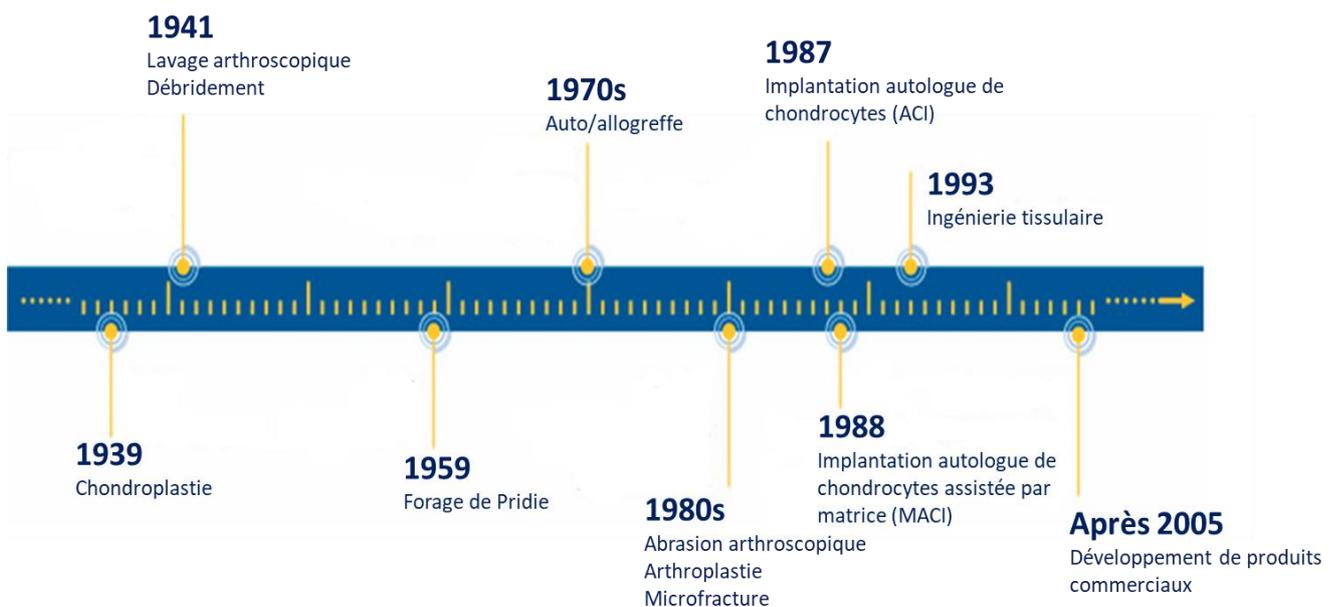


Figure 6. Chronologie des traitements chirurgicaux du cartilage (d'après Wei & Dai, 2021).

### 2.1.3. La médecine régénératrice : le concept de l'ingénierie tissulaire

Plus récemment, des matrices 3D hydratées ont été utilisées comme support des cellules injectées en ACI. On parle d'implantation autologue de chondrocytes assistée par matrice (ang. matrix-assisted chondrocyte implantation, MACI) ou bien d'ACI de 3<sup>e</sup> génération. Cette technique montre des résultats supérieurs à long terme par rapport aux ACI de 1<sup>ère</sup> et 2<sup>e</sup> génération (Stampoultzis et al., 2021) en améliorant la prolifération, et le phénotype chondrocytaire (Wei & Dai, 2021). Des produits commerciaux destinés à la réparation cartilagineuse ont été développés : CHONDROSEA® (Theracell), CARTIPATCH® (TBF), HYALOFAST® (Anika), NOVOCART 3D® (TETEC)... L'utilisation d'une matrice comme échafaudage pour les cellules est donc une stratégie de régénération efficace. Ainsi, combinant les principes de l'ingénierie des matériaux et de la biologie pour la régénération fonctionnelle, l'entretien et l'amélioration des tissus endommagés, l'ingénierie tissulaire est la stratégie incontournable pour la restauration du cartilage. Elle repose sur l'utilisation de trois acteurs principaux : des cellules et des morphogènes associés à un biomatériau (Figure 7) (Bove et al., 2021; Doblado et al., 2021; Esdaille et al., 2021; Lesage et al., 2022; Olson et al., 2011).

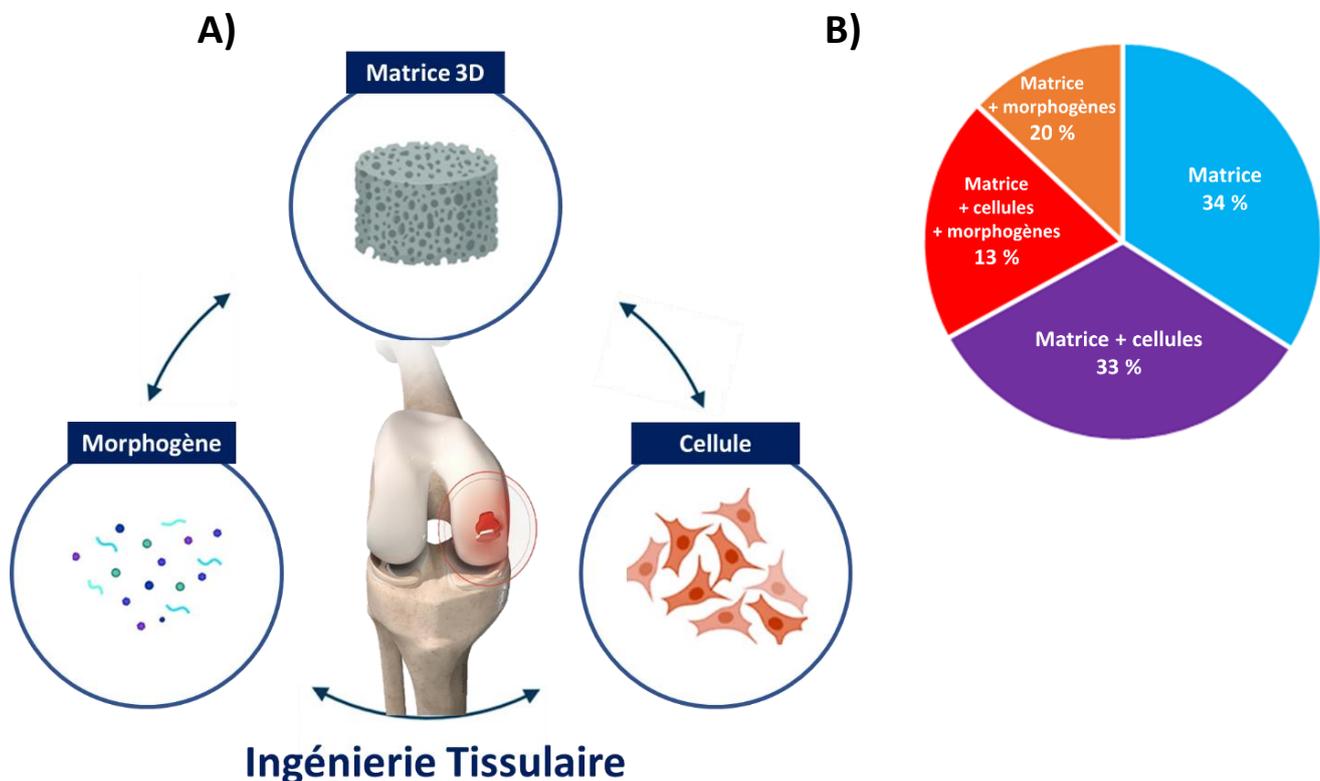


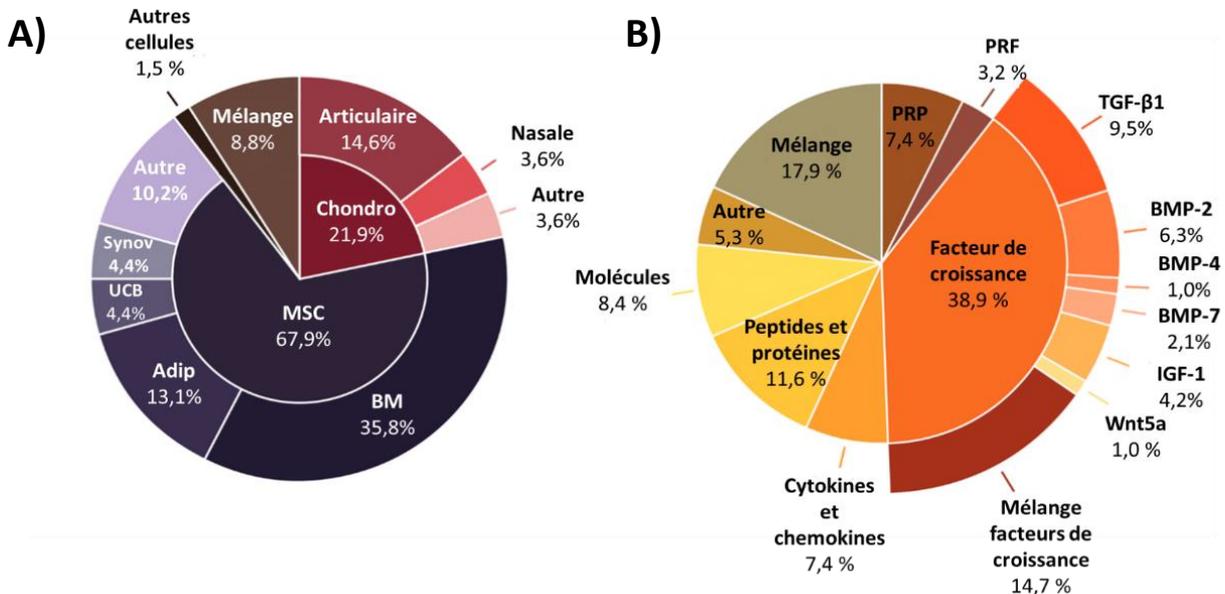
Figure 7. A) Les principaux acteurs de l'ingénierie tissulaire (inspiré de Doblado et al., 2021). B) Proportion des stratégies utilisant des biomatériaux seuls ou associés à des cellules et/ou des morphogènes (d'après Lesage et al., 2022).

### 2.1.3.1. Les cellules

Les cellules sélectionnées sont majoritairement des chondrocytes provenant du cartilage articulaire/nasal/costal ou de cellules souches dont leur capacité à proliférer et leur multipotence sont des caractéristiques attrayantes. Les cellules souches peuvent être d'origine mésenchymateuse (ang. mesenchymal stem cells, MSCs) (moelle osseuse, tissu adipeux, placenta...), de nature embryonnaire (ang. embrionic stem cells, ESCs) ou encore pluripotentes induites (ang. induced pluripotent stem cells, iPSCs) (Zhao et al., 2020) (Figure 8.A).

### 2.1.3.2. Les morphogènes

Parmi les molécules biologiquement actives, les facteurs de croissance induisent, maintiennent et améliorent le phénotype chondrocytaire ainsi que l'ensemble des processus biologiques dont la prolifération et la différenciation cellulaire. C'est le cas des facteurs de croissance TGF- $\beta$  (ang. transforming growth factors), des BMP (ang. bone morphogenetic protein), des CDMP (ang. cartilage derived morphogenetic protein), des GDF (ang. growth differentiation factor) et des IGF-1 (ang. insulin-like growth factor-1) (Baumann et al., 2019; Clouet et al., 2009; Nukavarapu & Dorcemus, 2013). D'autres molécules actives sont également utilisées (Figure 8.B).



**Figure 8. A) Types de cellules utilisées pour la régénération du cartilage ou étendue à la lésion ostéochondrale : chondrocytes (Chondro), cellules souches mésenchymateuses (MSC) ou cellules dérivées de MSC de la moelle osseuse (BM), du tissu adipeux (Adip), du sang du cordon ombilical (UCB), des tissus synoviaux (Synov) ou d'autres sources, ainsi que d'autres cellules ou de mélange de cellules. B) Molécules bioactives utilisées pour la régénération du cartilage ou étendue à la lésion ostéochondrale : le plasma riche en plaquettes (PRP), fibrine riche en plaquettes (PRF), TGF- $\beta$ 1, BMP-2,-4,-7, IGF-1, membre de la famille des Wnt (Wnt5a), mélange de facteurs de croissance ou d'autres types de molécules bioactives (d'après Lesage et al., 2022).**

### 2.1.3.3. Les biomatériaux

Associant l'ensemble de ces acteurs (cellules/facteurs de croissance), l'élaboration d'un biomatériau bioactif hybride est un acte complexe qui suppose la prise en compte de paramètres multidisciplinaires (Figure 9). Selon la définition établie en 1986 lors de la conférence dite du « consensus » de la Société européenne pour les biomatériaux à Chester, les biomatériaux sont « conçus pour interagir avec les systèmes biologiques, qu'ils participent à la constitution d'un dispositif à visée diagnostique ou à celui d'un substitut de tissu » (Williams, 1987). Destiné à être implanté dans l'organisme, la biocompatibilité du biomatériau, c'est-à-dire l'absence de tout effet indésirable, est indispensable pour son utilisation clinique. La stérilisation par conséquent obligatoire, ne doit en rien altérer les propriétés physico-chimiques de l'armature tout en répondant aux normes hospitalières. La conformité immunologique assurée, la fonctionnalité des biomatériaux réside en l'élaboration d'une construction sur-mesure répondant aux enjeux biologiques et mécaniques relatifs au contexte tissulaire d'implantation. Autrement dit, la matrice idéale doit être cohésive, en elle-même et vis-à-vis du défaut articulaire. Elle s'avère un minimum résistante au contexte biomécanique du cartilage (contraintes) et déformable, propice au développement (adhésion, prolifération, différenciation) des cellules qu'elle contient potentiellement.

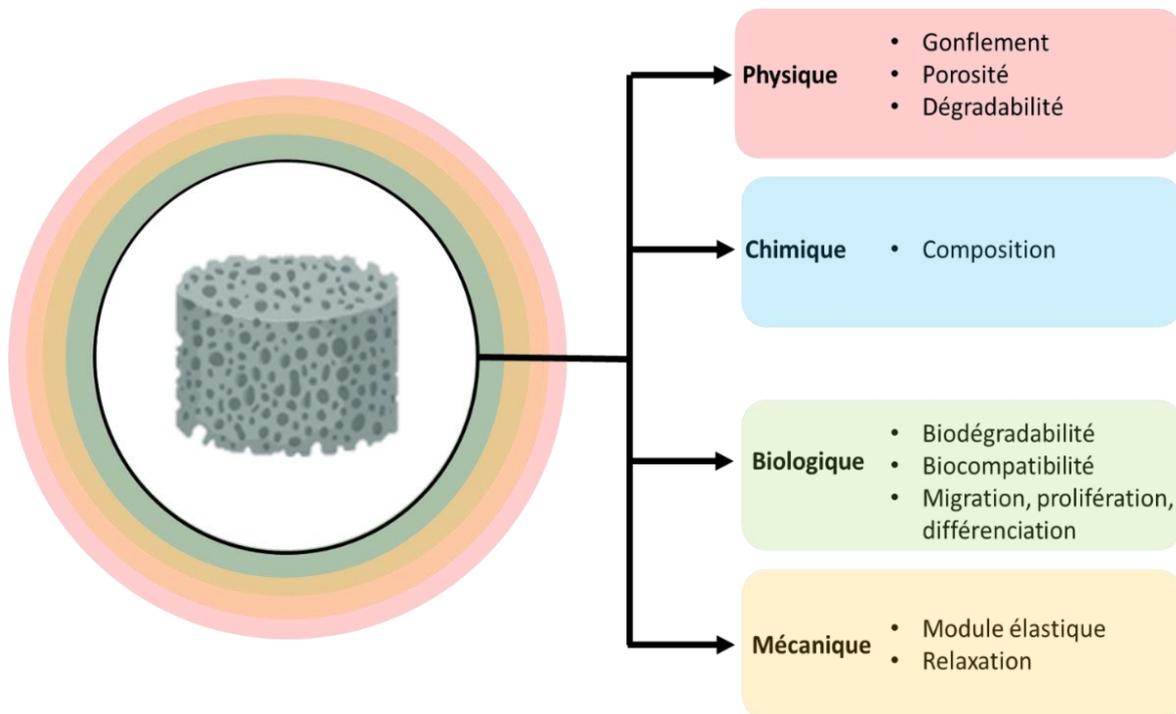


Figure 9. Caractéristiques recherchées pour développer une matrice 3D en ingénierie tissulaire (inspiré de Chauhan et al., 2022).

La porosité du biomatériau doit permettre à la fois le flux entrant de nutriments et l'élimination des déchets. Enfin, la matrice 3D n'étant qu'un substitut de tissu destinée à être remplacée par la MEC sécrétée par les cellules implantées, sa dégradabilité contrôlée dans le temps est nécessaire (Chauhan et al., 2022; Fan et al., 2021; Tran et al., 2020).

Ainsi, parmi les biomatériaux disponibles pour la régénération du cartilage (céramiques, éponges, nanofibres), leurs similitudes structurelles et fonctionnelles avec la MEC font des hydrogels les candidats idéaux répondant à l'ensemble des critères d'une matrice 3D destinée à l'ingénierie tissulaire du cartilage.

### 3. Les hydrogels

Les hydrogels sont des réseaux 3D de polymères réticulés (physiquement ou chimiquement) fortement hydratés dont l'eau constitue 50 à 90 % du poids total (W. Zhang et al., 2023). Les hydrogels peuvent être issus de l'association d'un ou plusieurs polymères (hydrogels composites) pour former des réseaux uniques ou interpénétrés (Mahinroosta et al., 2018).

Pour des applications en ingénierie tissulaire, l'hydrogel doit à la fois posséder des propriétés biologiques et mécaniques qui dépendent essentiellement de la nature des constituants de l'hydrogel et des interactions générées à l'origine des nœuds de réticulation du réseau (Lagneau et al., 2023).

#### 3.1. Nature du réseau

La formation d'un hydrogel repose sur l'établissement de zones de jonction entre les polymères constitutifs d'un réseau *in fine* fortement hydraté. Ainsi, deux types de réseaux formés existent (Alavarse et al., 2022; Bustamante-Torres et al., 2021; Flégeau et al., 2017).

Les hydrogels chimiques sont dits « irréversibles » car les nœuds de réticulation sont générés par des liaisons covalentes entre les chaînes de polymères. Ces liaisons sont donc permanentes et leur nombre ne varie pas en fonction des conditions extérieures (contraintes mécaniques, température, pH). Un cas particulier concerne les hydrogels aux réseaux covalents adaptables qui se caractérisent par le caractère dynamique des liaisons chimiques (Figure 10.A). Ces hydrogels dynamiques sont issus de réactions « réversibles » d'additions (Diels-Alder, base de Schiff, hydrazone, oxime, boronate) ou d'échanges (disulfide, allyl sulfide,

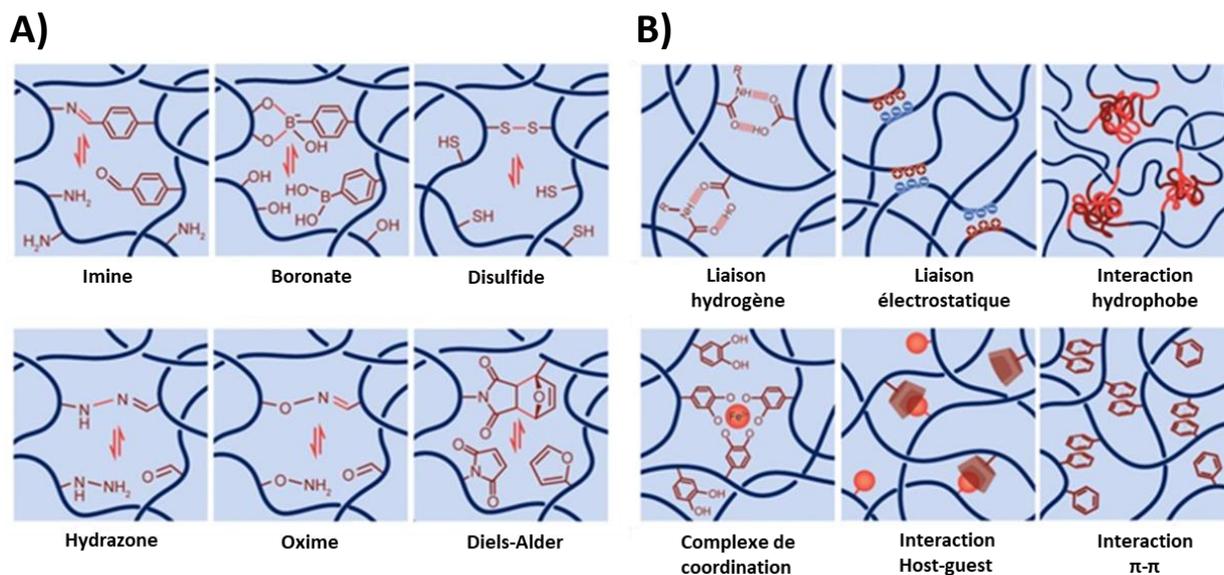


Figure 10. A) Liaisons covalentes dynamiques réversibles. B) Liaisons physiques (d'après Xiao et al., 2022).

thioester) permettant la réorganisation du réseau (Abdi et al., 2020; S. Tang et al., 2021). Contrairement aux hydrogels chimiques, la cohésion du réseau 3D des gels physiques est assurée par des interactions non-covalentes, faibles de types van der Waals, hydrophobes, liaisons hydrogène,  $\pi$ -stacking ou encore ioniques (Figure 10.B). Les hydrogels physiques sont dits « réversibles » car il est possible de moduler leur transition de phase « sol/gel » et « gel/sol » par modification des conditions extérieures (ex : température, pH, force ionique) (Tang et al., 2020; Xiao et al., 2022).

### 3.2. Nature des constituants du réseau

Les hydrogels peuvent être formés à partir de polymères synthétiques ou de polymères naturels selon les propriétés finales visées (nature des nœuds de réticulation, propriétés mécaniques, biologiques, compatibilité, dégradabilité...).

#### 3.2.1. Polymères synthétiques

En 1960, Wichterle et Lím élaborent le tout premier hydrogel synthétique à base de poly(2-hydroxyéthylméthacrylate) (PHEMA) (Wichterle & Lím, 1960). Depuis, de nombreux polymères synthétiques sont à la base d'hydrogels destinés à l'ingénierie tissulaire en raison de leurs propriétés physico-chimiques modulables de manière reproductible. C'est le cas, par exemple, de l'alcool polyvinylique (PVA) (Li et al., 2023), du poly(éthylène glycol) (PEG) ou des dérivés d'acide acrylique/méthacrylique (Mahinroosta et al., 2018). Ils sont généralement associés à d'autres polymères synthétiques pour leur caractère biocompatible et

biodégradable : l'acide polylactique (PLA) (Narayanan et al., 2016), l'acide polyglycolique (PGA), l'acide poly(lactique-co-glycolique) (PLGA) (Kang et al., 2006) ou encore le poly(caprolactone) (PCL) (Naahidi et al., 2017). Malgré tout, leur cinétique de dégradation, de même que leur manque d'affinité pour le tissu sont les inconvénients principaux à leur utilisation. Développer des matrices de composition similaire à la MEC est à privilégier.

### 3.2.2. Polymères naturels : cas des polysaccharides

La matrice extracellulaire est essentiellement de composition glycoprotéique de par le collagène et les protéoglycanes qui la constituent. Les biomatériaux testés pour l'ingénierie tissulaire du cartilage sont ainsi généralement de nature comparable : protéique ou bien polysaccharidique. Les hydrogels dérivés de ces macromolécules naturelles ont l'avantage de présenter une bonne dégradabilité, biocompatibilité et d'être ainsi faiblement cytotoxiques. A l'image de la MEC, les polysaccharides sont particulièrement prometteurs pour leurs propriétés biologiques et physico-chimiques naturelles (Fan et al., 2021; Flégeau et al., 2017; Raina et al., 2022; Yang et al., 2022). Dans le cadre de ce mémoire, nous nous intéresserons exclusivement aux polysaccharides.

#### 3.2.2.1. Généralités sur les polysaccharides

Les polysaccharides sont des polymères naturels synthétisés par les plantes (ex : cellulose, pectines, xyloglucane), les algues (ex : alginates, fucanes, carraghénanes), les animaux (ex : GAG, chitosane) et aussi les microorganismes, en particulier les bactéries (ex : xanthane, gellane, dextrane, cellulose, acide hyaluronique). Ils se composent de résidus osidiques (monosaccharides) liés entre eux par des liaisons glycosidiques. Les polysaccharides composés d'un seul type d'ose sont appelés les homopolysaccharides, tels que la cellulose ou le dextrane, composés uniquement de résidus glucoses. En revanche, la majorité des polysaccharides sont des hétéropolysaccharides composés d'oses différents. Très souvent, ces oses sont substitués par des groupements organiques (acétyle, acide pyruvique) ou inorganiques (sulfate, phosphate, lactate, méthyle). La complexité structurale des polysaccharides résulte donc non seulement de la diversité en monosaccharides (plus de 150 oses (Symbol Nomenclature for Glycans (SNFG) - NCBI) mais aussi de leur distribution sur la chaîne polysaccharidique (unité répétitive). Les polysaccharides se caractérisent ainsi par des structures linéaires (ex : cellulose, homogalacturonane, alginate, GAG) ou ramifiées (ex : dextrane, xanthane), impliquant des liaisons osidiques en configuration  $\alpha$  et/ou  $\beta$ .

Biodégradables, peu immunogènes, présentant une bonne biocompatibilité, les polysaccharides sont généralement considérés comme sûrs (ang. generally recognized as safe, GRAS) (Chaudhary et al., 2022; El Khadem, 2003; Fan et al., 2021; Hunziker, 2002; Mohammed et al., 2021; Varki et al., 2015). Pour ces raisons, ils ont été formulés sous forme d'hydrogels pour l'ingénierie tissulaire du cartilage.

### 3.2.2.2. Hydrogels à base de polysaccharides pour l'ingénierie tissulaire

La cellulose, homopolymère de glucoses liés par des liaisons  $\beta$ -1,4, est un polysaccharide structurant la paroi des plantes. Dérivé de la cellulose, l'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC) peut être silanisé par greffage avec des groupements silanols (Si-HPMC) pour obtenir un polymère biocompatible, biodégradable et capable de gélifier à pH physiologique ( $\sim 7$ ). Les chondrocytesensemencés dans des gels de Si-HPMC sont viables, prolifèrent et sécrètent la MEC du cartilage composée du collagène de type II et des agrécanes (Vinatier et al., 2005). La viabilité des cellules stromales humaines dérivées du tissu adipeuxensemencées dans des microgels de Si-HPMC est de 70 % après 14 jours *in vitro* (Nativel et al., 2018).

Le dextrane est un polysaccharide d'origine microbienne constitué de glucoses liés par des liaisons  $\alpha$ -1,6 ainsi que des ramifications établies en  $\alpha$ -1,3 ou  $\alpha$ -1,4. Outre les applications industrielles en tant qu'agent texturant notamment, le dextrane est également utilisé dans le domaine médical. Wang et al. (2017) démontre ainsi que des hydrogels de dextrane fonctionnalisés supportent la viabilité de chondrocytes ainsi que la sécrétion des composants de la MEC.

Issus d'algues brunes ou de bactéries (ex : *Azobacter...*), les alginates, polysaccharides polyanioniques linéaires composés de blocs de monomères d'acide  $\beta$ -D-mannuronique et d'acide  $\alpha$ -L-guluronique, sont capables de gélifier en présence de cations divalents, tels que  $\text{Ca}^{2+}$ , selon le modèle du « egg box » (Grant et al., 1973). Approuvés par l'administration américaine des denrées alimentaires et des médicaments (ang. Food and Drug Administration, FDA), les propriétés physico-chimiques de l'hydrogel d'alginate dépendent de sa composition et de la concentration des solutions d'alginate et de calcium utilisées. Des concentrations d'alginate de 0,5 à 4 % (m/v) et des concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$  de 15 à 144 mM semblent adaptées à la régénération du cartilage (W. Liu et al., 2022).

Polymère biodégradable et biocompatible aux propriétés bactériostatiques et antifongiques, le chitosane, est également intéressant en ingénierie tissulaire pour ses propriétés uniques. Ce dérivé désacétylé de la chitine (composant de l'exosquelette des insectes et crustacés) est un polysaccharide polycationique linéaire, composé de D-glucosamine liée en  $\beta$ -1,4 et de N-acétyl-D-glucosamine, qui présente des propriétés mucoadhésives utiles pour l'ancrage de l'hydrogel au tissu existant (Kim et al., 2023; Xiao et al., 2022).

Les GAG, composants naturels et indispensables de la MEC, parmi lesquels la chondroïtine sulfate ou encore l'acide hyaluronique, constituent les éléments polysaccharidiques majoritaires pour la conception d'hydrogels mimétiques (Baei et al., 2023; Celikkin et al., 2017; Köwitsch et al., 2018; Menezes et al., 2023; Muzzarelli et al., 2012; Sodhi & Panitch, 2020). Plusieurs hydrogels à base d'acide hyaluronique ont été développés (Burdick & Prestwich, 2011) : soit par modification chimique impliquant le greffage de groupements chimiques (ex : silanols (Lee et al., 2019), méthacrylates (Spearman et al., 2020), dérivés boroniques (Figueiredo et al., 2020), aldéhydes (Šedová et al., 2019)...) ou de polymères synthétiques (ex : polyéthylène glycol (PEG) (Ilochonwu et al., 2022)), soit *via* des réseaux interpénétrés formés avec des protéines (ex : collagène (Chen et al., 2020), gélatine (Dromel et al., 2021)) ou d'autres polysaccharides (ex : alginate (Chung et al., 2011), chitosane (Hu et al., 2021)).

Or, les GAG étant généralement extraits de tissus animaux (bœuf, porc, volaille, requin...), les variations physico-chimiques observées en fonction des espèces et des individus rendent difficile la standardisation de la production de ces polysaccharides issus de cette source (Yamada et al., 2011). De plus, l'extraction des tissus et le risque de leur contamination par d'autres polysaccharides endogènes ou par des protéines animales comme les prions ou des agents pathogènes non conventionnels, ou encore par des virus, sont également des points bloquants. Face à ces limitations, les recommandations actuelles de la FDA tendent à favoriser d'autres origines pour des applications en santé (Badri et al., 2018; DeAngelis, 2012). La synthèse chimique des polysaccharides tels que les GAG est impossible, seuls des oligosaccharides peuvent être synthétisés (ex : le motif pentasaccharidique d'héparine, Arixtra (Petitou & van Boeckel, 2004)). La synthèse nécessite de nombreuses étapes notamment de protection et de déprotection régiosélectives, limitant l'intérêt de cette

méthode aux dérivés oligosaccharidiques de petite taille (Mende et al., 2016). La biosynthèse de polysaccharides par des microorganismes tels que les bactéries est une alternative intéressante, la production contrôlée en fermenteur répondant aux besoins de l'ingénierie tissulaire : l'obtention de lots de qualité constante à haute pureté en peu de temps et à fort rendement potentiel (Kang et al., 2018; Liu et al., 2023). Parmi les polysaccharides produits par cette voie (ex : xanthane, dextrane, gellane, curdlane, cellulose, alginate...), les GAG sont particulièrement intéressants pour cette application (Tableau IV). L'acide hyaluronique biotechnologique (produit par *Streptococcus* ou *Bacillus*) a largement substitué l'extraction historique à partir des tissus de crêtes de coq (Y. Zhang et al., 2023). D'autres précurseurs non sulfatés de GAG sont également obtenus par fermentation. C'est le cas de l'héparosane produit par *Escherichia coli* K5 (Ly et al., 2011), de la chondroïtine issue d'*Escherichia coli* K4 (Cimini et al., 2010). Cependant, l'obtention des dérivés sulfatés finaux (héparane sulfate, chondroïtine sulfate) est encore un défi. La sulfatation par des approches biotechnologiques demande l'utilisation d'enzymes de post-polymérisation (sulfotransférases, épiméras) qui dans les microorganismes ne sont pas encore bien connues.

Tableau IV. Exemples de bactéries productrices d'hétéropolysaccharides GAG/GAG-mimétiques

Hétéropolysaccharides bactériens GAG/GAG-mimétiques	Souches	Références
<b>Hyaluronane</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Streptococcus zooepidemicus</i></li> <li>• <i>Bacillus subtilis</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bracke &amp; Thacker (1985)</li> <li>• Kim et al. (1996)</li> <li>• Chong et al. (2005)</li> <li>• Murano et al. (2011)</li> <li>• DeAngelis (2012)</li> </ul>
<b>Chondroïtine</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Escherichia coli</i> K4</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Schiraldi et al. (2010)</li> <li>• Cimini et al. (2013)</li> </ul>
<b>Héparosane</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Escherichia coli</i> K5</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Colas et al. (2006)</li> <li>• Suwan et al. (2012)</li> </ul>
<b>EPS marins</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Alteromonas</i> sp.</li> <li>• <i>Vibrio</i> sp.</li> <li>• <i>Pseudoalteromonas</i> sp.</li> <li>• <i>Shewanella</i> sp.</li> <li>• <i>Enterobacter</i> sp.</li> <li>• <i>Pseudomonas</i> sp.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Raguénès et al. (1997)</li> <li>• Deming (1998)</li> <li>• Guezennec (2002)</li> <li>• Nichols et al. (2005)</li> <li>• Laurienzo (2010)</li> <li>• Finore et al. (2014)</li> </ul>

La sulfatation des polysaccharides est encore majoritairement réalisée par une étape de sulfatation chimique (Collic-Jouault et al., 2023). Ainsi, la recherche de nouveaux microorganismes capables de sécréter des molécules bioactives inédites présentant à l'état naturel les propriétés similaires aux GAG est une voie à explorer.

### 3.2.2.3. Les polysaccharides bactériens d'origine marine

Les mers et océans sont des sources d'organismes producteurs de polysaccharides divers. Les algues (alginate, agar, agarose, carraghénane, fucane...) et les invertébrés marins (chitine, chitosane, GAG) sont généralement cités. Il existe cependant de nombreux microorganismes (bactéries Gram-positives et Gram-négatives, archées, champignons et certaines microalgues) capables de sécréter des polysaccharides originaux et de se développer dans des environnements tout aussi insolites tels que les suintements froids, les sources chaudes côtières, les régions polaires, les étangs hypersalins (Finore et al., 2014; Laurienzo, 2010).

A ce titre, les sources hydrothermales océaniques profondes, longtemps inexploitées, présentent une diversité d'organismes atypiques et notamment de bactéries marines à l'image de l'environnement dans lequel elles se développent (Deming, 1998; Guezennec, 2002) (Tableau IV). Pour les bactéries, la survie dans un tel milieu suppose la mise en place de nombreuses stratégies afin de subvenir à leurs besoins primaires. L'une de ces approches est la production de métabolites spécialisés particuliers en adaptation aux conditions extrêmes de température, de pression et à la présence de métaux toxiques. Ainsi, certaines bactéries ont développé la capacité à sécréter des polymères extracellulaires multifonctionnels nommés exopolysaccharides (EPS). Ces polymères osidiques généralement de haute masse molaire moyenne ( $> 10^6$  g/mol) présentent une composition chimique complexe responsable de propriétés biologiques et physico-chimiques uniques. Ces EPS développent en solution une certaine viscosité participant à la formation d'une matrice amorphe protectrice, un biofilm, efficace face aux stress environnementaux que représentent l'ensemble des facteurs abiotiques drastiques des sites hydrothermaux, mais aussi à des fins de communication entre bactéries. L'exploration de la biodiversité hydrothermale a permis d'isoler et d'identifier quatre communautés majeures de bactéries aérobies mésophiles productrices en condition de laboratoire d'EPS à intérêt biotechnologique : les *Pseudoalteromonas*, les *Alteromonas*, les *Vibrio* et les *Shewanella*. La composition et la

structure de l'EPS dépendent du genre bactérien dont il est issu (Delbarre-Ladrat et al., 2014). En effet, des EPS ramifiés riches en ose neutre, en acide uronique et souvent substitués (pyruvate, lactate, sulfate) sont caractéristiques des genres bactériens *Alteromonas* (ex : HYD1545 (Vincent et al., 1994), HYD1644 (Bozzi et al., 1996; Dubreucq et al., 1996), ST716 (Rougeaux et al., 1998), HYD657 (Le Costaouëc et al., 2012) (deepsane)), et *Pseudoalteromonas* (ex : HYD721 (Rougeaux et al., 1999a)...). Les bactéries du genre *Vibrio* synthétisent généralement des EPS linéaires non-sulfatés composés d'acide uroniques et d'hexosamines. C'est le cas par exemple de l'EPS nommé diabolicane (ou EPS HE800) produit par la bactérie *Vibrio diabolicus* (Rougeaux et al., 1999b).

#### 3.2.2.4. Infernane

En 1991, à bord du Nautille (Figure 11.A), dans la région du bassin de Guaymas (Figure 11.B), la campagne océanographique Guaynaut a permis d'isoler la souche *Alteromonas infernus* autrement appelée GY785, prélevée parmi une population de vers tubicoles *Riftia pachyptila* (Figure 11.C). Le caractère non pathogène de cette souche a par la suite été confirmé par l'Institut Pasteur. En laboratoire, cette bactérie Gram-négative mésophile, aérobie stricte et hétérotrophe se développe à une température comprise entre 25 °C et 35 °C. La production d'EPS débute à la fin de la phase exponentielle et se termine en phase stationnaire pour un rendement de récupération de l'ordre de 2-3 g/L. L'EPS GY785, nommé récemment infernane, est un hétéropolysaccharide anionique fortement ramifié. La chaîne principale d'infernane est composée de 3 résidus osidiques, glucose (Glc), acide galacturonique (GalA) et galactose (Gal), liés selon la séquence suivante :  $\rightarrow 4$ )- $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-GalpA-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ . Le résidu GalA est substitué en O-2 par un groupement sulfate et en O-3 par une chaîne latérale composée de deux acides glucuroniques (GlcA) et un Gal selon la séquence :  $\alpha$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-GlcpA-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-GlcpA-(1 $\rightarrow$ . Chaque GlcA est également substitué par un Glc terminal. L'unité répétitive de l'infernane a initialement été décrite sous la forme d'un nonasaccharide monosulfate (Roger et al., 2004). De récentes investigations ont permis de mettre à jour sa structure (Akoumany et al., 2019; Collic-Jouault et al., 2023). La différence repose exclusivement sur la substitution en C-6 du résidu Gal de la chaîne latérale d'un sulfate à la place de Glc (Figure 11.D/E). Cette structure octasaccharidique disulfate sera la forme décrite au cours de ce mémoire.

A)



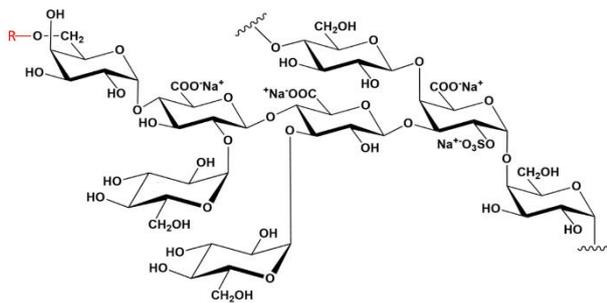
B)



C)



D)



E)

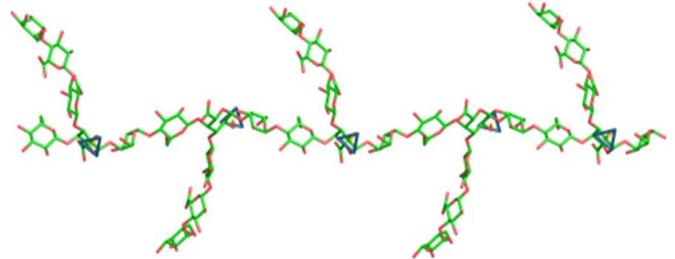


Figure 11. A) Photographie du sous-marin Nautille. B) Repère cartographique de la région du bassin des Guaymas. C) Photographie prise lors de la campagne océanographique Guaynaut de *Riftia pachyptila* à proximité de suintements hydrothermaux profonds (données Ifremer). D) Unité répétitive d'infernane : nonasaccharide monosulfate ( $R = \text{Glc}$ ) ou octasaccharide disulfate ( $R = \text{SO}_3\text{Na}^+$ ) (Roger et al., 2004 ; Collic-Jouault et al., 2023). E) Modélisation de la structure hélicoïdale d'infernane (Makshakova et al., 2022).

De haute masse molaire moyenne sous sa forme native ( $> 10^6$  g/mol), naturellement sulfaté (10 % m/m) et riche en acide uronique, cet EPS présente une composition GAG-mimétique lui octroyant des potentialités en ingénierie tissulaire. Cet EPS biocompatible présente une affinité naturelle vis-à-vis des facteurs de croissance TGF- $\beta$ 1 et BMP-2 impliqués dans la régénération du cartilage et de l'os (Rederstorff et al., 2017). Supplémenté à un hydrogel Si-HPMC, l'infernane favorise l'adhésion cellulaire de chondrocytes cultivés en 2D. La sécrétion de certains composants du microenvironnement (GAG et collagène II) par les chondrocytes articulaires est également améliorée en culture 3D, de même que les propriétés mécaniques de l'hydrogel (Rederstorff et al., 2011b, 2017). À l'image des GAG, les propriétés d'infernane peuvent être modulées en modifiant sa masse molaire ainsi que le degré de sulfatation (Tableau V). En effet, les dérivés d'infernane de différentes tailles peuvent être obtenus par dépolymérisation radicalaire (DR) et aussi sursulfatés (30 à 45 % m/m). Les dérivés de taille intermédiaire, ayant des masses molaires moyennes en poids d'une valeur de 250 000 g/mol présentent des propriétés gélifiantes avec le calcium et peuvent être structurés en microgels pour la délivrance contrôlée de facteurs de croissance (TGF- $\beta$ 1/BMP-2) (Gélébart et al., 2022; Zykwincka et al., 2019). La longueur trop élevée des chaînes de l'EPS natif limite l'établissement de zones de jonction médiées par les ions calcium nécessaires à la gélification ionique (Makshakova et al., 2022). Sous forme de dérivés de taille plus réduite, avec des masses molaires moyennes en poids  $\leq 30$  000 g/mol, et sursulfatés (30 à 45 % m/m), l'affinité d'infernane pour les facteurs de croissance est augmentée. Ajoutés à un milieu de différenciation contenant des facteurs de croissance tels que le TGF- $\beta$ 1, ces derniers dérivés favorisent la différenciation chondrogénique de cellules stromales multipotentes isolées du tissu adipeux humain (Merceron et al., 2012). Les dérivés d'EPS sont également capables d'inhiber la sécrétion de MMP et des cytokines (ex : IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$ ), impliquées dans les processus cataboliques et inflammatoires des tissus conjonctifs (Senni et al., 2015). Outre l'ingénierie tissulaire, les dérivés d'infernane de faibles masses molaires moyennes et hautement sulfatés présentent également des propriétés pro-angiogéniques (Matou et al., 2007), et anticoagulantes comme l'héparine (Jouault et al., 2001). Des effets bénéfiques ont été également décrits en cancérologie (Heymann et al., 2016) et dans le traitement de la mucopolysaccharidose IIIA (maladie de Sanfilippo) (Veraldi et al., 2023).

Tableau V. Applications médicales de l'EPS infernane sous forme native, dépolymérisée par voie radicalaire (DR) et sulfaté (DRS) ou inversement (SDR).

Application	Mw (g/mol)	Sulfate (% m/m)	Description	Référence
Ingénierie tissulaire	1,4 x 10 <sup>6</sup> (natif)	10	Supplémentation (0,67 % m/v) à un hydrogel de Si-HPMC (2 % m/v). <ul style="list-style-type: none"> <li><i>In vitro</i> : effet sur la culture de C28/12 (lignée de chondrocytes humains) et MC3T3-E1 (ligné d'ostéoblastes de souris)</li> <li>- amélioration : adhésion cellulaire (2D), prolifération (3D) et sécrétion de la MEC (3D).</li> <li>• Augmentation du module de compression (5,1 kPa) en comparaison de l'hydrogel Si-HPMC seul (3,0 kPa).</li> </ul>	Rederstorff et al. (2011b)
	15 x 10 <sup>3</sup> (DR) 20 x 10 <sup>3</sup> (DRS)	10 40	Supplémentation du milieu de culture (50 µg/mL). <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>In vitro</i> : effet sur la culture en pellet de hATSCs (ang. human adipose tissue-derived MSCs)</li> <li>- augmentation de la prolifération cellulaire</li> <li>- différenciation chondrogénique</li> <li>- stimulation des voies de signalisation (MAPK).</li> </ul> Interaction avec TGF-β1 : Kd = 3,45 x 10 <sup>-8</sup> M (DR) et 5,5x 10 <sup>-10</sup> M (DRS).	Merceron et al. (2012)
	5-50 x 10 <sup>3</sup> (DRS)	10-40	Supplémentation du milieu de culture (0,1 à 100 µg/mL). <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>In vitro</i> : effet sur la culture 2D de fibroblastes dermiques/gingivaux et de cellules médullaires</li> <li>- amélioration de la prolifération</li> <li>- inhibition des MMP-2 (gélatinase) et MMP-3 (stromélysine).</li> </ul> Inhibition des cytokines inflammatoire (IL-1β et TNF-α).	Senni et al. (2015)
	1,4 x 10 <sup>6</sup> (natif)	10	Supplémentation (0,67 % m/v) à un hydrogel de Si-HPMC (2 % m/v). <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>In vitro</i> : effet sur la culture de RACs (ang. rabbit articular chondrocytes)</li> <li>- maintien le phénotype chondrocytaire (3D) : sécrétion de GAG et collagène.</li> <li>• <i>In vivo</i> : production de MEC (modèle souris : implantation d'un hydrogel Si-HPMC avec 2,5 mg d'EPS, voie sous-cutanée).</li> <li>• Interaction avec TGF-β1 (Kd = 5x10<sup>-7</sup> M) et BMP-2 (Kd = 2,3 x 10<sup>-8</sup> M).</li> </ul>	Rederstorff et al. (2017)
	240-260 x 10 <sup>3</sup> (DR) 31 x 10 <sup>3</sup> (DRS)	10 40	Microgels par microfluidique : gélification DR 3-4 % m/v dans CaCl <sub>2</sub> (4 % m/v) + supplémentés en DRS (50 µg/mL). <ul style="list-style-type: none"> <li>• Relargage et bioactivité (activation voie SMAD) de TGF-β1 et BMP-2 améliorés dans le temps</li> <li>- interaction avec BMP-2 : Kd = 0,63 x 10<sup>-9</sup> M</li> <li>- stimulation par BMP-2 de l'activité ostéogénique de hBM-MSc (ang. human bone-marrow derived mesenchymal stem cells) en culture 2D.</li> </ul>	Zykwinska et al. (2019); Gélébart et al. (2022)
Anti-coagulant	20-30 x 10 <sup>3</sup> (DRS)	40	Supplémentation à un plasma humain pauvre en plaquettes (0 à 100 µg/mL). <i>In vitro</i> : inhibition de la thrombine (test de céphaline activée - IC 50 = 58 µg/mL).	Collic-Jouault et al. (2001)
Angiogenèse	25 x 10 <sup>3</sup> (SDR)	30-45	Supplémentation du milieu de culture (1 à 10 µg/mL). <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>In vitro</i> : effet sur la culture 2D de cellules endothéliales issues de cordon ombilical humain</li> <li>- prolifération induite par FGF-2</li> <li>- prolifération induite par VEGF.</li> </ul>	Matou et al. (2007)
Anti-cancéreux	15 x 10 <sup>3</sup> (DRS)	45	Supplémentation du milieu de culture (25 à 200 µg/mL). <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>In vitro</i> : effet sur la culture 2D de cellules ostéosarcomes (POS-1)</li> <li>- inhibition de l'invasion</li> <li>- inhibition de la migration.</li> <li>• <i>In vivo</i> : inhibition des métastases pulmonaires chez la souris (2-6 mg/kg, voie sous-cutanée).</li> </ul>	Heymann et al. (2016)
Maladie rare Sanfilippo	8 x 10 <sup>3</sup> (DRS)	36	Supplémentation du milieu de culture (100 µg/mL). <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>In vitro</i> : effet sur une culture de fibroblastes « mucopolysaccharidoses » de type IIIA (phénotype de la maladie de Sanfilippo &amp; inhibition de l'héparanase (IC 50 = 10-50 µM ou 12-400 µg/mL).</li> <li>• <i>In vivo</i> : neuroprotection dans un modèle souris « mucopolysaccharidoses » de type IIIA (20 mg/kg, voie intrapéritonéale).</li> </ul>	Veraldi et al. (2023)

### 3.3. Propriétés mécaniques des hydrogels

La nature du réseau des hydrogels influence les propriétés mécaniques de ces matrices. Or, en tant qu'environnement immédiat des cellules, les caractéristiques mécaniques de l'hydrogel joue un rôle clé sur les processus cellulaires (prolifération, différenciation, sécrétion, migration) (Ahearne, 2014; Chaudhuri et al., 2020; Huang et al., 2019; Wu et al., 2022). Les MSC sont ainsi impactées par les caractéristiques de l'hydrogel comme son module élastique, c'est-à-dire sa capacité à se déformer sous l'application d'une contrainte. Les hydrogels plus souples ( $\sim 10$  kPa) favorisent ainsi la prolifération et la différenciation chondrogénique, alors que la différenciation ostéogénique est privilégiée par les hydrogels plus rigides (20 à 40 kPa) (Ahearne, 2014; Janitermi et al., 2022). La capacité sécrétoire des MSC semble également favorisée par des modules d'élasticité plus faibles ( $\leq 5$  kPa) (Lagneau et al., 2023). Les propriétés mécaniques des hydrogels dépendent de multiples paramètres et peuvent donc être modulées avec la concentration en polymère, la densité de réticulation ou la nature du réseau.

La composante temporelle des réponses mécaniques des hydrogels est également à prendre en compte. La nature du réseau polymérique des hydrogels leur octroie des propriétés dissipatives à l'image de la plupart des matrices extracellulaires. La déformation du réseau de l'hydrogel induite par les cellules lors de leurs mouvements entraîne l'application

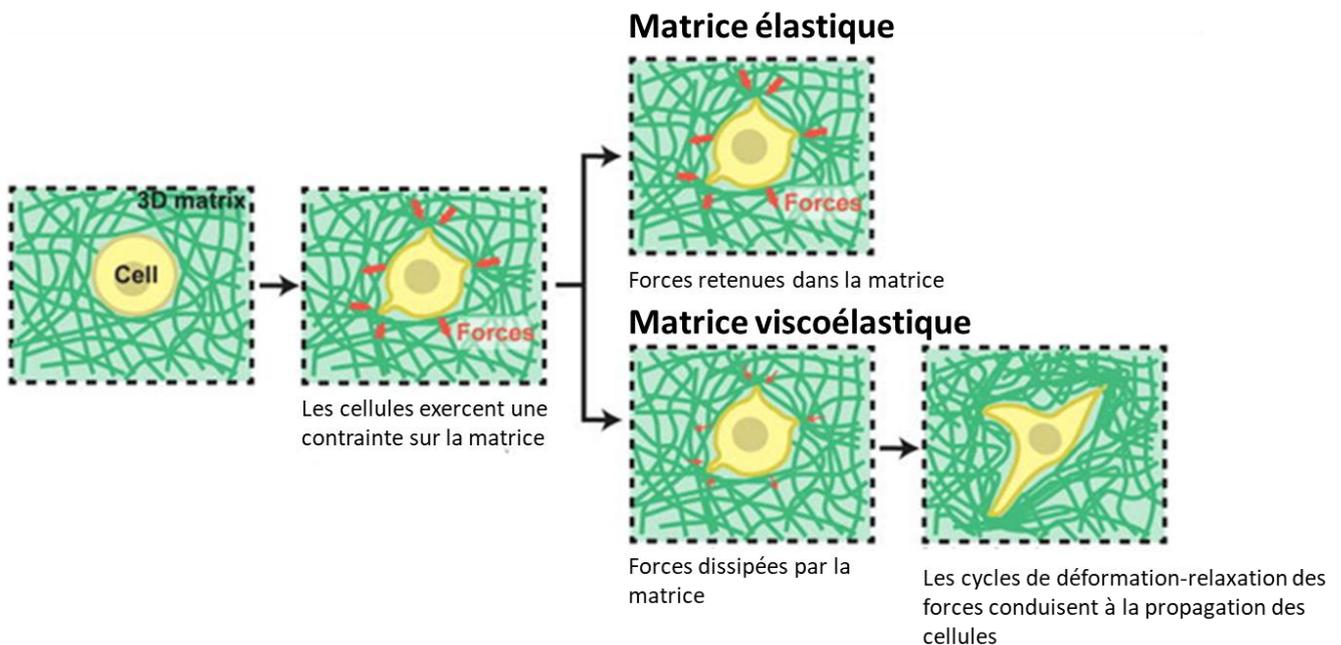


Figure 12. Schéma du comportement des matrices élastiques et viscoélastiques sous la contrainte exercée par des cellules confinées (d'après Chaudhuri et al., 2016).

de contraintes mécaniques sur la matrice qui les entoure. Or, la capacité des hydrogels à dissiper l'énergie emmagasinée par le réseau lors de la déformation (comportement viscoélastique) dans le temps, de sorte que les cellules puissent mécaniquement remodeler la matrice, est essentielle (Figure 12). Des relaxations rapides de l'hydrogel de l'ordre de quelques secondes, généralement observées pour les hydrogels physiques, coïncident avec l'échelle de temps des réponses cellulaires face aux contraintes mécaniques, améliorant la migration et la prolifération cellulaire. En revanche, une matrice purement élastique, ne permettant aucune dissipation mécanique, va exercer de fortes pressions élastiques sur les cellules lors de leur prolifération pouvant provoquer leur mort (Chaudhuri et al., 2016; Zhao et al., 2010).

#### 4. Hydrogels injectables : cas des hydrogels thermosensibles

Dans un contexte d'ingénierie tissulaire, l'implantation par injection de l'hydrogel au niveau du site lésé est souhaitable. A ce titre, les hydrogels injectables aisément administrés réduisent les risques post-opératoires et la période d'hospitalisation vis-à-vis d'autres matrices ou hydrogels conventionnels (Øvrebø et al., 2022).

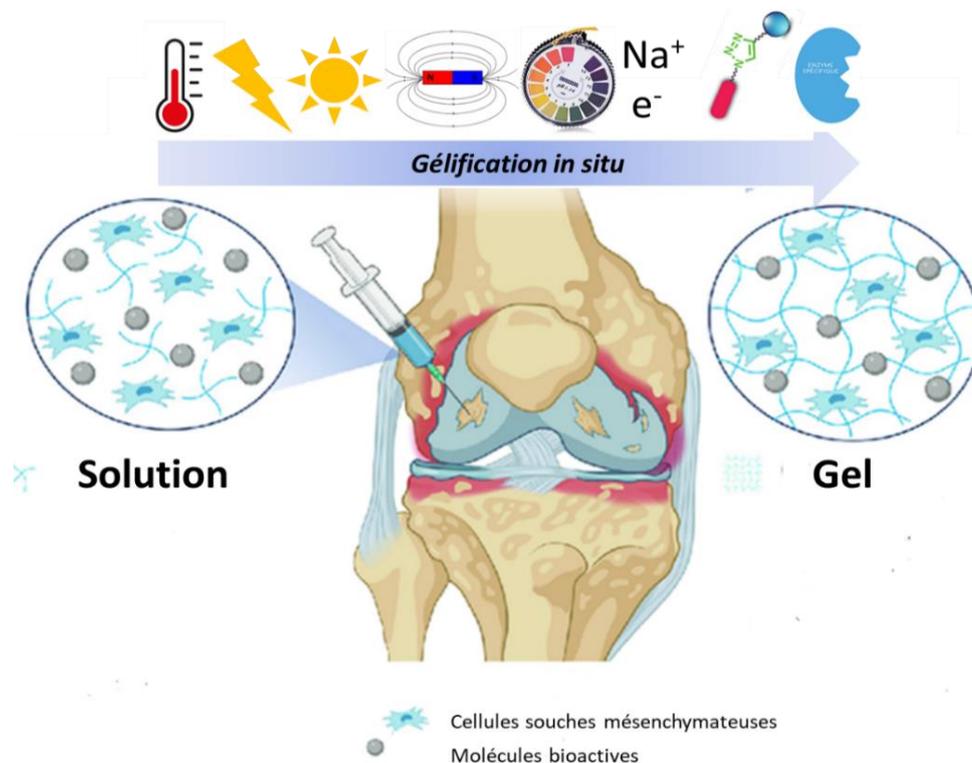


Figure 13. Gélification *in situ* d'une solution après l'application d'un stimulus de nature physique (température, électrique, lumière, champ magnétique), chimique (pH, redox, ions, molécules) ou enzymatique (inspiré de Strecanska et al., 2022).

De plus, soluble lors de l'injection, la solution épouse et comble parfaitement le défaut à traiter d'une façon plus rapprochée qu'un matériau à consistance solide avant de gélifier *in vivo* sous l'influence d'un stimulus. Ces hydrogels, qualifiés d'intelligents ou stimulables, répondent ainsi aux attentes d'actes chirurgicaux mini-invasifs. Les stimulus peuvent être de nature physique (température, électrique, lumière, champ magnétique), chimique (pH, redox, ions, molécules) ou enzymatique (Figure 13) (Ferreira et al., 2018; Mahinroosta et al., 2018; Su et al., 2023). A ce titre, les hydrogels répondant à la température, également connus sous le nom d'hydrogels thermosensibles, sont particulièrement prometteurs en ingénierie tissulaire ne nécessitant l'utilisation ou l'ajout d'aucun acteur extérieur mais reposant uniquement sur la température corporelle du patient.

Les propriétés thermosensibles de ces hydrogels reposent sur la présence de groupements hydrophobes (tels que méthyles, éthyles, isopropyles) et hydrophiles (tels qu'hydroxyles, carboxyles, amides) au sein des polymères. En fonction de la température, l'équilibre de ces interactions (hydrophiles/hydrophobes) peut être rompu et induire un changement dans la structure du réseau conduisant à sa gélification. Cette dernière peut s'établir en dessous ou bien au-dessus d'une certaine température, nommée, respectivement, température de solution critique supérieure (ang. upper critical solution temperature, UCST) et température de solution critique inférieure (ang. lower critical solution temperature, LCST) (Figure 14) (Qiao et al., 2022; Ruel-Gariépy & Leroux, 2004; Sponchioni et al., 2019; Tenhu & Niskanen, 2016).

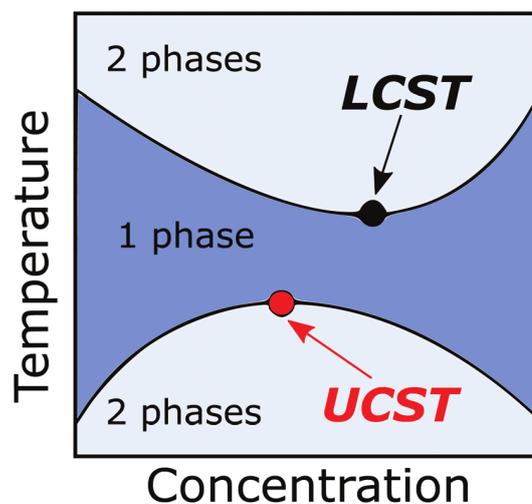


Figure 14. Diagramme de phase montrant les températures UCST (rouge) et LCST (noir) pour un polymère thermosensible (Tenhu & Niskanen, 2016).

## 4.1. Polymères thermosensibles

### 4.1.1. Polymères thermosensibles d'origine naturelle

Parmi les polymères thermo-répondants, certains sont d'origine naturelle (Figure 15). C'est le cas de certains dérivés protéiques (gélatine) ou de polysaccharides issus de plantes (agarose), d'algues (carraghénane) ou de bactéries (gellane). Pour ces polymères, la formation suivie de l'agglomération thermo-dépendante de structures hélicoïdales conduisent à la création de jonctions physiques aboutissant à la structuration d'un réseau (Graham et al., 2019; Jeong et al., 2012; Klouda, 2015; Matanović et al., 2014). Bien que la plupart de ces polymères naturels présentent une UCST (Figure 15.A), certains présenteront une LCST après modification chimique (Figure 15.B) et dont la température dépendra de la concentration en polysaccharide, du taux de modification...

Le xyloglucane est un polysaccharide présent dans la paroi primaire des cellules de plantes composé de glucose en  $\beta$ -1,4, ramifié par du xylose en  $\alpha$ -1,6 et partiellement substitué en galactose. Il acquiert son caractère thermosensible après réduction du pourcentage de galactose (minimum 35 %) (Nisbet et al., 2006; Pardeshi et al., 2022).

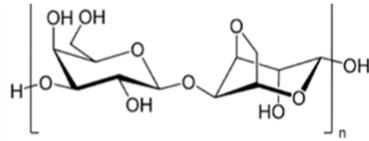
Le chitosane est un dérivé désacétylé de la chitine composant les carapaces des invertébrés. Biocompatible, biodégradable et non toxique, ce polysaccharide soluble à pH acide ( $< 6,2$ ) devient thermosensible en présence de polyols (ex :  $\beta$ -glycérophosphate) (Supper et al., 2014). Le degré de désacétylation influence également la transition sol-gel (Ruel-Gariépy & Leroux, 2004). La substitution chimique du chitosane (ex : par des groupements hydroxybutyles) lui octroie également des propriétés de gélification thermosensible (Sun et al., 2020).

C'est le cas d'autres polysaccharides tels que le scléroglycane (EPS bêta-glucane de champignon filamenteux du genre *Sclerotium*) qui devient thermosensible (type UCST) après substitution chimique de leurs fonctions hydroxyles par des groupements carboxyméthyles (et en présence de calcium) (Feeney et al., 2009).

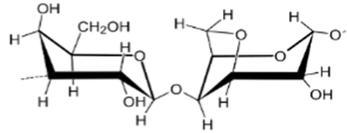
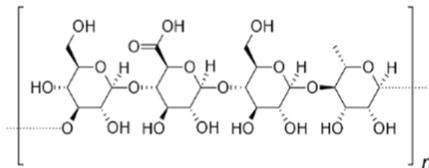
La cellulose n'est pas thermosensible naturellement mais l'introduction de groupements hydrophobes tels que méthyles lui confère un caractère thermo-répondant de type LCST (Bonetti et al., 2021).

A)

Polymère naturel à UCST



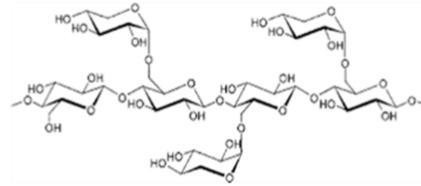
Agarose

Carraghénane  $\beta$ 

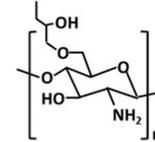
Gellane

B)

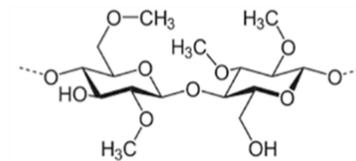
Polymère naturel modifié à LCST



Xyloglucane



O-Hydroxybutyle chitosane



Méthylcellulose

Figure 15. Exemples de polymères thermosensibles A) naturels ou B) après modification chimique.

#### 4.1.2. Polymères thermosensibles d'origine synthétique

Bien que les hydrogels thermosensibles à base de polymères d'origine naturelle aient été étudiés dans la régénération du cartilage, leur faible résistance mécanique ainsi que leur dégradation rapide limitent leurs applications (Mirahmadi et al., 2013; Naahidi et al., 2017; Westin et al., 2020). Designés à façon, les polymères thermosensibles synthétiques ont gagné leur intérêt à ce titre. De nature amphiphile, ils se présentent sous la forme d'homopolymères, de polymères greffés ou bien structurés en blocs (copolymères) (Sponchioni et al., 2019; Zhao et al., 2010). Les propriétés thermosensibles étant généralement issues d'un équilibre des forces hydrophiles/hydrophobes au sein de leur composition, dresser une liste exhaustive de ces polymères est complexe au vu du nombre de possibilités. On peut cependant distinguer quelques familles de polymères thermosensibles.

##### 4.1.2.1. Les dérivés des poly(éther)

Les dérivés des poly(éther) sont principalement représentés par la famille des poly(alkyloxyde) constitués du motif hydrophile poly(éthylène glycol) (PEG) autrement appelé poly(éthylène oxide) (PEO) ou poly(propylène glycol) (PPG) (poly(propylène oxide), PPO). Ce

sont les composants principaux de nombreux hydrogels d'origine synthétique en raison de leur excellente biocompatibilité (Gan et al., 2021; L. Liu et al., 2019; Sabel-Grau et al., 2022). La LCST du PEG et du PPG étant supérieure à 50 °C, ils sont généralement copolymérisés afin de diminuer leur température de transition (Shi et al., 2021). A ce titre, les chefs de file des poly(éther) sont sans conteste les poloxamères, copolymères à tri-blocs, disponibles sous divers noms commerciaux tels que Pluronic® (Sigma-Aldrich). Ils sont constitués du motif bloc poly(éthylène oxide)-b-poly-(propylène oxide)-b-poly(éthylène oxide) abrégé PEO-b-PPO-b-PEO dont la masse molaire et le ratio des blocs (PEO/PPO) divergent selon les dérivés. Solubles dans l'eau, biodégradables et non toxiques, la FDA approuve l'utilisation de quelques dérivés Pluronic® tels que F68 et F127 pour des applications médicales (Russo & Villa, 2019; Zarrintaj et al., 2020). Le Pluronic® F127 (poloxamère 407), qui présente une LCST inférieure à la température corporelle pour une concentration de 15 % à 30 % (m/v), est particulièrement étudié en ingénierie tissulaire (Chung et al., 2014; Cui et al., 2022; Park et al., 2009). Hormis les dérivés éthers types poly(alkyloxyde), le poly(méthylvinyléther) (PMVE) est un polymère thermosensible homopolymérique qui présente une LCST de 37 °C (Ward & Georgiou, 2011) (Figure 16).

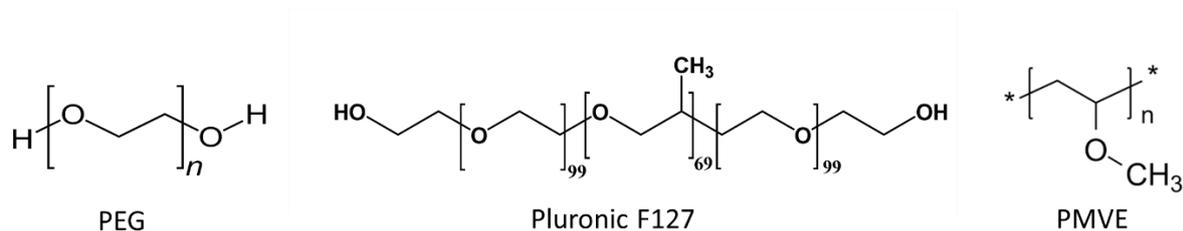


Figure 16. Exemples de dérivés des poly(éther) thermosensibles : poly(éthylène glycol) (PEG), Pluronic® F127 et poly(méthylvinyléther) (PMVE).

#### 4.1.2.2. Les dérivés des poly(ester)

Le poly(N-vinylcaprolactame) (PNVCL) est très étudié pour son caractère biocompatible, non toxique. Sa LCST varie de 32 à 50 °C en fonction de la concentration et de la masse molaire du polymère (polymère Flory-Huggins type I) (Cortez-Lemus & Licea-Claverie, 2016; Kozlovskaya & Kharlampieva, 2020; Marsili et al., 2021). De ce fait, le contrôle de la synthèse et notamment de la polydispersité du PNVCL est un facteur clé. L'intérêt des polyesters pour la fabrication des biomatériaux repose sur leur biodégradabilité (Darie-Niță et al., 2022; Manavitehrani et al., 2016). Parmi les plus connus, citons le PLGA, le PCL, le PLA, le

PGA (présentés en I.3.2.1), l'acide poly( $\epsilon$ -caprolactone-co-glycolique) (PCGA), l'acide poly( $\epsilon$ -caprolactone-co-lactique) (PCLA) ou encore l'acide poly( $\delta$ -valérolactone-co-lactique)(PVLA) (Shi et al., 2021). Associés afin de générer des polymères thermosensibles hybrides (ex : PEG-b-PLGA, PEG-PLGA-PEG, PEG-PCL-PEG, PLGA-PEG-PLGA, PCGA-PEG-PCGA), la dégradabilité, les propriétés mécaniques ainsi que la LCST de ces dérivés sont modulables selon la composition, la concentration, et la masse molaire (Xiao et al., 2021; Zhang et al., 2019) (Figure 17).

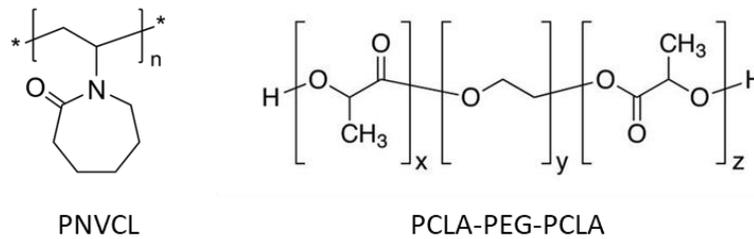


Figure 17. Exemples de dérivés des poly(ester) thermosensibles, poly(*N*-vinylcaprolactame) (PNVCCL) et acide poly( $\epsilon$ -caprolactone-co-lactique)-poly(éthylène glycol)-acide poly( $\epsilon$ -caprolactone-co-lactique) (PCLA-PEG-PCLA).

#### 4.1.2.3. Les polypeptides synthétiques

En fonction de la répartition des groupements hydrophiles/hydrophobes, certains polypeptides synthétiques peuvent présenter un comportement type LCST (Zhao et al., 2017). C'est le cas des polypeptides mimétiques de l'élastine. La séquence pentasaccharidique est constituée de valine (Val), proline (Pro) et glycine (Gly) ainsi qu'un autre acide aminé non défini variable en fonction des dérivés. Le motif répétitif glycine-valine-glycine-valine-proline (GVGVP)<sub>n</sub> présente ainsi une transition de phase de 28-30 °C (Despanie et al., 2016) (Figure 18). A l'inverse, certains polypeptides (ex : poly(alanine) (Liu et al., 2018) et poly(alanine-co-leucine) (Moon et al., 2011)) peuvent être associés par greffage ou copolymérisés à un polymère thermosensible afin d'améliorer la biocompatibilité de l'hydrogel. Dans ce cas précis la composition, la masse molaire et la structure secondaire des polypeptides affectent la température de transition sol-gel.

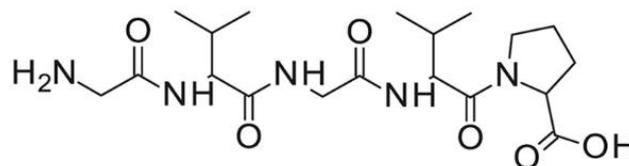
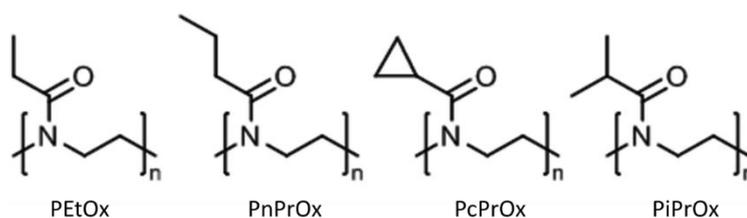


Figure 18. Structure du peptide thermosensible glycine-valine-glycine-valine-proline (GVGVP).

#### 4.1.2.4. Les poly(2-oxazoline)

Les poly(2-oxazoline) (POx) sont issus de la polymérisation d'une classe d'iminoéthers cycliques à cinq chaînons nommés oxazoline. Initialement approuvés comme additifs alimentaires par la FDA dans les années 1966, leur structure peptide-mimétique rend les POx intéressants pour des applications dans le domaine des biomatériaux, étant de surcroît biocompatibles et biodégradables (Nemati Mahand et al., 2022). Avec la découverte des propriétés thermosensibles des POx, l'étude des premiers dérivés à LCST supérieure à 60 °C par Lin et al. (1988) (poly(2-éthyl-2-oxazoline), PEtOx, LCST = 65 °C) a conduit peu à peu à l'élaboration de composés à LCST prometteuses pour l'ingénierie tissulaire (ex : poly(2-isopropyl-2-oxazoline) (PiPrOx, LCST = 37 °C), poly(2-cyclopropyl-2-oxazoline) (PcPrOx, LCST = 30 °C), poly(2-n-propyl-2-oxazoline) (PnPrOx, LCST = 24 °C), poly(2-diéthylamino-2-oxazoline) (PDEAOx, LCST = 24 °C)) (Figure 19). La présence d'impuretés post-production et la difficulté de synthèse sont néanmoins des verrous pour une utilisation généralisée (Hoogenboom & Schlaad, 2017; Jana & Uchman, 2020).



**Figure 19. Exemples de dérivés poly(2-oxazoline) thermosensibles : poly(2-éthyl-2-oxazoline) (PEtOx), poly(2-n-propyl-2-oxazoline) (PnPrOx), poly(2-cyclopropyl-2-oxazoline) (PcPrOx), poly(2-isopropyl-2-oxazoline) (PiPrOx) (d'après Hoogenboom & Schlaad, 2017).**

#### 4.1.2.5. Les poly(acrylamide N-substitué)

Parmi les différentes familles de polymères thermosensibles, les poly(acrylamide N-substitué) sont les plus étudiés (Figure 20). Leur température de transition dépend de la structure et de la longueur du groupement alkyle (Zhang et al., 2019). Dans la suite de ce mémoire, l'un de ces dérivés, le poly(N-isopropylacrylamide) (pNIPAM) sera tout particulièrement détaillé.

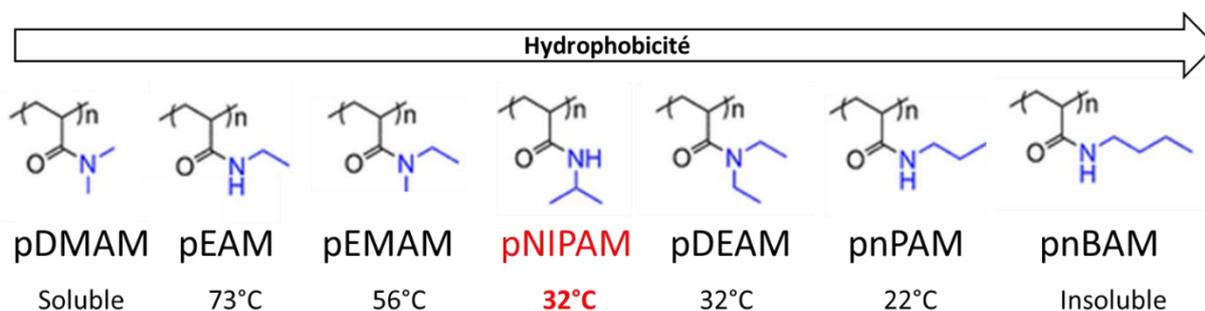


Figure 20. Exemples de dérivés poly(acrylamide N-substitué) : poly(N,N-diméthylacrylamide) (pDMAM), poly(N-éthylacrylamide) (pEAM), poly(N,N-éthylméthacrylamide) (pEMAM), poly(N-isopropylacrylamide) (pNIPAM), poly(N,N-diéthylacrylamide) (pDEAM), poly(N-n-propylacrylamide) (pnPAM), poly(N-n-butylacrylamide) (pnBAM) (d'après Zhang et al., 2019).

## 4.2. Le poly(N-isopropylacrylamide), pNIPAM

### 4.2.1. Généralités

Depuis les premières synthèses du pNIPAM en 1956 (Specht et al., 1956), la polymérisation du NIPAM repose sur différentes techniques : polymérisation radicalaire, redox ou encore ionique. Les techniques radicalaires pour leur polyvalence sont généralement privilégiées aujourd'hui et notamment les techniques de polymérisation radicalaire par désactivation réversible (RDRP) (Corrigan et al., 2020). Le mécanisme d'action en jeu permet de distinguer trois sous-catégories de polymérisation RDRP : la polymérisation médiée par le nitroxyde (NMP), la polymérisation radicalaire contrôlée par transfert de chaîne réversible par addition-fragmentation (RAFT) ou bien la polymérisation radicalaire par transfert d'atomes (ATRP). De l'homopolymère linéaire classique en passant par des architectures plus originales (bloc, étoile, cycle), de nombreuses structures et masses molaires différentes de pNIPAM ont ainsi été synthétisées (Halperin et al., 2015; Narumi et al., 2022; Schild, 1992). Fonctionnalisés en extrémité de la chaîne par différents groupements fonctionnels (-NH<sub>2</sub>, -COOH, -N<sub>3</sub>, -SH), copolymérisés, greffés à d'autres polymères, la diversité des dérivés pNIPAM accessibles

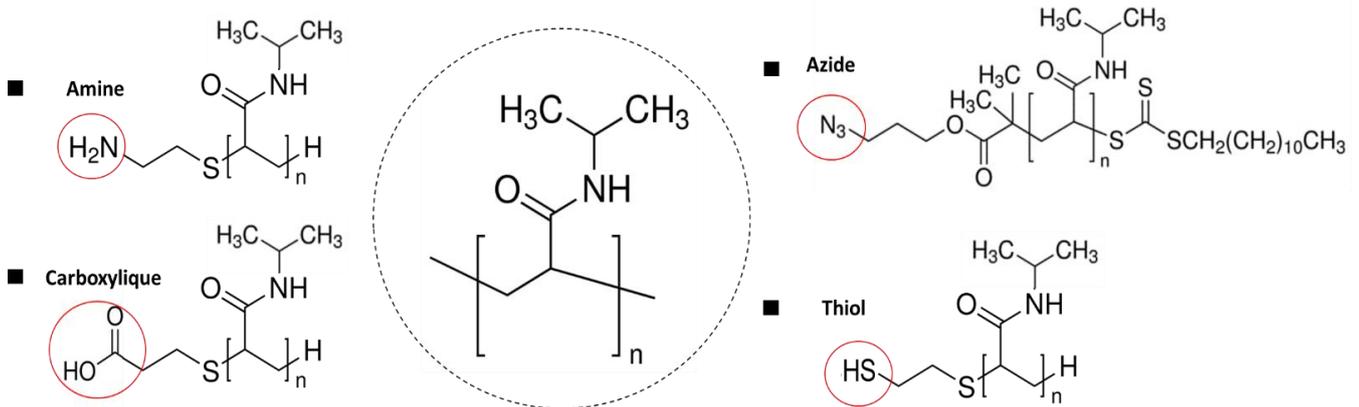


Figure 21. Structure de référence du pNIPAM et exemples de dérivés fonctionnalisés (D'après Sigma-Aldrich et Polymer Source).

démontre de l'intérêt dont porte la science pour ce polymère aux propriétés thermosensibles (Figure 21) (Sigma-Aldrich et Polymer Source).

Les propriétés thermosensibles du pNIPAM sont pour la première fois rapportées par Heskins & Guillet (1968). Elles sont relatives à sa composition amphiphile. En effet, l'unité répétitive du pNIPAM est composée d'une fonction amide (hydrophile) et d'un groupement isopropyle (hydrophobe) portés par la chaîne latérale, ainsi que d'un squelette carboné (hydrophobe) (Figure 22.A). A température ambiante, les interactions de type hydrogène, eau-amide, favorisent l'établissement d'une couche d'hydratation structurée autour des surfaces apolaires sous la forme d'une cage, nommée clathrate, responsable de la solvation des groupements hydrophobes et de la diminution entropique du système ( $\Delta S < 0$ ) (Deshmukh et al., 2012; Ono & Shikata, 2006; Podewitz et al., 2019). À cette température ( $T < LCST$ ), l'énergie libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) liée au mélange polymère-eau est négative (équation 1), les interactions polymère-eau sont favorisées et les chaînes de pNIPAM adoptent une conformation en pelote statistique (ang. random coil).

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (1)$$

L'augmentation de la température génère une modification de l'équilibre enthalpie/entropie qui vient à déstabiliser ce réseau moléculaire. Les liaisons hydrogène sont affaiblies au profit des interactions hydrophobes conduisant à une augmentation de la contribution entropique ( $-T\Delta S$ ). Lorsque celle-ci devient supérieure à celle du terme enthalpique ( $\Delta H$ ), le  $\Delta G$  est positif et une séparation de phases se produit ( $T > LCST$ ). Les interactions polymère-polymère sont favorisées au détriment des interactions polymère-eau (Figure 22.B). En conséquence, les

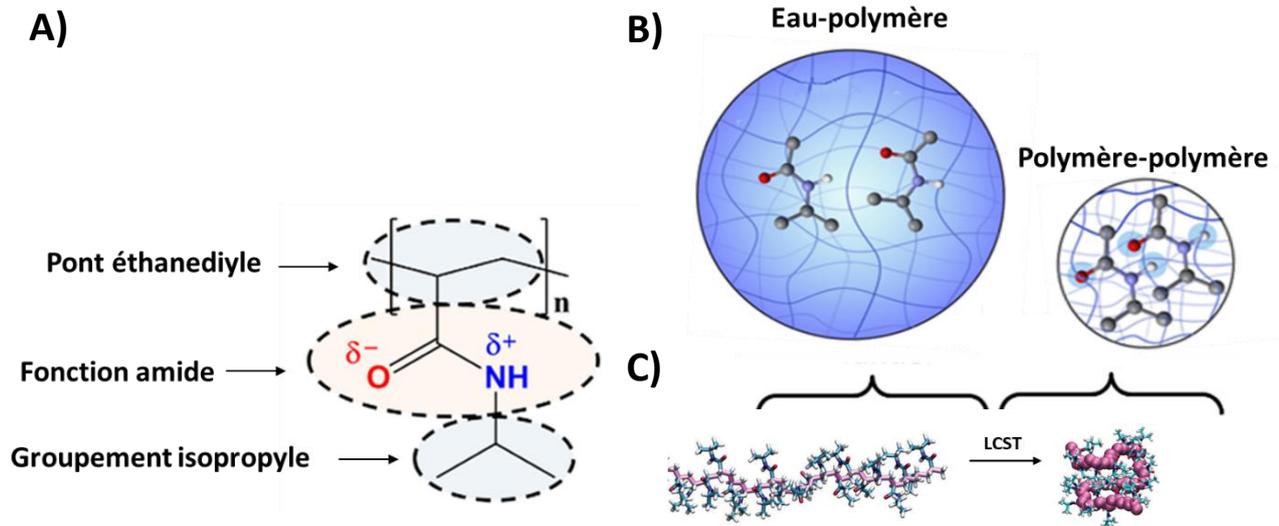


Figure 22. A) Détails des composantes hydrophiles (rouge) et hydrophobes (bleu) du pNIPAM (d'après Lanzalaco & Armelin, 2017). B) Interaction en solution du pNIPAM en fonction de la température (d'après T.-Y Wu et al., 2018). C) Transition moléculaire du pNIPAM au-dessus de la LCST (d'après Tavagnacco et al., 2018).

chaînes de pNIPAM se replient afin de minimiser le contact entre les surfaces hydrophobes du pNIPAM et l'eau adoptant ainsi une conformation globulaire thermodynamiquement stable (Figure 22.C). Souvent qualifié d'état hydrophobe, la désolvation séquentielle des groupements isopropyles/pont éthanediyle puis des fonctions amides est seulement partielle (Cook et al., 2021; Deshmukh et al., 2012; Lanzalaco & Armelin, 2017; L. Tang et al., 2021; T.-Y Wu et al., 2018).

La température de transition du pNIPAM est généralement définie dans l'eau à 32 °C (Halperin et al., 2015). Décrit en tant que polymère de Flory-Huggins de type II, la LCST du pNIPAM est considérée comme indépendante de la concentration et de la longueur de chaîne notamment pour des masses molaires supérieures à 50 000 g/mol (Afroze et al., 2000; Fujishige et al., 1989). La LCST peut augmenter de quelques degrés notamment pour de plus faibles masses molaires et des concentrations inférieures à 1 mg/mL (Pamies et al., 2009; Qiu et al., 2013). Outre la masse molaire, la tacticité du polymère peut avoir une influence sur la LCST. Dans le cas du pNIPAM, la tacticité fait référence à l'orientation du groupe amide latéral par rapport au squelette carboné : aléatoire (atactique), alternative (syndiotactique) ou unilatérale (isotactique). Augmenter le pourcentage de mésodiades (isotacticité) permet de diminuer la LCST du pNIPAM (De Oliveira et al., 2017; Ray et al., 2005). Des changements de LCST davantage notables sont observés en modifiant la composition du polymère par



polymères en diminuant la tension de surface, retardant ainsi la séparation de phase (Gresham et al., 2023; Zhu, 2014).

La LCST du pNIPAM peut également varier en fonction de la nature du solvant et de la proportion eau/solvant. Par exemple, la présence d'éthanol (10 % v/v en éthanol/eau) déplace la LCST de la solution de pNIPAM vers des températures plus basses. À l'inverse, aucune transition de phase n'est observée lorsque le pNIPAM a été solubilisé dans de l'éthanol absolu (Costa et al., 2015; Tavagnacco et al., 2020). Le pNIPAM peut également présenter un comportement UCST dans des mélanges d'eau et de solvants organiques en quantité suffisante, tels que l'éthanol, le propanol et le diméthylsulfoxyde (DMSO). Cet effet est dû à la compétition entre le solvant et le pNIPAM pour l'interaction préférentielle avec l'eau (Bischofberger et al., 2014; Henschel et al., 2023).

#### 4.2.2. Application des hydrogels à base de pNIPAM

Les propriétés thermosensibles du pNIPAM se sont révélées utiles pour de nombreuses applications : la séparation de molécules (ex : chromatographie (Kanazawa & Okano, 2011), le traitement de l'eau (Musarurwa & Tavengwa, 2022)), le développement de matériaux intelligents (ex : textile (Sun et al., 2018), vitre (K. Wang et al., 2023)), en microfluidique (Lee et al., 2008), en robotique (Zheng et al., 2015)... Dans le domaine biomédical, le nombre de publications portant sur ce polymère n'a cessé d'augmenter depuis 1968. En 2017, près de 80% des recherches biomédicales portaient sur les propriétés du

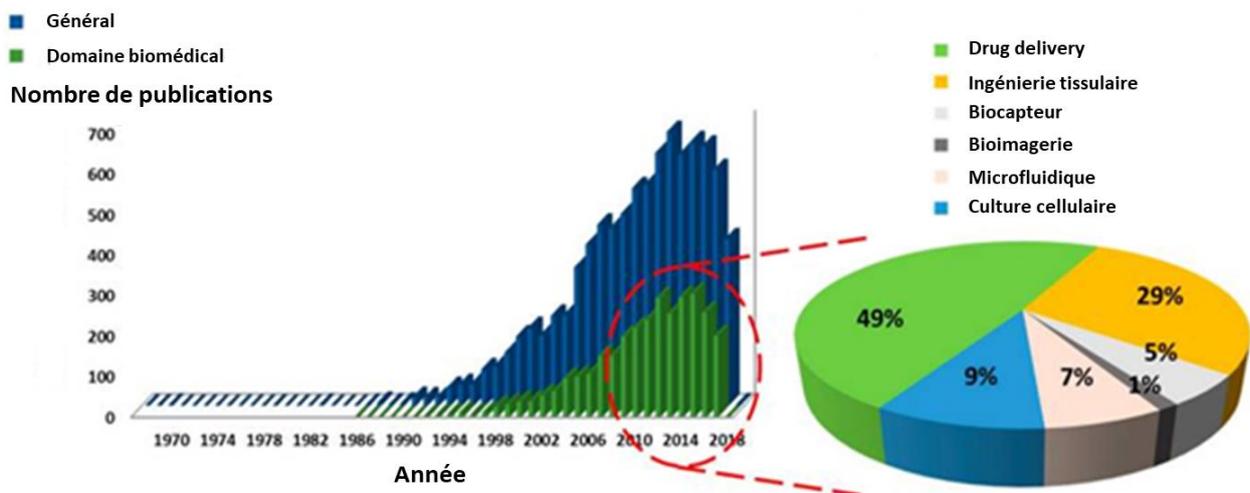


Figure 24. Nombre de publications traitant du pNIPAM de 1968 à 2017. L'utilisation du pNIPAM dans le domaine biomédical en 2017 est détaillée (d'après Lanzalaco & Armelin, 2017).

pNIPAM en culture cellulaire, pour la délivrance de molécules bioactives (ang. drug delivery), et en ingénierie tissulaire (Figure 24) (Lanzalaco & Armelin, 2017).

En culture cellulaire, il est généralement employé pour la production de feuillets cellulaires, par exemple de cellules endothéliales (Harimoto et al., 2002), épithéliales (Na et al., 2017) ou cardiaques (Haraguchi et al., 2014). Au-dessus de la LCST, les cellules adhèrent, se propagent et prolifèrent sur une surface recouverte de pNIPAM, tandis qu'en dessous de la LCST, les cellules se détachent spontanément de la surface. Par rapport aux techniques traditionnelles de détachement cellulaire telles que la protéolyse, les surfaces recouvertes de pNIPAM provoquent moins de dommages aux cellules et la rétention de la MEC (Kim et al., 2020).

Le pNIPAM est l'un des polymères thermosensibles les plus couramment utilisés pour l'administration de médicaments et en ingénierie tissulaire car sa LCST est proche de la température corporelle humaine (~ 37 °C) et sa réponse est rapide à cette température (Ansari et al., 2022). De plus, le caractère biocompatible, non toxique, non génotoxique du pNIPAM est généralement approuvé (Capella et al., 2019; Cooperstein & Canavan, 2013; Guo et al., 2017). Ainsi, une grande diversité de tissus et d'organes est ciblée par les dérivés de pNIPAM : yeux (Lima et al., 2016), sein (Metawea et al., 2021), cœur (Navaei et al., 2016), vagin (Afloarea et al., 2022), cerveau (Arjun et al., 2022), cartilage (Rana & De la Hoz Siegler, 2021) etc, permis notamment par le nombre de formulations envisageables (hydrogel, microgel, film, micelle, polymersome, nanoparticule) en fonction de l'application (L. Tang et al., 2021).

Non biodégradable, la masse molaire du pNIPAM sélectionné est importante, l'excrétion rénale étant principalement contrôlée par le volume hydrodynamique des chaînes de polymères. En effet, les longues chaînes polymériques possèdent un volume hydrodynamique plus important ce qui entrave la filtration glomérulaire. A l'image du PEG, pour qui le seuil de filtration glomérulaire est de ~ 30 000 g/mol, celui du pNIPAM serait d'une dizaine de milliers de g/mol (Bertrand et al., 2009). Les dérivés pNIPAM de petites tailles seront donc privilégiés pour des applications médicales. Cependant les hydrogels issus de ces pNIPAM présentent de mauvaises propriétés mécaniques et un taux de libération rapide des molécules dans le cas d'une application en drug delivery (Ansari et al., 2022; Haq et al., 2017; Lanzalaco & Armelin, 2017; Xu et al., 2020; Zhang et al., 2004). Ainsi, afin d'améliorer, d'une

part, la biodégradabilité et la bioaffinité, et d'autre part les propriétés mécaniques des hydrogels de pNIPAM, l'utilisation combinée de polymères naturels tels que les polysaccharides, a été étudiée, notamment pour leur caractère MEC-mimétique. L'association pNIPAM/polysaccharide peut être réalisée par réseaux interpénétrés (IPN) ou bien par greffage covalent.

#### 4.2.3. Les associations polysaccharide/pNIPAM

Les hydrogels IPN sont formés par l'enchevêtrement de deux réseaux de polymères distincts en interaction *via* des liaisons faibles de type liaisons hydrogène, interactions de van der Waals ou interactions hydrophobes. L'hydrogel nouvellement formé possède des propriétés mécaniques combinant les caractéristiques des deux polymères le constituant (Crosby et al., 2022; W. Wang et al., 2023; Zoratto & Matricardi, 2018). De nombreux IPN polysaccharides-pNIPAM ont été développés, à partir notamment d'alginate (Qin et al., 2021), d'acide hyaluronique (Atoufi et al., 2019), de succinoglycane (Hu et al., 2022), de cellulose (Z. Liu et al., 2022), de chitosane (Wiwatsamphan & Chirachanchai, 2022) ou encore de chondroïtine sulfate (Varghese et al., 2008).

Une alternative à ces hydrogels physiques constitués par des réseaux interpénétrés est de greffer le pNIPAM sur les chaînes de polysaccharide. Dans cette optique, les stratégies les plus employées impliquent la chimie Clic (Mortisen et al., 2010), la chimie base de Schiff (Lima et al., 2021), la photopolymérisation (Don & Chen, 2005), la réticulation disulfure (S.-W Wu et al., 2018), la chimie thiolène (Ding et al., 2020), et l'utilisation d'agents de couplage (D'Este et al., 2014). Dans le cas de polysaccharides, cette dernière approche est communément décrite pour le greffage du pNIPAM, en particulier celle des carbodiimides, agents chimiques possédant une liaison  $C=N=C$  (Alavarse et al., 2022). Alors que le dicyclohexylcarbodiimide (DCC) et le diisopropylcarbodiimide (DIC) sont insolubles dans l'eau, le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC) permet d'envisager une utilisation en solvant mais aussi et surtout en solution aqueuse (Montalbetti & Falque, 2005).

##### 4.2.3.1. Cas du greffage covalent polysaccharide-pNIPAM par la chimie EDC

Le greffage covalent par EDC/NHS a pour objectif la formation d'une liaison stable de type amide entre un groupement acide carboxylique (COOH) et une amine (NH<sub>2</sub>), ici respectivement portés par le polysaccharide et le pNIPAM ou inversement. Le mécanisme réactionnel général est décrit ci-après (Alavarse et al., 2022; Mojarradi, 2011).

### Mécanisme de la réaction

La première étape de la réaction est la protonation du carbodiimide, EDC. En effet, en présence de carboxylate ( $\text{COO}^-$ ), le carbodiimide est attaqué en donnant un dérivé O-acylisouré (Figure 25.1). Cette forme activée des carboxylates peut conduire *in fine* au composé amide *via* différentes voies :

- En présence d'amine, l'attaque nucléophile du dérivé O-acylisouré conduit à la formation d'une liaison amide en une étape (Figure 25.2).
- Réaction qualifiée de secondaire ou parasite, les groupements carboxylates peuvent attaquer le dérivé O-acylisouré et induire la formation d'un anhydride d'acide intermédiaire puis d'un amide, si l'amine est présente (Figure 25.3).
- A l'image de la réaction précédente, un pont ester peut être également formé, à partir des groupements hydroxyles du polysaccharide, puis amide lors d'une seconde étape, si l'amine est présente (Figure 25.4).

Cependant, le dérivé O-acylisouré n'est pas stable dans l'eau. En effet à pH 4,8 la vitesse d'hydrolyse de l'O-acylisouré serait de quelques secondes (Madison & Carnali, 2013). L'eau étant majoritaire vis-à-vis de l'amine primaire, l'hydrolyse est plus susceptible de se produire

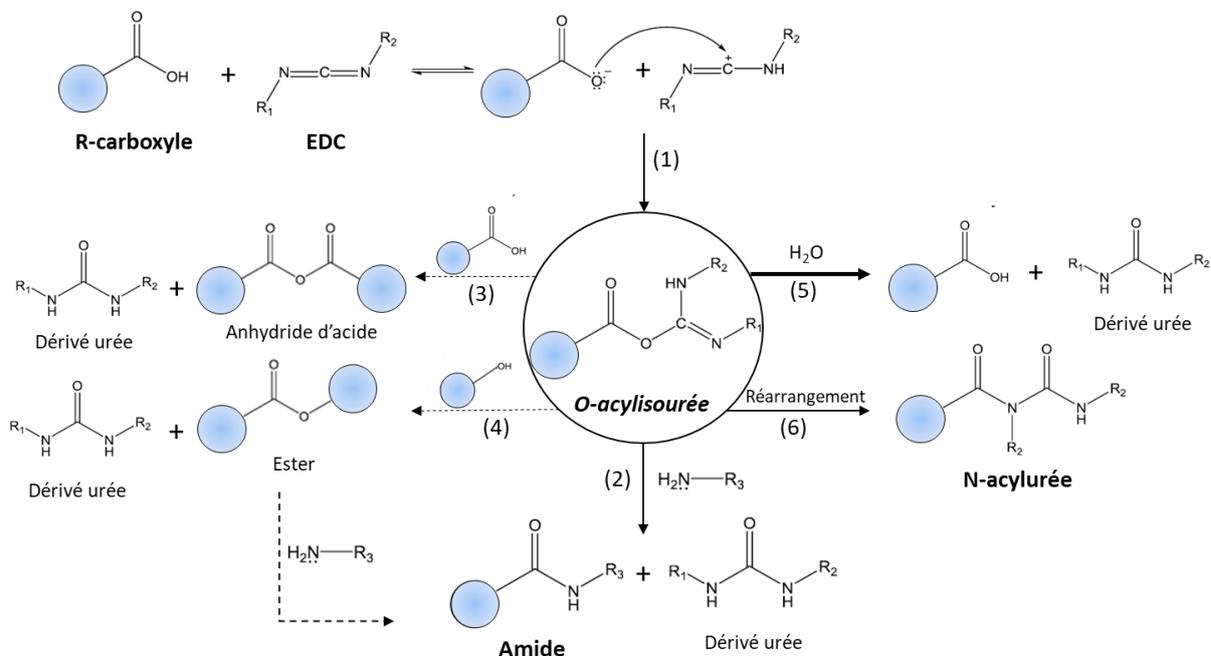


Figure 25. Représentation schématique des produits obtenus via la chimie des carbodiimides. (1) Activation du carboxyle et formation du dérivé O-acylisouré. (2) Réaction d'une amine primaire sur le dérivé O-acylisouré pour conduire à l'amide. (3) Réaction du carboxyle sur le dérivé O-acylisouré puis attaque d'une amine primaire pour conduire à l'amide. (4) Réaction d'un hydroxyle sur le dérivé O-acylisouré puis attaque d'une amine primaire pour conduire à l'amide. (5) Hydrolyse du composé O-acylisouré. (6) Réarrangement N→O conduisant au N-acylurée. Inspiré de Mojarradi (2011).

que la formation de l'amide (Figure 25.5). De plus, le dérivé O-acylisourée peut subir un transfert d'acyl intramoléculaire (réarrangement N→O), donnant le dérivé N-acylurée plus stable (Figure 25.6) (Alavarse et al., 2022). Le N-acylurée formé n'est plus réactif vis-à-vis des amines primaires. Ceci est moins observé pour des polymères-COOH de haute masse molaire, moins sensible au réarrangement (Kuo et al., 1991). Ainsi l'ajout d'un nucléophile qui réagit plus rapidement que le transfert d'acyl est utilisé tels que le hydroxybenzotriazole (HOBT) (Chan & Cox, 2007) ou encore le N-hydroxysuccinimide (NHS) (Staros et al., 1986). Lorsque le NHS réagit avec l'O-acylisourée, l'ester succinimidyle obtenu est plus stable vis-à-vis de l'hydrolyse ( $t_{1/2}$  de 40 min à pH 6) (Grabarek & Gergely, 1990). De plus, la formation de N-acylurée est entravée car l'ester succinimidyle ne peut pas subir de réarrangement N→O (D'Este et al., 2014) (Figure 26).

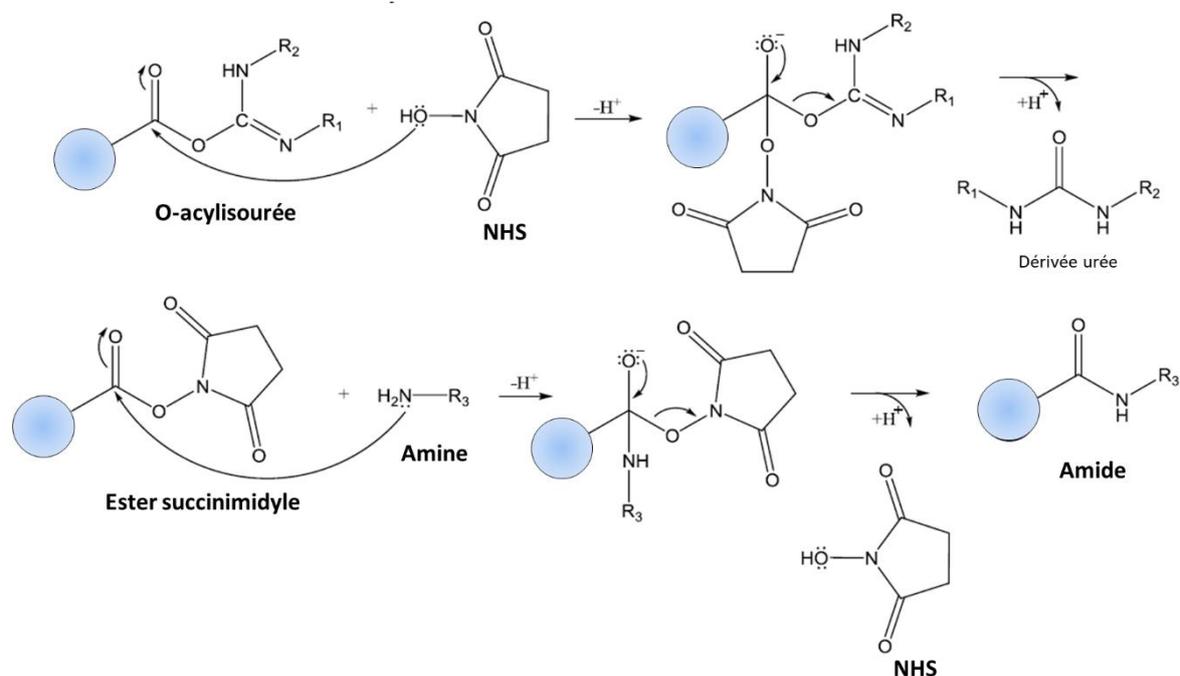


Figure 26. Mécanisme réactionnel conduisant à la formation d'un amide à partir du dérivé O-acylisourée en présence de N-hydroxysuccinimide (NHS). Inspiré de Mojarradi (2011).

Les conditions réactionnelles ont un impact important sur l'efficacité de la chimie carbodiimide. Des conditions de réactions utilisées pour le greffage de pNIPAM sur les polysaccharides, alginate, acide hyaluronique et chitosane, sont décrites dans les Tableaux VI.A/B/C. Les deux premiers polysaccharides comportant des groupements carboxyles, un pNIPAM-NH<sub>2</sub> a été utilisé, tandis que dans le cas du chitosane (qui comporte des groupements amines), un pNIPAM-COOH a été privilégié.

### *pH réactionnel*

Le pH optimal de la première étape (Figure 25.1) serait d'environ 4,5 (Nakajima & Ikada, 1995) afin de réduire la densité électronique du carbone central de l'EDC en protonant l'azote adjacent ( $pK_a \sim 3,1$ ) et favoriser l'attaque nucléophile du carboxyle suffisamment ionisé (carboxylate) (Madison & Carnali, 2013). Alors que l'activation du carbodiimide requiert un pH acide, après l'ajout du composé amine un pH basique est nécessaire pour favoriser la forme active de l'amine. Ainsi, une approche en deux étapes peut être adoptée, dans laquelle l'espèce activée est dans un premier temps préparée à pH acide avant l'ajout de l'amine (Figure 25.2) (Conzatti et al., 2019; D'Este et al., 2012; Guo et al., 2018; Lai & Luo, 2017). Le pH peut être ensuite augmenté ( $\sim 7/8$ ) lors de la deuxième étape de la réaction (D'Este et al., 2012). Les réactions en une étape sont généralement réalisées dans une plage de pH intermédiaire (de 5 à 6,5) (Barbier et al., 2023; Chen et al., 2011; Chen & Cheng, 2006; M. Liu et al., 2019). Le solvant de réaction est classiquement le tampon MES, parfois phosphate ou plus simplement l'eau (Tableau VI.A/B/C)).

### *Ratios molaires COOH:EDC/EDC:NHS/COOH:NH<sub>2</sub>*

Bien qu'un excès molaire d'EDC vis-à-vis des acides carboxyliques semblerait idéal afin de s'opposer aux phénomènes d'hydrolyse et favoriser ainsi la formation de l'O-acylisourée (Figure 25), cette condition est rarement rencontrée. En effet, un excès d'EDC par rapport à la quantité de groupements carboxyles disponibles pourrait favoriser les réactions parasites (formation d'ester et d'anhydride) (Neises & Steglich, 1978). Ainsi, le ratio molaire COOH:EDC est généralement proche de 1 pour le greffage polysaccharide/pNIPAM (Tableau VI.A/B/C). Malgré la faible stabilité du dérivé O-acylisourée, l'EDC est parfois utilisé seul (Li et al., 2015; Soledad Lencina et al., 2014) ou bien combiné au NHS. Dans ce cas, le ratio molaire EDC:NHS est généralement de 1 (Tableau VI.A/B/C). EDC et NHS peuvent être ajoutés en une ou plusieurs fois au cours de la réaction. Pour la chimie des carbodiimides, une diminution du ratio molaire COOH:NH<sub>2</sub> semble favoriser la réaction de couplage (Ha et al., 2006; Soledad Lencina et al., 2014). Or, un polysaccharide comporte généralement de multiples groupements (carboxyliques ou amines) vis-à-vis d'un pNIPAM qui présente qu'une extrémité fonctionnalisée. Dans le cas de pNIPAM fonctionnalisé avec une extrémité amine (pNIPAM-NH<sub>2</sub>), atteindre un excès molaire en amine n'est pas aisé, il est donc couramment employé en défaut (Tableau VI.A/B).

### *Temps de réaction*

Après l'ajout de l'amine, la réaction est généralement arrêtée après 12 h, mais le temps de réaction peut être prolongé plusieurs jours (notamment lors de multiples ajouts d'EDC/NHS) (Barbier et al., 2023; Soledad Lencina et al., 2014).

Tableau VI.A. Conditions de réaction pour le greffage covalent alginate/pNIPAM par la chimie des carbodiimides (EDC).

Polymères	Solubilisation pNIPAM	Solubilisation polysaccharide	Ratio molaire	Activation COOH	Réaction	Purification	Référence
<ul style="list-style-type: none"> <li>Alginate : Mn 120-190 000 g/mol</li> <li>pNIPAM-NH<sub>2</sub> : Mn 24 000 g/mol</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>1 % m/v MES pH 6,5</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>1 % m/v MES pH 6,5</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>COOH:NH<sub>2</sub> = 124:1</li> <li>COOH:EDC = 1:1</li> <li>EDC:NHS = 1:1</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>–</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>–</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Précipitation méthanol</li> <li>Dialyse 4 jours (MWCO 12 000 g/mol)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Liu, M et al. (2019)</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Alginate</li> <li>pNIPAM-NH<sub>2</sub> : Mn 4 200/15 800 g/mol</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>1 g eau</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>4 g eau</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>COOH:NH<sub>2</sub> = 87/325:1</li> <li>COOH:EDC = 13:1</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>–</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>EDC ajouté en 3 fois</li> <li>Pas de NHS</li> <li>Durée : 4 jours</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Lyophilisation puis Soxhlet/méthanol 30 h</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Soledad Lencina et al. (2014)</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Alginate : Mn 118 000 g/mol</li> <li>pNIPAM-NH<sub>2</sub> : Mn 21 200 g/mol</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>5 % m/v eau</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>2 % m/v eau</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>COOH:NH<sub>2</sub> = 219:1</li> <li>COOH:EDC = 10:1</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>–</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Pas de NHS</li> <li>Ajuster le pH à 8</li> <li>Durée : 8 h</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Dialyse contre eau puis lyophilisation</li> <li>Extraction au chloroforme</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Li et al. (2015)</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Alginate : Mn 60 000 g/mol</li> <li>pNIPAM-NH<sub>2</sub> : Mn 14 000 g/mol</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>12 % m/v eau</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>6 % m/v eau</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>COOH:NH<sub>2</sub> = 72:1</li> <li>COOH:EDC = 6:1</li> <li>EDC:NHS = 1:1</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ajuster le pH à 4,5</li> <li>Durée : 2 h</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ajuster le pH à 5-6</li> <li>Durée : x jours</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Précipitation acétone</li> <li>Dialyse contre eau 1 weekend (MWCO 50 000 g/mol)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Guo et al. (2018)</li> </ul>

Tableau VI.B. Conditions de réaction pour le greffage covalent acide hyaluronique(HA)/pNIPAM par la chimie des carbodiimides (EDC).

Polymères	Solubilisation pNIPAM	Solubilisation polysaccharide	Ratio molaire	Activation COOH	Réaction	Purification	Référence
<ul style="list-style-type: none"> <li>HA : Mn 200 000 g/mol</li> <li>pNIPAM-NH<sub>2</sub> : Mn 15-20 000 g/mol</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>6 % m/v Eau pH 5,6 (2/3°C)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>3 % m/v Eau pH 5,6 (2/3°C)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>COOH:NH<sub>2</sub> = 44:1</li> <li>COOH:EDC = 0,9:1</li> <li>EDC:NHS = 2:1</li> </ul>	—	<ul style="list-style-type: none"> <li>HA + pNIPAM 1 h à pH 5-6, en dessous de 10 °C</li> <li>5 ajouts de EDC/NHS (1 tous les 24 h)</li> <li>Durée : 5 jours</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Dialyse contre NaCl 0,1 M puis eau</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Barbier et al. (2023)</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>HA : Mw 1 300 000 g/mol</li> <li>pNIPAM-NH<sub>2</sub> : Mn 36 000 g/mol</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>5 % m/v MES pH 6,5</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>0,25 % m/v MES pH 6,5</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>COOH:NH<sub>2</sub> = 5:1</li> <li>COOH:EDC = 0,1:1</li> <li>EDC:NHS = 3:1</li> </ul>	—	<ul style="list-style-type: none"> <li>Durée : 12 h, 25 °C, 180 rpm</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Thermoprécipitation : NaCl 3 M, 50 °C, 30 min. Centrifugation 13 500 rpm (40 °C, 30 min) puis suspension dans 0,1 M MES. Répété 3 fois</li> <li>Dialyse 7 jours (MWCO 50 000 g/mol)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Chen et al. (2011)</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>HA : Mn 293/1 506 000 g/mol</li> <li>pNIPAM-NH<sub>2</sub> : Mn 44 000 g/mol</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>1,15 g PBS</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>0,41 g PBS</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>COOH:NH<sub>2</sub> = 40:1</li> <li>COOH:EDC = 0,3:1</li> <li>EDC:NHS = 1:1</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ajuster le pH à 5,5</li> <li>Durée : 1 h</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ajuster le pH à 7,2</li> <li>Durée : 3 jours</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Dialyse contre eau</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>D'Este et al. (2012)</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>HA : Mn 1 700 000 g/mol</li> <li>pNIPAM-NH<sub>2</sub> : Mn 13 100 g/mol</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>0,5 % m/v eau</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>0,5 % m/v eau</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>COOH:NH<sub>2</sub> = 79/34/14:1</li> <li>COOH:EDC = 1:1</li> <li>EDC:NHS = 2:1</li> </ul>	—	<ul style="list-style-type: none"> <li>Durée : 24 h</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Précipitation THF-hexane (4:1)</li> <li>Soxhlet/méthanol</li> <li>Dialyse 3 jours contre eau</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ha et al. (2006)</li> </ul>

Tableau VI.C. Conditions de réaction pour le greffage covalent chitosane(CS)/pNIPAM par la chimie des carbodiimides (EDC).

Polymères	Solubilisation pNIPAM	Solubilisation polysaccharide	Ratio molaire	Activation COOH	Réaction	Purification	Référence
<ul style="list-style-type: none"> <li>CS : 74 % désacétylé Mw 165 000 g/mol</li> <li>pNIPAM-COOH : Mn 7 400 g/mol</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>20/40 % m/v MES</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>2 % m/v MES</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>COOH:NH<sub>2</sub> = 3/1:1</li> <li>COOH:EDC = 0,1/0,2:1</li> <li>EDC:NHS = 1:1</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Durée : 6 h</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Durée : 24 h</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Thermoprécipitation : 50 °C. Centrifugation puis suspension dans l'eau</li> <li>Dialyse 4 jours (4 °C) contre eau (MWCO 50 000 g/mol)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Lai &amp; Luo (2017)</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>CS : 98 % désacétylé Mw 150 000 g/mol</li> <li>pNIPAM-COOH : Mw 21 000 g/mol</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>10 % m/v MES pH 5</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>0,2/0,5/1 % m/v MES pH 5</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>COOH:NH<sub>2</sub> = 2/5/11:1</li> <li>COOH:EDC = 0,1:1</li> <li>EDC:NHS = 0,2:1</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>—</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Durée : 12 h, 25 °C, 180 rpm</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Thermoprécipitation : NaCl 3 M, 50 °C, 30 min. Centrifugation 12 000 g (20 min) puis suspension dans MES. Répété 3 fois</li> <li>Dialyse 4 jours (4 °C) (MWCO 50 000 g/mol)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Chen &amp; Cheng (2006)</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>CS : 95 % désacétylé Mw 700 000 g/mol</li> <li>pNIPAM-COOH : Mn 2 000 g/mol</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>1,2/14,7/29,4 g eau</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>0,5 g eau</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>COOH:NH<sub>2</sub> = 4/0,3/0,2:1</li> <li>COOH:EDC = 0,07/0,8/2:1</li> <li>EDC:NHS = 1:1</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>—</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Durée : 24 h, 4 °C</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Dialyse contre eau</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Luckanagul et al. (2018)</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>CS-Alginate : 23 % désacétylé (film) Mn 1 300 000 g/mol</li> <li>pNIPAM-COOH : Mw 5 000 g/mol</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>0,8 % m/v DMSO</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>100 g DMSO</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>COOH:EDC = 0,04:1</li> <li>EDC:NHS = 2:1</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Durée : 3 h</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Durée : 12 h</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Lavage au DMSO (2 fois)</li> <li>Lavage EtOH (2 fois)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Conzatti et al. (2019)</li> </ul>

#### 4.2.3.2. Potentiel des hydrogels polysaccharide-pNIPAM greffés en ingénierie tissulaire du cartilage

Le potentiel des polymères polysaccharide-pNIPAM greffés a été testé *in vitro*, *ex vivo*, et *in vivo*. À titre d'exemples, voici quelques applications en ingénierie tissulaire du cartilage d'hydrogels thermosensibles à base de ces polymères.

Chen & Cheng (2006) ont développé des hydrogels thermosensibles constitués de chitosane (Mw  $150 \times 10^3$  g/mol, 98 % désacétylé) greffé par du pNIPAM (Mw  $21 \times 10^3$  g/mol). Évalués en culture monocouche 2D et en culture 3D de chondrocytes et cellules du ménisque de lapin, les hydrogels (10 % m/v) ont montré des effets bénéfiques sur la viabilité cellulaire, la morphologie et le phénotype des cellules.

Peroglio et al. (2012) ont testé *in vitro* des hydrogels d'acide hyaluronique-pNIPAM (Mn HA :  $1,7 \times 10^6$  g/mol, Mn pNIPAM :  $10/20/35 \times 10^3$  g/mol), destinés à la régénération du disque intervertébral (DIV). Les études *in vitro* ont été réalisées en présence de cellules du noyau pulpeux bovins, issu du DIV. La cytocompatibilité en présence de l'hydrogel d'HA-pNIPAM a dans un premier été confirmée. La viabilité de même que la morphologie des cellulesensemencées dans les hydrogels (10 % m/v) ont été maintenues pendant 7 jours, en particulier pour l'hydrogel dont l'acide hyaluronique a été greffé avec du pNIPAM de Mn 20 000 g/mol. La surexpression des gènes impliqués dans la synthèse d'agrécan a également été observée.

Des résultats similaires ont été rapportés par Wang et al. (2018) pour des hydrogels d'HA-pNIPAM. Contrairement à l'hydrogel de pNIPAM pur, les cellules souches du tissu adipeuxensemencées dans les hydrogels HA-pNIPAM présentaient une meilleure viabilité cellulaire avec une bonne expression des marqueurs chondrogéniques (agrécan et collagène de type II). *In vivo* dans un modèle de lapin, les cellulesensemencées dans l'hydrogel d'HA-pNIPAM (5 % m/v) présentaient un potentiel chondrogénique supérieur aux cellules intégrées à l'hydrogel de pNIPAM pur avec la formation du néotissu cartilagineux.

D'Este et al. (2012) ont développé un hydrogel d'HA (Mn  $1,6 \times 10^6$  g/mol) conjugué par du pNIPAM (Mn  $40 \times 10^3$  g/mol). La formulation testée *in vivo* (11 % m/v) sur le lapin présentait un comportement cohésif et une prise rapide dans le défaut ostéochondral. Après 12 semaines, un tissu cartilagineux riche en protéoglycane caractérisé par une bonne intégration au cartilage existant a été observé. Aucun signe d'inflammation ou de toxicité

locale ou systémique n'a été relevé. Les résultats permettent de conclure que l'hydrogel thermosensible d'HA-pNIPAM est cytotcompatible et n'interfère pas avec la guérison intrinsèque des défauts ostéochondraux dans un modèle de lapin et semble donc prometteur pour de futures investigations.

## **Chapitre II**

# **Conception & Caractérisation d'un EPS thermosensible**

---



## 1. Introduction

Les glycosaminoglycanes (GAG) sont des constituants essentiels de la matrice extracellulaire (MEC) impliqués dans les processus fondamentaux, cellulaires et tissulaires, *via* leurs interactions avec diverses protéines de signalisation. Pour optimiser la régénération tissulaire, le développement d'une matrice appropriée modulant les activités biologiques des cellules de la même manière que les GAG reste un défi à relever.

Dans ce contexte, ce chapitre II porte sur la conception d'un polysaccharide bioactif thermosensible destiné à être employé en tant qu'hydrogel injectable pour des applications en ingénierie tissulaire. Les objectifs sont donc (1) de greffer un polymère thermosensible, le poly(N-isopropylacrylamide) (pNIPAM) à l'infernane, un EPS bactérien marin doté de propriétés biologiques proches de celles des GAG, (2) d'évaluer les caractéristiques physico-chimiques de l'EPS greffé, EPS-pNIPAM, à savoir le degré de greffage, la masse molaire, la conformation et la morphologie des chaînes polysaccharidiques greffées et (3) de déterminer les propriétés thermosensibles de l'EPS-pNIPAM. La connaissance de ces caractéristiques à l'échelle moléculaire est essentielle pour bien comprendre la relation structure-propriétés fonctionnelles de ce nouveau polymère thermosensible dans le but de son utilisation future sous forme d'hydrogels injectables.

Souhaitant greffer de façon simple le pNIPAM sur l'infernane, le greffage chimique a été réalisé sur les acides uroniques de l'EPS, en particulier les groupements carboxyliques (Figure 27).

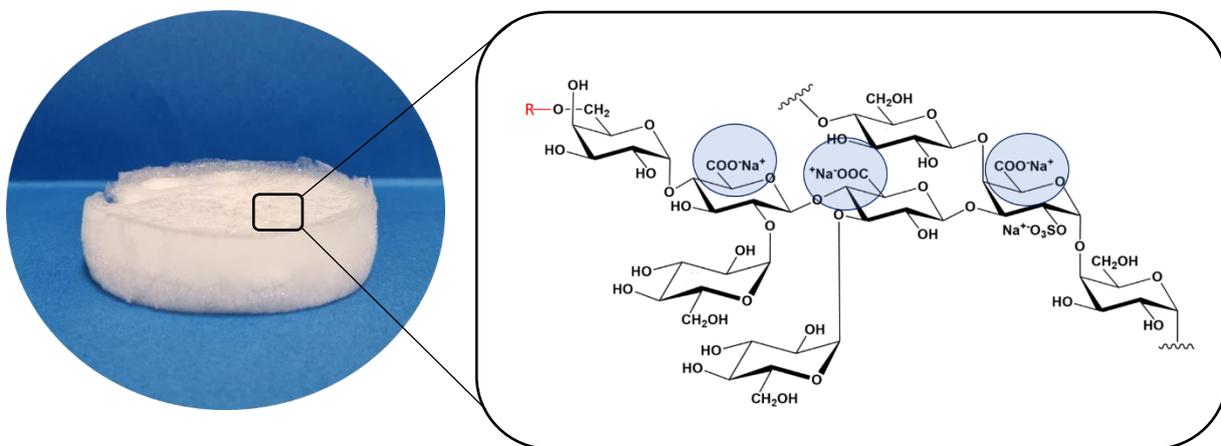


Figure 27. Photographie de l'EPS infernane lyophilisé et structure de l'unité répétitive octasaccharidique disulfate d'infernane (avec  $R = SO_3Na^+$ ). Les fonctions carboxyliques ciblées pour le greffage par le pNIPAM sont entourées en bleu.

Cependant, les fonctions carboxyliques ne sont pas particulièrement réactives en condition douce. Les agents réactionnels d'activation tels que le réactif de Mukaiyama, les sels d'uronium et les sels de phosphonium utilisés en condition drastique et/ou en produisant des dérivés toxiques ont été naturellement écartés (Montalbetti & Falque, 2005). Ainsi, la chimie des carbodiimides (EDC) en présence de NHS a été privilégiée compte tenu de sa simplicité et de ses conditions réactionnelles plus douces.

### 1.1. Essais préliminaires de greffage de l'EPS par le pNIPAM

À partir de l'étude bibliographique concernant le greffage du pNIPAM sur des polysaccharides par la chimie des carbodiimides résumé dans le chapitre précédent (I.4.2.3.1), des essais de greffage ont, dans un premier temps, été réalisés afin de définir les conditions de réaction adaptées à l'EPS.

#### 1.1.1. Stratégie 1 : greffage des acides carboxyliques de l'EPS par un pNIPAM-NH<sub>2</sub>

Parmi les fonctionnalisations des pNIPAM commercialement disponibles (pNIPAM-COOH, pNIPAM-NH<sub>2</sub>, pNIPAM-N<sub>3</sub>, pNIPAM-SH), l'utilisation d'un pNIPAM présentant une extrémité amine (-NH<sub>2</sub>) est particulièrement intéressante. En effet *in fine*, le greffage par la chimie des carbodiimides de l'extrémité amine du pNIPAM sur les acides carboxyliques (-COOH) des acides uroniques de l'EPS conduit, en une étape, à l'établissement d'un pont amide, particulièrement stable (Figure 28).

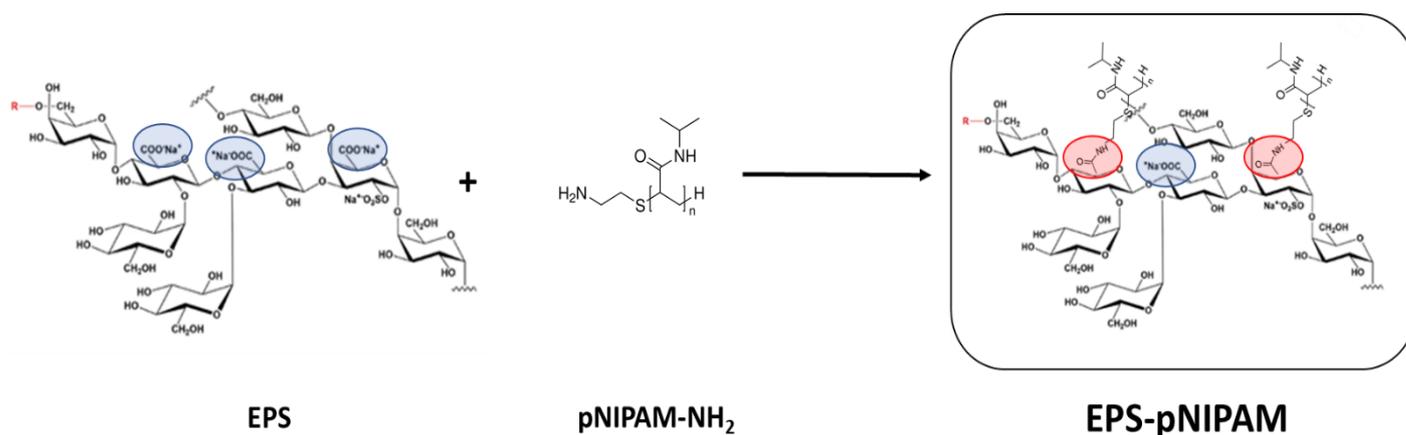


Figure 28. Réaction de greffage EPS/pNIPAM-NH<sub>2</sub> par la chimie des carbodiimides (EDC) en présence de NHS.

Pour cette première stratégie, un dérivé infernane de masse molaire moyenne en poids intermédiaire,  $M_w$  265 000 g/mol (EPS<sub>265</sub>), déterminée par chromatographie d'exclusion stérique haute performance (HPSEC) couplée à une détection de diffusion de lumière multi-angles et d'indice de réfraction (MALS-dRI), a été préparé par dépolymérisation radicalaire appliquée à l'EPS natif de haute masse molaire moyenne en poids ( $M_w$  2 000 000 g/mol). Pour fonctionnaliser ce dérivé, un pNIPAM-NH<sub>2</sub> commercial (Sigma Aldrich) de faible masse molaire moyenne en nombre ( $M_n$  5 500 g/mol) a été sélectionné car il est bien adapté à des applications biomédicales, étant excrétable par les reins (Bertrand et al., 2009).

Les premiers tests ont permis de fixer les conditions réactionnelles de solubilisation (tampon MES 50 mM, pH 4,8) et de réaction (20 °C, 250 rpm, volume réactionnel final de 2 mL). L'efficacité de la réaction des carbodiimides dépend notamment du ratio molaire COOH(EPS):NH<sub>2</sub>(pNIPAM) et COOH:EDC:NHS. Pour un ratio molaire COOH:EDC:NHS de 1:1:1, différentes masses de pNIPAM ont été employées (60 mg, 120 mg, 200 mg). Il a été observé qu'augmenter la quantité de pNIPAM entraînait une augmentation de la masse du produit final et donc supposément de la masse de pNIPAM greffée. La masse de pNIPAM utilisée est cependant limitée par le volume réactionnel final de 2 mL ce qui ne permet pas d'atteindre des excès molaires en amine importants (le rapport molaire COOH:NH<sub>2</sub> maximum testé était de 1:1,5). Les dérivés EPS<sub>265</sub>-pNIPAM obtenus ont ensuite été solubilisés en tampon phosphate (PBS, 10 % m/v). Le test de gélification réalisé à température physiologique (37 °C) en bain marie s'est révélé négatif avec seulement une augmentation de la viscosité. Cette absence de gélification pourrait provenir, d'une trop faible densité de greffage du pNIPAM et/ou d'une longueur des chaînes de l'EPS et/ou de pNIPAM-NH<sub>2</sub> trop courte pour favoriser l'établissement d'un réseau. Ainsi, sur la base de ces constatations, une seconde stratégie a été testée visant à évaluer l'impact de la masse molaire du pNIPAM et de l'EPS sur les propriétés de gélification.

### 1.1.2. Stratégie 2 : greffage des acides carboxyliques de l'EPS par un pNIPAM-COOH médié par un linker ADH.

Cette nouvelle stratégie consistait à greffer un pNIPAM de masse molaire moyenne en nombre deux fois plus élevée par rapport à celle du pNIPAM-NH<sub>2</sub> ( $M_n$  de 10 000 g/mol), d'une part sur le dérivé EPS<sub>265</sub> utilisé précédemment, et d'autre part, sur l'infernane natif de masse

moléculaire moyenne en poids quatre fois supérieure à celle de l'EPS<sub>265</sub> (HPSEC-MALS-dRI, Mw 1 100 000 g/mol, EPS<sub>100</sub>). Cependant, ce pNIPAM disponible commercialement possède une extrémité carboxylique (pNIPAM-COOH) qui requiert l'utilisation d'un linker intermédiaire pour permettre le greffage entre les groupements carboxyliques de l'EPS et du pNIPAM. Ainsi, l'acide adipique dihydrazide (ADH), qui permet l'établissement de ponts hydrazides entre ces groupements par le biais de la chimie EDC/NHS a été sélectionné. Décrit pour le greffage de pNIPAM-COOH sur d'autres polysaccharides à groupements carboxyliques tels que l'acide hyaluronique (Yao et al., 2013) ou l'alginate (Tan et al., 2012), le greffage par l'ADH présente cependant quelques limitations. En effet, comme l'ADH possède deux extrémités hydrazides, la réaction de couplage EPS-COOH/ADH/pNIPAM-COOH doit être réalisée en deux étapes. Dans un premier temps, une première extrémité hydrazide est greffée sur les acides carboxyliques de l'EPS (Figure 29.A), puis une seconde extrémité interagit avec le groupement carboxylique du pNIPAM-COOH (Figure 29.B). Cependant, comme l'infernane est riche en acide uronique, la seconde extrémité hydrazide pourrait se greffer sur un acide carboxylique appartenant à la même chaîne de l'EPS (pontage intra-chaîne) ou à une autre chaîne

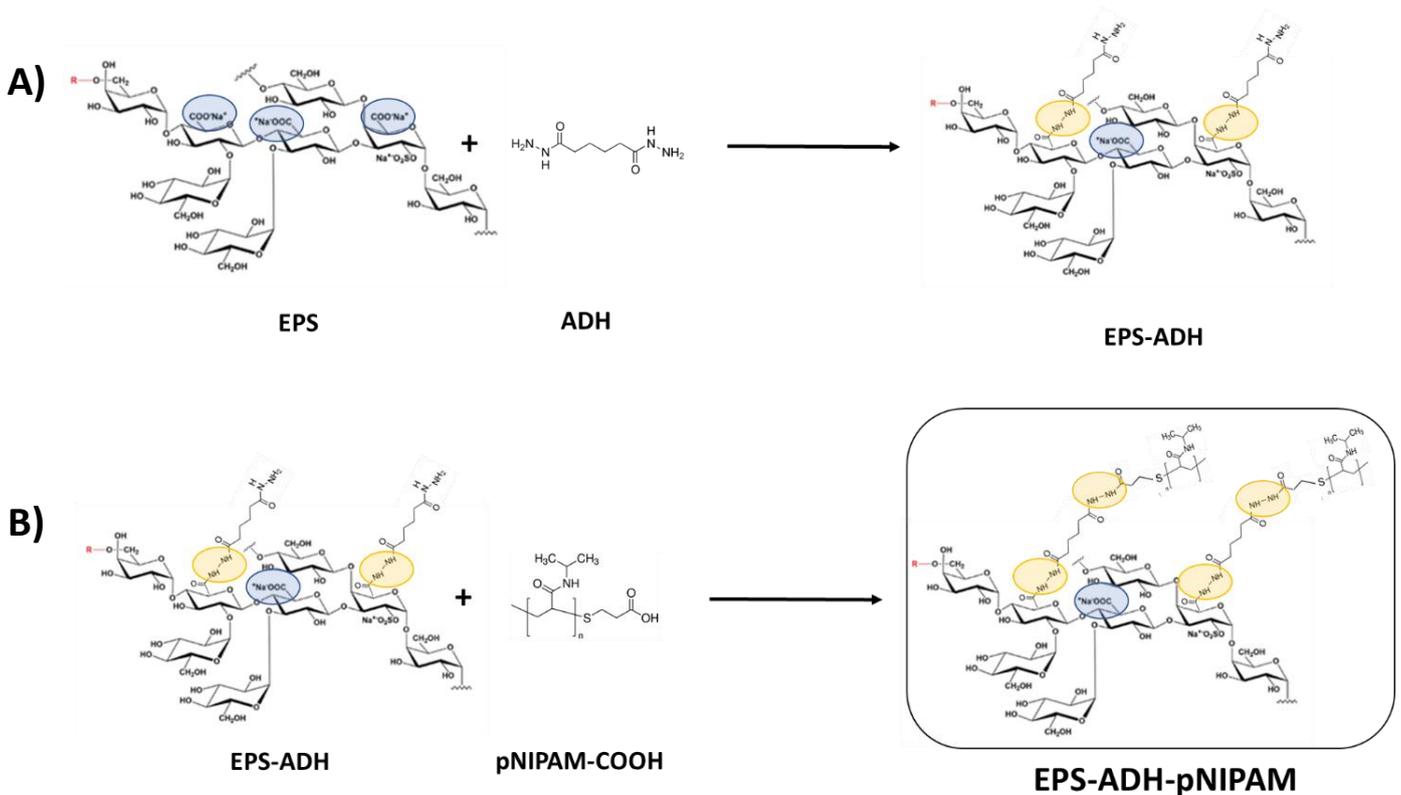


Figure 29. Réaction de greffage EPS/pNIPAM-COOH par la chimie des carbodiimides (EDC) en présence de NHS. A) Première étape permettant le greffage d'une extrémité ADH sur l'EPS. B) Deuxième étape permettant le greffage du pNIPAM-COOH sur l'extrémité ADH restante de l'EPS-ADH.

polysaccharidique (pontage inter-chaîne) dès la première étape de réaction. Cette méthode est par ailleurs parfois employée afin d'améliorer les propriétés mécaniques d'hydrogels de polysaccharides (Šedová et al., 2019; Yang et al., 2020). Cependant, dans le cas précis du greffage du pNIPAM-COOH, les extrémités hydrazides ne seraient plus disponibles diminuant l'efficacité de la deuxième étape de réaction. Les pontages inter-chaîne mèneraient à la formation d'un agrégat d'EPS (auto-assemblé par l'ADH) de masse molaire supérieure à l'EPS seul. Ces réactions parasites ont été observées, en particulier, dans le cas du greffage de l'infernane natif de haute masse molaire moyenne  $M_w$  1 100 000 g/mol (EPS<sub>1100</sub>), comme le montre l'augmentation de la masse molaire moyenne du composé EPS<sub>1100</sub>-ADH vis-à-vis de l'EPS natif en HPSEC-MALS-dRI (Tableau VII). En effet, la masse molaire moyenne de l'EPS natif greffé avec de l'ADH a été multipliée par 3. Cette augmentation, beaucoup plus importante que celle attendue (1,04, soit 1 140 000 g/mol) pour la fonctionnalisation de l'EPS par l'ADH, molécule de faible masse molaire (174,2 g/mol), suggère l'existence de pontages entre les chaînes polysaccharidiques *via* ce linker. Bien que des hydrogels d'EPS-ADH-pNIPAM ont été obtenus à 37 °C pour l'EPS natif  $M_w$  1 100 000 g/mol uniquement (contrairement aux EPS<sub>265</sub>-ADH-pNIPAM), le manque de contrôle de ces réactions de pontages parasites intra et inter-chaînes nous a conduits à abandonner cette stratégie de greffage.

**Tableau VII.** Masse molaire moyenne en poids ( $M_w$ ), polydispersité et rayon de giration ( $R_g$ ) du dérivé infernane 265 000 g/mol (EPS<sub>265</sub>) et de l'EPS natif 1 100 000 g/mol (EPS<sub>1100</sub>) avant ou après greffage par l'acide adipique dihydrazide (ADH), obtenus en HPSEC-MALS-dRI.

	<b><math>M_w</math> (g/mol)</b>	<b>Polydispersité (<math>M_w/M_n</math>)</b>	<b><math>R_g</math> (nm)</b>
<b>EPS<sub>265</sub></b>	265 000	1,5	36
<b>EPS<sub>265</sub>-ADH</b>	350 000	1,9	36
<b>EPS<sub>1100</sub></b>	1 100 000	1,2	94
<b>EPS<sub>1100</sub>-ADH</b>	3 515 000	1,6	145

### 1.1.3. Modification de la stratégie 1

L'optimisation de la stratégie 1 de greffage des groupements carboxyliques de l'EPS par un pNIPAM-NH<sub>2</sub> en une seule étape (ne nécessitant aucun linker) a été privilégiée. Une hypothèse expliquant l'absence de gélification des dérivés EPS<sub>265</sub>-pNIPAM précédemment obtenus pouvait provenir d'une trop faible densité de greffage et d'une longueur trop courte de chaînes d'EPS. Ainsi, afin d'améliorer le greffage, le nombre d'ajouts d'EDC/NHS et le ratio molaire COOH:EDC:NHS ont été modifiés :

- 1 ajout en 24 h de EDC/NHS selon 1:1:1
- 1 ajout en 24 h de EDC/NHS selon 1:10:10
- 4 ajouts en 96 h (un par 24 h) de EDC/NHS selon 1:1:1
- 4 ajouts en 96 h (un par 24 h) de EDC/NHS selon 1:10:10

Ces conditions ont été appliquées au dérivé d'EPS<sub>265</sub> et à l'EPS natif de haute masse molaire moyenne Mw 1 100 000 g/mol, EPS<sub>1100</sub>, utilisé pour la chimie ADH.

Il s'est avéré que le nombre d'ajouts (en une ou quatre fois) du réactif EDC/NHS pour le ratio molaire 1:1:1 n'a eu aucun impact sur la masse du produit final (Figure 30). L'augmentation du ratio molaire COOH:EDC:NHS de 1:1:1 à 1:10:10 (un seul ajout) n'a eu également aucun impact sur la masse finale obtenue au terme de la réaction. A l'inverse, quatre ajouts d'EDC/NHS au ratio molaire 1:10:10 ont permis d'obtenir une masse finale plus importante, mais le composé après lyophilisation est insoluble. De plus, au cours de la réaction, une gélification de la solution a été observée, après le deuxième ajout 1:10:10, impliquant certainement l'établissement de ponts esters ou anhydrides médié par l'EDC respectivement entre les groupements hydroxyles/carboxyles ou carboxyles/carboxyles de la chaîne d'EPS, ce qui est parfois décrit lors de l'utilisation en excès d'EDC (Madison & Carnali, 2013; Neises & Steglich, 1978).

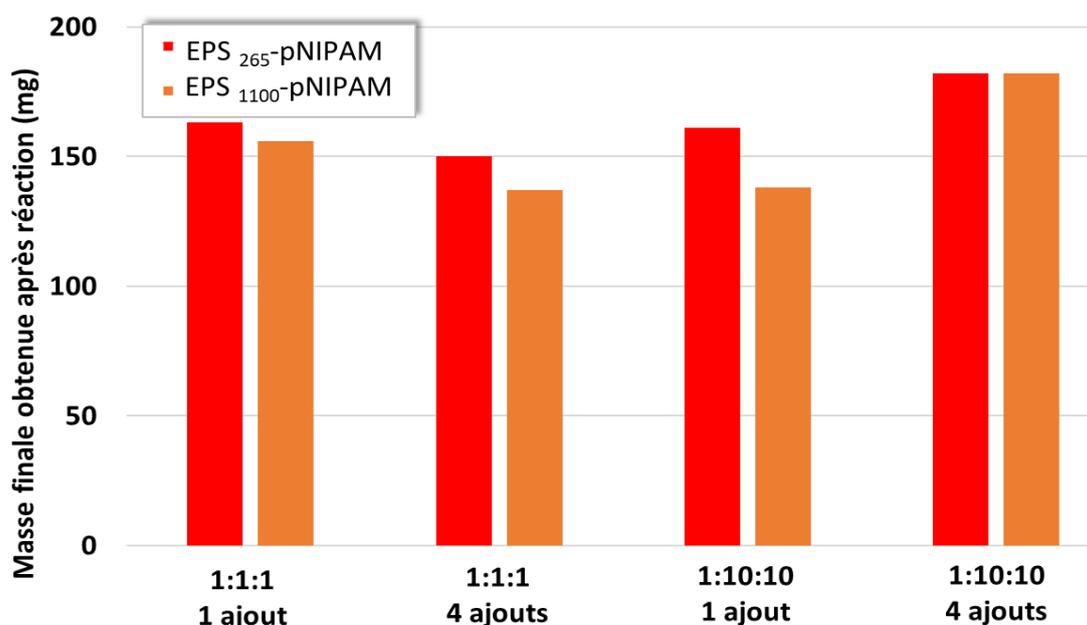


Figure 30. Masse finale obtenue après réaction du dérivé infernane 265 000 g/mol (EPS<sub>265</sub>) et de l'EPS natif 1 100 000 g/mol (EPS<sub>1100</sub>) avec le pNIPAM-NH<sub>2</sub> (5 500 g/mol) par la chimie des carbodiimides (EDC) en présence de NHS ajoutés en une ou quatre fois (tous les 24 h) selon un ratio molaire COOH:EDC:NHS de 1:1:1 ou 1:10:10.

Malgré les modifications réalisées, les dérivés d'EPS<sub>265</sub>-pNIPAM n'ont pas gélifié à 37 °C contrairement aux EPS<sub>1100</sub>-pNIPAM. Ceci confirme l'importance de la masse molaire moyenne des chaînes de l'EPS qui, une fois greffées par le pNIPAM, doivent permettre la formation d'un réseau moléculaire caractéristique d'un hydrogel à la température proche de la LCST du pNIPAM (~ 32 °C). Considérant la longueur de la chaîne de pNIPAM et la concentration en solution (PBS, 10 % m/v), la taille des chaînes du dérivé EPS<sub>265</sub> semble insuffisante. Afin d'élucider la masse molaire de chaînes d'EPS minimum nécessaire à la gélification, des conditions de réactions similaires (ratio molaire COOH:EDC:NHS = 1:1:1) ont été appliquées, d'une part sur l'infernane de masse molaire moyenne Mw 500 000 g/mol (EPS<sub>500</sub>) et d'autre part, sur l'infernane natif de haute masse molaire moyenne, Mw 2 000 000 g/mol (EPS<sub>2000</sub>) déterminées par HPSEC-MALS-dRI. Aucune gélification n'a été observée pour les solutions de EPS<sub>500</sub>-pNIPAM, contrairement aux EPS<sub>2000</sub>-pNIPAM, capables de former un gel à 37 °C. Ainsi, il semble que le « seuil » limite de masse molaire moyenne de l'infernane requise afin d'observer la gélification thermo-induite de l'EPS greffé soit proche de 1 000 000 g/mol. En tenant compte de ces résultats préliminaires, seul l'EPS natif de haute masse molaire moyenne Mw 1 100 000 g/mol a été sélectionné pour étudier l'effet de la densité de greffage de pNIPAM sur les caractéristiques physico-chimiques et les propriétés thermosensibles des polymères greffés EPS-pNIPAM. L'influence de la longueur des chaînes du pNIPAM sur ces propriétés a également été évaluée par l'utilisation de pNIPAM-NH<sub>2</sub> de deux masses molaires moyennes distinctes, Mn 5 500 g/mol et 20 000 g/mol.



## 2. Matériels et méthodes

### 2.1. Production de l'inferrane natif par fermentation d'*Alteromonas inferrus* et caractérisation physico-chimique.

La production de l'EPS inferrane utilisé pour ces travaux de thèse a été réalisée en amont par fermentation d'*Alteromonas inferrus* (dans les conditions décrites par Raguénès et al. (1997)), de même que sa caractérisation. L'EPS natif a été caractérisé par sa composition en monosaccharide par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme selon la méthode de Kamerling et al. (1975) modifiée par Montreuil et al. (1986). Sa teneur en sulfate a été quantifiée par chromatographie haute performance d'échange-d'anions (Chopin et al., 2015) et sa masse molaire moyenne a été évaluée par Frit inlet-asymmetrical flow field-flow fractionation (FI-AF4) couplé à des détecteurs MALS-dRI (voir II.2.3.2).

### 2.2. Greffage de pNIPAM-NH<sub>2</sub> sur l'inferrane natif par la chimie des carbodiimides

Les polymères EPS-pNIPAM ont été préparés par le greffage de la terminaison amine (-NH<sub>2</sub>) de pNIPAM-NH<sub>2</sub> commerciaux sur les fonctions carboxyles (-COOH) des acides uroniques (AU) de l'EPS natif, par la chimie des carbodiimides en utilisant l'EDC/NHS comme agents de couplage. Deux masses molaires moyennes de pNIPAM-NH<sub>2</sub> ont été utilisées : Mn 5 500 g/mol (p5) (Sigma Aldrich, États-Unis) et Mn 20 000 g/mol (p20) (Polymer Source, Canada). Différents ratios molaires COOH(EPS):NH<sub>2</sub>(pNIPAM) ont été appliqués : 1:1,5 ; 1:1,0 ; 1:0,47 ; 1:0,29 et 1:0,83 ; 1:0,43 ; 1:0,26 ; 1:0,16 pour les réactions de couplage EPS/p5 et EPS/p20, respectivement (Tableau VIII), dans le but d'obtenir quatre polymères EPS-pNIPAM différents pour les deux masses molaires moyennes de pNIPAM. Le greffage EPS/pNIPAM a été réalisé en triplicat. Afin de démontrer l'impact du greffage EPS/pNIPAM sur les polymères formés (conformation, propriétés physico-chimiques, LCST, gélification), la condition avec le rapport molaire EPS:p5 le plus élevé (1:0,29, condition 4) a également été réalisée sans ajout d'EDC/NHS pour générer la condition 4 bis (EPS-p5-0%), c'est-à-dire un mélange sans greffage covalent entre l'EPS et le pNIPAM.

Pour le greffage d'infernane, EPS et pNIPAM-NH<sub>2</sub> ont été solubilisés séparément dans 1 mL de tampon MES (50 mM, pH 4,8) à température ambiante. Après 24 h, les deux solutions ont été mélangées, puis EDC et NHS ont été ajoutés (sauf pour la condition 4 bis). Le mélange réactionnel a été agité à 250 rpm pendant 6 h à 20 °C puis un nouvel ajout d'EDC/NHS a été réalisé afin d'accentuer le greffage pNIPAM-NH<sub>2</sub>. Le rapport molaire final COOH:EDC:NHS, était de 1:1,6:1,6. Après une nuit d'incubation, les produits finaux ont été dialysés (MWCO 50 000 g/mol) contre du NaCl 0,3 M (24 h) puis de l'eau osmosée (48 h) pour éliminer à la fois les agents de couplage, les dérivés urée formés et le pNIPAM non greffé, et enfin lyophilisés (Figure 31).

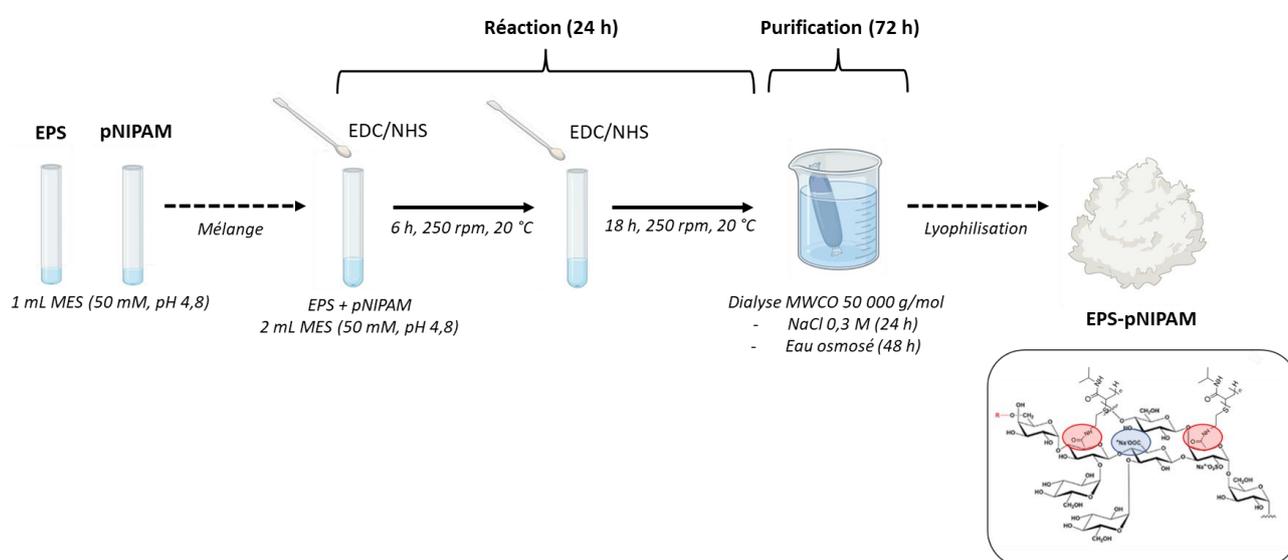


Figure 31. Schéma des différentes étapes permettant le greffage de l'EPS par le pNIPAM-NH<sub>2</sub>

Tableau VIII. Conditions réactionnelles du greffage de pNIPAM-NH<sub>2</sub> (-NH<sub>2</sub>) sur l'EPS (-COOH) par la chimie des carbodiimides (EDC) en présence de NHS, pour un rapport molaire final COOH:EDC:NHS = 1:1,6:1,6 (sauf condition 4 bis). Mn p5, 5 500 g/mol ; Mn p20, 20 000 g/mol ; Mn EPS, 900 000 g/mol (d'après FI-AF4-MALS-dRI) ; M unité répétitive d'EPS, 1587 g/mol avec 3 résidus AU (forme sodique) ; nombre d'unité répétitive total = 567.

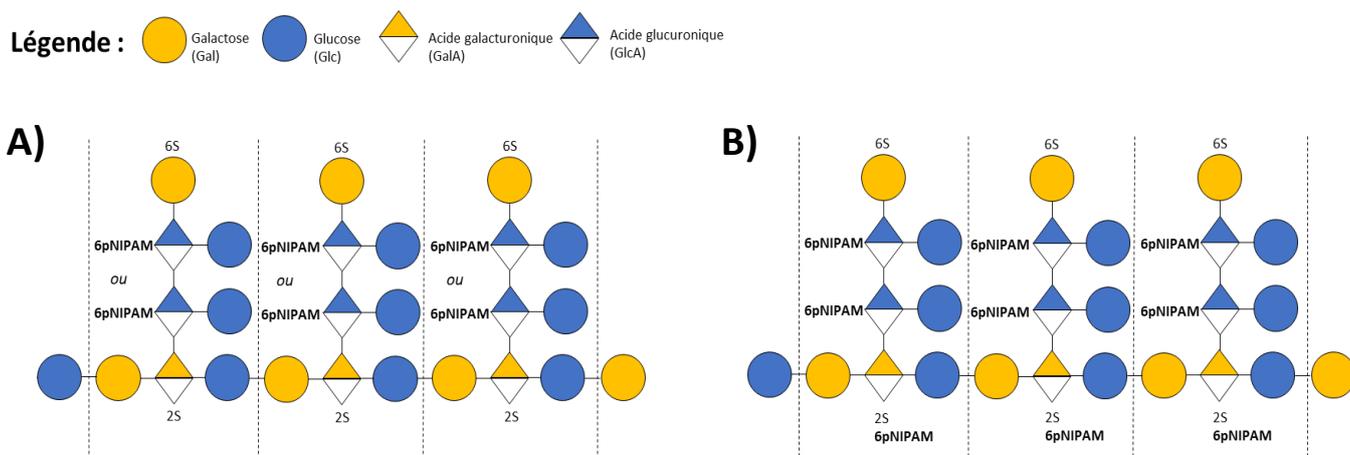
Condition de réaction	Désignation finale des polymères	EPS (mg)	COOH d'EPS (10 <sup>-5</sup> mol) <sup>(a)</sup>	pNIPAM-NH <sub>2</sub> (mg)	NH <sub>2</sub> de pNIPAM-NH <sub>2</sub> (10 <sup>-5</sup> mol)	Ratio molaire COOH:NH <sub>2</sub>
1	EPS-p5-16 %	10	1,9	161	2,9	1:1,5
2	EPS-p5-8%	20	3,8	200	3,6	1:1,0
3	EPS-p5-3%	40	7,6	200	3,6	1:0,47
4/4 bis	EPS-p5-2%/0%	40	7,6	120	2,2	1:0,29
5	EPS-p20-6%	5	0,95	151	0,76	1:0,83
6	EPS-p20-3%	10	1,9	161	0,81	1:0,43
7	EPS-p20-1%	20	3,8	200	1,0	1:0,26
8	EPS-p20-0,2 %	20	3,8	120	0,60	1:0,16

$$(a) \text{ COOH d'EPS (mol)} = \frac{Mn \text{ EPS}}{M \text{ unité répétitive d'EPS}} \times 3 \text{ AU dans l'unité répétitive} \times \text{mol EPS}$$

## 2.3. Caractérisation moléculaire des polymères greffés EPS-pNIPAM

### 2.3.1. Simulations de dynamique moléculaire (DM)

Dans le cadre d'une collaboration, des simulations de dynamique moléculaire (DM) ont été réalisées par la Dr. Olga Makshakova (Institut de Biochimie et Biophysique de Kazan, Russie) et le Dr. Serge Perez (CERMAV, Grenoble), afin d'évaluer, d'une part, la disponibilité des AU de l'EPS pour le greffage du pNIPAM, et pour étudier, d'autre part, l'influence des interactions à courte portée entre les chaînes de pNIPAM greffées à l'infernane. La configuration initiale de l'infernane a été construite selon la séquence décrite en Figure 27, (montrant la structure chimique de l'infernane) et en utilisant les angles de torsion équilibrés rapportés dans Makshakova et al. (2022). La structure du squelette d'infernane a été limitée à quatre unités répétitives et trois chaînes latérales. Le degré de polymérisation du pNIPAM était de 21. Deux systèmes moléculaires ont été construits (Figure 32) : A) un squelette d'infernane ramifié, partiellement greffé à l'un des deux résidus GlcA de la chaîne latérale (trois chaînes de pNIPAM pour neuf AU disponibles) et B) un squelette d'infernane ramifié, entièrement greffé aux trois résidus AU (1 GalA et 2 GlcA) par unité répétitive (neuf chaînes de pNIPAM pour neuf AU). Les deux systèmes moléculaires schématisés sur la Figure 32 ont été placés dans une boîte rectangulaire contenant de l'eau avec des dimensions proportionnelles à la taille de la molécule étudiée, en imposant des conditions limites périodiques. Des ions sodium ont été ajoutés pour neutraliser la charge du système moléculaire (Tableau IX).



**Figure 32. Représentation schématique des systèmes moléculaires d'infernane greffé construits pour les simulations de dynamique moléculaire. A) Squelette infernane ramifié partiellement greffé à l'un des deux acides glucuroniques (GlcA) de la chaîne latérale (trois chaînes de pNIPAM pour neuf AU) et B) squelette infernane ramifié entièrement greffé aux trois résidus AU par unité répétitive (neuf chaînes de pNIPAM pour neuf AU).**

Tableau IX. Composition des systèmes moléculaires étudiés en simulation de DM (A) et B) Figure 32). La structure de l'infernane est limitée à 4 unités répétitives (dont 3 chaînes latérales). La structure du pNIPAM est limitée à 21 unités répétitives.

		Nombre de résidus du squelette infernane	Nombre de résidus totaux de l'infernane (squelette + chaînes latérales)	Nombre d'unités répétitives pNIPAM	Nombre d'ions sodium Na <sup>+</sup>	Nombre de molécules d'eau	Nombre total d'atomes
0)	Infernane natif ramifié	12	27	0	17	8 427	25 869
A)	Infernane ramifié greffé par 3 chaînes de pNIPAM sur les GlcA latéraux	11	26	63	12	22 292	68 662
B)	Infernane ramifié greffé par 9 chaînes de pNIPAM sur l'ensemble des acides uroniques	11	26	189	6	43 486	134 685

A)

Linker		NIPAM	
Atome	Charge partielle	Atome	Charge partielle
C6	0,6250	C2	0,0663
O6	-0,3730	H4	-0,0215
N1	-0,6016	H5	-0,0215
H1	0,3535	C3	-0,0249
C1	0,2983	H6	0,0275
H3	0,0156	C4	0,5338
H4	0,0156	O1	-0,5386
C2	-0,0807	N1	-0,6114
H5	0,0857	H7	0,3358
H6	0,0857	C5	0,4774
S	-0,2929	H8	0,0389
		C6	-0,5206
		H9	0,1299
		H10	0,1299
		H11	0,1299
		C7	-0,5206
		H12	0,1299
		H13	0,1299
		H14	0,1299

B)

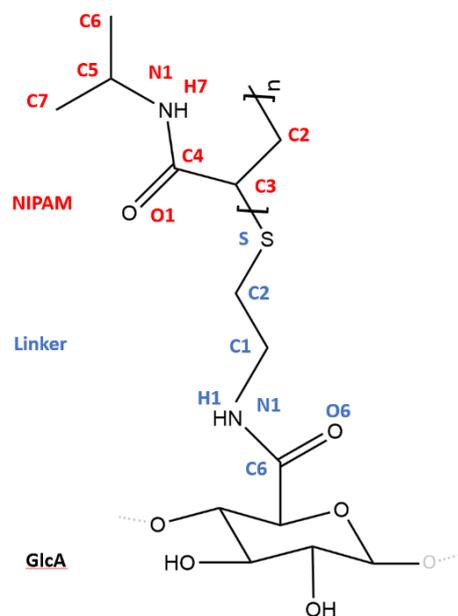


Figure 33. A) Charges partielles dérivées du champ de force AMBER. Les charges atomiques partielles ont été dérivées des calculs de mécanique quantique au niveau B3LYP/6-31\* en utilisant la méthode du potentiel électrostatique restreint (RESP), puisque les charges RESP sont fortement connectées au champ de force AMBER (Cornell et al., 1995) et au champ de force GLYCAM (Kirschner et al., 2008). Les paramètres d'interactions-liées pour le groupe amide formé à l'interface des deux champs de force utilisés (GLYCAM06j pour les AU et GAFF pour le linker) ont été tirés du champ de force Amber14SB. B) Schéma de l'infernane greffé par du pNIPAM sur un résidu latéral GlcA. Les charges partielles sont données en A).

Les simulations ont été réalisées à l'aide du progiciel AMBER18 (Case et al., 2018). Les paramètres de champ de force GLYCAM06j (Kirschner et al., 2008) ont été utilisés pour décrire la structure du polysaccharide et ceux du champ de force GAFF (ang. general AMBER force field) pour le fragment pNIPAM (Wang et al., 2006, 2004) (Figure 33). Le champ de force AMBER (ang. assisted model building and energy refinement) et le modèle TIP3P ont été utilisés pour modéliser les molécules d'eau et les ions, respectivement. Un pas de temps de 2 fs a été appliqué avec l'algorithme SHAKE (Ryckaert et al., 1977) sur l'ensemble des liaisons impliquant des atomes d'hydrogène. La sommation d'Ewald (Essmann et al., 1995) a été utilisée pour traiter les interactions électrostatiques à longue portée avec un seuil de coupure de 8 Å. Les simulations ont été réalisées sur des systèmes totalement relaxés dans l'ensemble thermodynamique isotherme isobare (NPT) à 300 K avec des trajectoires de l'ordre de 400 ns. La température et la pression ont été maintenues constantes en utilisant un thermostat Langevin avec une fréquence de collision de 2 ps<sup>-1</sup> et un algorithme anisotrope à couplage faible avec un temps de relaxation de 2 ps, respectivement. Le logiciel de visualisation atomique VMD a été utilisé pour la représentation graphique (Humphrey et al., 1996)

### 2.3.2. Frit Inlet-Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation couplé à des détecteurs de diffusion de la lumière multi-angle et d'indice de réfraction (FI-AF4-MALS-dRI)

La technique FI-AF4-MALS-dRI (Plateforme Toulouse Field-Flow Fractionation center (TFFFC), Ecole d'Ingénieur de Purpan, Toulouse) a été appliquée pour caractériser le degré de greffage d'infernane par le pNIPAM, la masse molaire moyenne des polysaccharides greffés et leur conformation en solution après séparation en fonction du coefficient de diffusion des polymère. L'instrument AF4 était un système de séparation Eclipse AF4 (Wyatt Technology Europe, Allemagne) couplé à un détecteur de diffusion de la lumière multiangles Dawn Heleos II 8+ à 8 angles (Wyatt Technology, États-Unis) fonctionnant à une longueur d'onde de 662 nm. Ce système a été calibré avec du toluène et normalisé à partir du retard inter-détecteur et du calcul d'élargissement de pic d'une albumine de sérum bovin (Mw 66 400 g/mol). Un détecteur d'indice de réfraction différentiel Optilab T-Rex (Wyatt Technology, États-Unis) fonctionnant à une longueur d'onde de 658 nm a également été utilisé. Les analyses FI-AF4 ont été effectuées à l'aide d'un système HPLC Thermo Scientific Dionex UltiMate3000 avec pompe et échantillonneur automatique thermostaté à 20 °C. Un canal composé d'une

membrane de cellulose régénérée (MWCO 5 000 g/mol) avec un espaceur de 350  $\mu\text{m}$  a été utilisé. Tous les EPS greffés et EPS non greffés (natif et EPS-p5-0%) ont été préparés en maintenant la concentration en polysaccharide constante à 1 mg/mL dans de l'acétate d'ammonium 0,1 M. Les pNIPAM, p5 et p20, ont également été préparés à 1 mg/mL dans de l'acétate d'ammonium 0,1 M. Les injections (50  $\mu\text{L}$  à 0,2 mL/min) ont été réalisées en triplicat pour chaque échantillon séparé par un blanc pour la correction de la ligne de base. Le débit du détecteur a été maintenu constant à 1 mL/min. Au début de l'élution (dans de l'acétate d'ammonium 0,1 M), le flux croisé a été maintenu à 2 mL/min pendant 2 min. Il a ensuite été diminué de façon exponentielle de 2 mL/min à 0,04 mL/min en 18 min. Le flux croisé a été maintenu constant à 0,04 mL/min pendant 20 min supplémentaire et finalement réduit à 0 mL/min pendant 2 min. Les données collectées ont été analysées à l'aide du logiciel Astra 7.1.2 avec un ajustement de Zimm pour les échantillons de pNIPAM (p5 et p20) et un ajustement polynomial du second ordre de Berry pour les échantillons d'EPS et d'EPS greffés. L'incrément d'indice de réfraction,  $dn/dc$ , a été mesuré 2 fois à partir d'une gamme de dilution de 2 solutions mère à 1 mg/mL (acétate d'ammonium 0,1 M) pour l'EPS ( $0,1267 \pm 0,001$ ), le p5 ( $0,1717 \pm 0,0001$ ) et le p20 ( $0,1763 \pm 0,0001$ ). La valeur moyenne de  $dn/dc$  de 0,1740 a ensuite été utilisée pour les échantillons pNIPAM. Le  $dn/dc$  des EPS a également été utilisé pour les EPS greffés.

### 2.3.3. Dosages spectroscopiques

#### 2.3.3.1. Fluorescamine

La présence de pNIPAM-NH<sub>2</sub> résiduel a été évaluée par une méthode fluorimétrique. Ce dosage est basé sur la réaction entre les amines primaires du pNIPAM-NH<sub>2</sub> (disponibles lorsqu'elles ne sont pas greffées) et la fluorescamine qui aboutit à la formation d'un fluorophore (Figure 34). La fluorescence est proportionnelle à la concentration en amine primaire et traduit donc la présence potentielle de pNIPAM-NH<sub>2</sub> libre, non greffé.

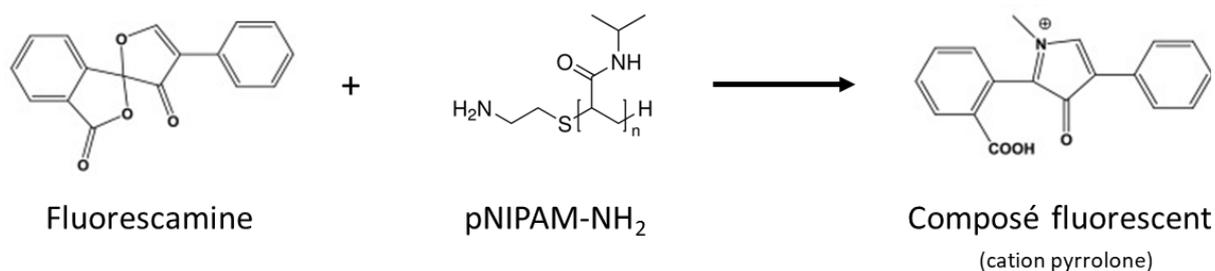


Figure 34. Principe du dosage à la fluorescamine pour la quantification du pNIPAM-NH<sub>2</sub> libre.

Les échantillons ont été solubilisés à 1 mg/mL dans l'eau ou des tampons PBS, borate ou bicarbonate de sodium (0,1 M, pH 8,5) pendant 24 h. En microplaque de polypropylène, la réaction a été initiée par l'ajout de 40  $\mu$ L de fluorescamine (0,3 mg/mL, acétone) à 100  $\mu$ L d'échantillon (en triplicat). Après 10 min, la fluorescence a été mesurée au spectrophotomètre UV-visible (Varioskan LUX, ThermoFisher) (excitation : 380 nm ; émission : 465 nm) contre une gamme de pNIPAM-NH<sub>2</sub> (0 à 0,4 mg/mL, tampon) et des solutions d'EPS dans de l'eau ou tampon approprié.

### 2.3.3.2. TNBS

La présence de pNIPAM-NH<sub>2</sub> non greffé a également été évaluée par une méthode colorimétrique. Ce dosage est basé sur la réaction entre les amines primaires du pNIPAM-NH<sub>2</sub> et l'acide picrylsulfonique aussi appelé acide trinitrobenzènesulfonique (TNBS ou TNBSA) qui aboutit à la formation d'un chromophore orangé (Figure 35). L'absorbance est proportionnelle à la concentration en amine primaire et traduit donc la présence potentielle de pNIPAM-NH<sub>2</sub> libre, non greffé.

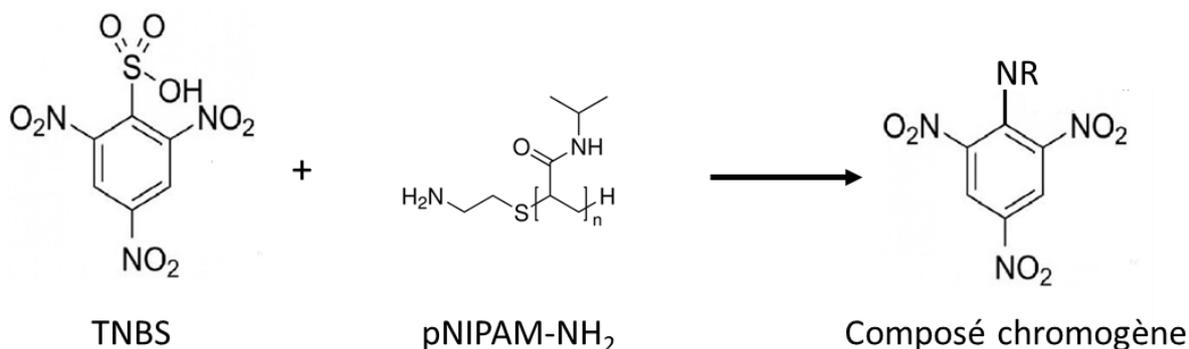


Figure 35. Principe du dosage au TNBS pour la quantification du pNIPAM-NH<sub>2</sub> libre.

Les échantillons ont été solubilisés à 1 mg/mL dans un tampon bicarbonate de sodium (0,1 M, pH 8,5) pendant 24 h. La réaction a été initiée par l'ajout de 50  $\mu$ L de TNBS (0,1 mg/mL, bicarbonate de sodium 0,1 M, pH 8,5) à 100  $\mu$ L d'échantillon (en triplicat). La microplaque a été chauffée au bain marie à 40 °C pendant 2 h. L'absorbance à 420 nm a été mesurée au spectrophotomètre UV-visible (Varioskan LUX, ThermoFisher) contre une gamme de pNIPAM-NH<sub>2</sub> (0 à 0,4 mg/mL, tampon bicarbonate de sodium 0,1 M, pH 8,5) et des solutions d'EPS comme blanc.

#### 2.3.4. Réflexion totale atténuée - Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (ATR-FTIR)

La nature des liaisons chimiques des polymères lyophilisés, EPS, pNIPAM (p5 et p20) et EPS-pNIPAM, a été déterminée par ATR-FTIR. Après réflexion totale d'un faisceau incident dans un cristal diamant, l'atténuation du signal à l'interface cristal-échantillon (moins dense que le cristal) est corrélée à l'absorption sélective d'énergie par les liaisons chimiques de l'échantillon. Les spectres ATR-FTIR issus des signaux interférogrammes détectés ont été acquis à l'aide d'un spectromètre VERTEX 70 FTIR (Bruker) en mode ATR, enregistrés dans la plage de 4 000 à 500  $\text{cm}^{-1}$  à une résolution de 4  $\text{cm}^{-1}$  (100 balayages par spectre) à l'aide du logiciel OPUS.

#### 2.3.5. Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Le greffage covalent EPS/pNIPAM a été analysé par RMN exploitant les propriétés magnétiques des noyaux atomiques. Dans le cadre d'une collaboration, les spectres 1D- $^1\text{H}$  et DOSY) et 2D-RMN (COSY et DEPT-HSQC) ont été mesurés par le Dr. Emiliano Bedini et la Dr. Serena Traboni (Université Federico II, Naples) pour les échantillons d'EPS, de pNIPAM (p5) et d'EPS-pNIPAM (EPS-p5-2% et EPS-p5-0%) à l'aide d'un spectromètre Bruker Avance-III ( $^1\text{H}$  : 600 MHz,  $^{13}\text{C}$  : 150 MHz) équipé d'une cryo-sonde en  $\text{D}_2\text{O}$  (acétone comme étalon interne,  $^1\text{H}$  :  $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$  à  $\delta$  2,22 ppm;  $^{13}\text{C}$  :  $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$  à  $\delta$  31,5 ppm) à 40 °C. Les données ont été traitées à l'aide du logiciel Bruker TopSpin 4.0.5. Des expériences COSY ont été réalisées en utilisant des largeurs spectrales de 5 000 Hz dans les deux dimensions et des ensembles de données de 2 048  $\times$  256 points. Les expériences  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -DEPT-HSQC ont été mesurées en mode  $^1\text{H}$  détecté *via* une cohérence quantique simple avec découplage des protons dans le domaine  $^{13}\text{C}$ , en utilisant des ensembles de données de 2 048  $\times$  256 points et généralement 100 incréments. Les expériences  $^1\text{H}$ -DOSY ont été mesurées avec un temps de diffusion de 100 ms.

## 2.4. Détermination des propriétés thermosensibles des polymères greffés EPS-pNIPAM

### 2.4.1. Spectroscopie UV-visible

La température de transition des polymères pNIPAM (p5 et p20) et EPS-pNIPAM a été évaluée par spectroscopie UV-visible (Varioskan LUX, ThermoFisher). La transition de phase thermique des échantillons à 1 mg/mL (100  $\mu$ L en triplicat) dans du PBS (pH 7,4) a été déterminée par mesure de l'absorbance à 550 nm de 25 °C à 38 °C après 10 minutes d'équilibre thermique à chaque température.

### 2.4.2. Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

Le comportement thermosensible des polymères EPS, pNIPAM (p5 et p20) et EPS-pNIPAM a été étudié par DLS. Tous les échantillons ont été préparés à 1 mg/mL dans du PBS (pH 7,4) et utilisés sans pré-filtration pour éviter la modification de la taille des polymères. Les mesures DLS ont été réalisées en triplicat sur 1 mL d'échantillon par l'appareil Zetasizer Pro (laser hélium-néon, 633 nm, Malvern Instruments, Royaume-uni) à un angle de diffusion fixe de 173°, à 25 °C et 38 °C après 10 minutes d'équilibration thermique. L'analyse des données a été réalisée à l'aide du logiciel Malvern Zetasizer 3.2.

### 2.4.3. Imagerie par microscopie de force atomique (AFM)

Les morphologies des chaînes d'infernane greffées ont été observées par imagerie AFM. Les polymères EPS, pNIPAM (p5 et p20) et EPS-pNIPAM ont été préparés dans de l'eau à 1 mg/mL. Après 24 h de solubilisation, les solutions ont été incubées à 20 °C ou 37 °C pendant 30 min avant d'être diluées à 5  $\mu$ g/mL dans de l'eau thermostatée à 20 °C ou 37 °C. 10  $\mu$ L de chaque solution ont été déposés sur une surface de mica fraîchement clivée, et séchée à 20 °C ou 37 °C. La surface des échantillons a ensuite été imagée à l'aide du microscope à force atomique NanoWizard® (JPK, Allemagne) fonctionnant en mode contact intermittent dans des conditions ambiantes. Un levier rectangulaire standard (Nanosensors NCL-W) a été utilisé avec une fréquence de résonance de 165 kHz et une constante de raideur de  $\sim$  40 N/m. Le rayon de courbure de la pointe était d'environ 5 nm. Des images haute résolution (10  $\mu$ m x 10  $\mu$ m et 2  $\mu$ m x 2  $\mu$ m) ont été enregistrées sur au moins trois zones différentes de chaque échantillon. Le traitement des images et les mesures des hauteurs des chaînes ont été effectués à l'aide du logiciel JPK Data Processing (JPK, Allemagne).

## 2.5. Étude des associations inter-chaînes d'EPS-pNIPAM par des simulations de Monte Carlo

Des simulations de Monte Carlo ont été effectuées pour évaluer la capacité des chaînes d'EPS-pNIPAM à former un réseau infini à 37 °C. L'hypothèse sous-jacente à ces simulations est que les interactions inter-chaînes entre les chaînes de pNIPAM greffées conduisent à la construction du réseau EPS-pNIPAM, étape indispensable à la gélification. Compte tenu des temps de calcul longs, les simulations n'ont été réalisées que pour les chaînes d'EPS-p20. Dans ce cas, ~ 5,9 % des AU de la chaîne d'EPS avec une longueur de contour de ~ 1 µm ont été utilisés pour greffer des chaînes de pNIPAM avec une longueur de contour de ~ 30 nm. Dans toutes les simulations, le pas d'espace a été maintenu constant à 5 nm, de sorte qu'une chaîne d'EPS-p20 a été modélisée par 200 pixels (longueur de contour) avec 12 chaînes de pNIPAM greffées. Pour chaque chaîne d'EPS-p20, les 12 positions des chaînes greffées le long de la chaîne d'EPS ont été choisies au hasard. Comme la transition sol-gel de ce système se produira au-dessus de la LCST, où le pNIPAM est dans son état effondré, les chaînes de pNIPAM ont été modélisées par des chaînes repliées au lieu de chaînes libres. Des simulations ont été effectuées sur un réseau carré (2D) de taille L x L avec des conditions limites périodiques imposées dans les directions horizontales et verticales. À partir de l'état initial où tous les sites du réseau étaient vides, la première chaîne s'est déposée librement avec une position aléatoire sur les sites du réseau et une conformation aléatoire. Ensuite, une autre chaîne avec sa conformation aléatoire a été déposée au hasard sur les sites vides. Ses valeurs horizontales et verticales définissent une boîte rectangulaire locale entourant cette conformation. Pour équilibrer le système, une des cinq conformations aléatoires générées à l'intérieur de cette boîte locale a été testée au hasard, conduisant à une nouvelle configuration d'essai de la chaîne ajoutée. La différence d'énergie,  $\Delta H$ , entre la configuration d'essai avec la nouvelle chaîne ( $H_{\text{essai}}$ ) et l'ancienne configuration sans la présence de la nouvelle chaîne ( $H_{\text{ancienne}}$ ) a été calculée pour déterminer si le changement de conformation était accepté en utilisant le critère d'acceptation standard de Metropolis (Wu et al., 2007; Zykwiniska et al., 2014).

$$P = \min \left[ 1, \exp \left( - \frac{\Delta H}{k_B T} \right) \right] \quad (2)$$

où  $\Delta H = H_{\text{essai}} - H_{\text{ancienne}}$ , est la différence entre les hamiltoniens du test de l'essai et l'ancienne configuration, et  $k_B T$  est l'énergie thermique. L'Hamiltonien du système a été calculé en considérant uniquement les interactions entre pNIPAM appartenant à différentes chaînes d'EPS en utilisant le potentiel attractif (négatif) de Lennard-Jones :

$$H = \frac{1}{2} \sum_{\langle k,l \rangle} J_{i,j,k,l}(d) u_{i,j} v_{k,l} \quad (3)$$

où la somme s'étend sur tous les voisins les plus proches  $\langle k,l \rangle$  et  $d$  est la distance euclidienne entre deux chaînes de pNIPAM en interaction. Ici,  $u_{i,j}$  vaut 1 si le site  $i,j$  est occupé par une chaîne de pNIPAM et 0 si le site est vide (pour la conformation d'essai), et  $v_{k,l}$  prend les mêmes valeurs pour une chaîne de pNIPAM appartenant à une autre chaîne d'EPS. Pour calculer l'Hamiltonien du système correspondant à la configuration d'essai, les 12 chaînes de pNIPAM de la conformation d'essai interagissent avec les chaînes de pNIPAM appartenant aux chaînes d'EPS-p20 voisines, en ne considérant que les distances les plus courtes entre elles. De plus, l'une des 12 chaînes de pNIPAM ne peut interagir qu'avec une seule chaîne de pNIPAM appartenant à une chaîne d'EPS-p20 voisine, par chaîne d'EPS voisine. Si  $\Delta H$  était négatif (c'est-à-dire que l'énergie du système était minimisée), la configuration d'essai était acceptée et la procédure était répétée en choisissant une autre chaîne. Si  $\Delta H$  était positif, le changement de conformation était accepté ou rejeté selon la probabilité standard du critère d'acceptation de Metropolis. Pour une configuration donnée, l'énergie du système a été calculée en ne considérant que les interactions inter-chaînes attractives à courte portée entre pNIPAM (en excluant ainsi les interactions entre pNIPAM d'une même chaîne d'EPS). De cette façon, les distances les plus courtes entre les 12 chaînes de pNIPAM de la conformation d'essai et les chaînes de pNIPAM appartenant aux chaînes d'EPS-p20 voisines ont été considérées.

L'analyse des simulations a consisté à évaluer la formation de clusters, qui correspondent à un îlot de chaînes voisines connectées. Lorsque la probabilité d'occupation  $\phi$  (la concentration en polymère) définie par le rapport du nombre de sites du réseau occupés par les chaînes d'EPS-p20 sur le nombre total de sites augmente, la taille des clusters augmente et les clusters voisins peuvent progressivement fusionner. Le cas limite, appelé percolation, est atteint lorsqu'au moins un amas forme un chemin continu par des chaînes connectées d'un côté à l'autre du réseau. Le seuil de percolation  $\phi_c$  (la concentration critique)

pour une taille finie  $L$  du réseau est défini comme la probabilité d'occupation à la percolation. Pour évaluer  $\phi_c$  à partir des simulations, les coordonnées minimales et maximales de chaque cluster ont été déterminées en fonction de  $\phi$  (c'est-à-dire pour chaque nouvelle chaîne d'EPS-p20 ajoutée sur le réseau). Le seuil de percolation se produisait lorsque la différence entre ces coordonnées pour un même amas (dans une direction) dépassait  $L$ . Pour étudier l'influence de la taille du réseau sur  $\phi_c$ , des simulations ont été réalisées pour différentes valeurs de  $L$  (1  $\mu\text{m}$ , 2  $\mu\text{m}$ , 5  $\mu\text{m}$  et 10  $\mu\text{m}$ ). Les mailles plus grandes n'ont pas été simulées en raison des temps de calcul trop longs. Au moins 50 simulations indépendantes ont été systématiquement effectuées pour chaque ensemble de paramètres ( $L$ ,  $\phi$ ) pour une analyse statistique des simulations. La probabilité de percolation a été calculée à partir de ces simulations comme le rapport du nombre de réseaux percolés sur le nombre de réseaux générés. Les simulations Monte Carlo ont été réalisées à l'aide de programmes Matlab.

### 3. Résultats et discussion

La structure de l'infernane natif produit par *A. infernus* a été décrite pour la première fois par Roger et al. (2004) comme un hétéropolysaccharide anionique hautement ramifié avec une unité répétitive nonasaccharide monosulfate. Récemment, l'unité répétitive octasaccharide disulfate a été proposée après analyse par spectrométrie de masse réalisée sur des dérivés d'infernane de masse molaire moyenne intermédiaire obtenus après dépolymérisation enzymatique (Akoumany et al., 2019). Cette découverte a été récemment confirmée par une analyse RMN 2D réalisée sur un dérivé de masse molaire moyenne intermédiaire dépolymérisé chimiquement (Colliec-Jouault et al., 2023). Dans cette unité répétitive, les séquences du squelette EPS et des chaînes latérales sont conservées ; seul le Glc terminal de la chaîne latérale initialement lié au résidu Gal en C-6 a été remplacé par un groupement sulfate (Figure 36.A). La composition en monosaccharide et la teneur en sulfate (~ 10 % m/m) de l'infernane natif utilisé dans la présente étude ont été déterminées auparavant (Colliec-Jouault et al., 2023; Gélébart et al., 2022). Les masses molaires moyennes en poids ( $M_w$ ,  $1,6 \times 10^6$  g/mol) et en nombre ( $M_n$ ,  $0,9 \times 10^6$  g/mol) obtenues en FI-AF4-MALS-dRI montrent une légère polydispersité des chaînes d'infernane natives (détails de l'analyse en II.3.2.1).

#### 3.1. Simulations de dynamique moléculaire (DM) d'infernane greffé avec des chaînes de pNIPAM

Étant donné que l'infernane contient trois résidus AU consécutifs dans son unité répétitive (un GalA dans le squelette et deux GlcA dans la chaîne latérale), des simulations de dynamique moléculaire ont été réalisées pour évaluer l'accessibilité des trois AU pour le greffage du pNIPAM et pour élucider la conformation moléculaire du polysaccharide greffé résultant (protocole en II.2.3.1). La structure 3D de l'unité répétitive octasaccharidique d'infernane a été construite en utilisant des valeurs de torsion liées au minimum d'énergie globale de chaque disaccharide constitutif, comme décrit récemment (Makshakova et al., 2022). La structure résultante présentée sur la Figure 36.B, montrant quatre unités répétitives avec trois chaînes latérales, est légèrement étendue avec une distance entre extrémités de  $4,84 \pm 0,28$  nm (Figure 37.0) Dans les chaînes latérales, la substitution des résidus GlcA aux

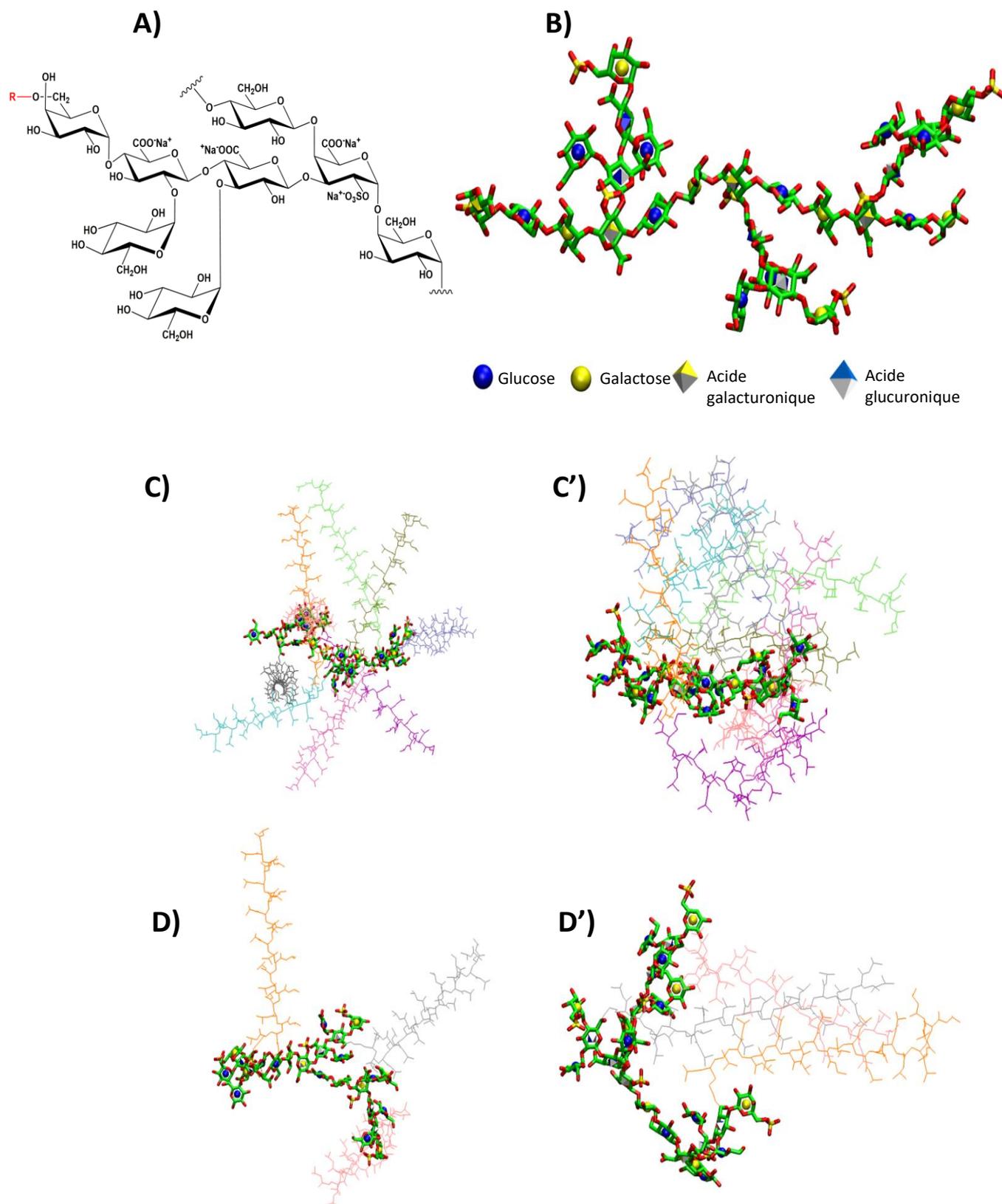


Figure 36. Simulations de dynamique moléculaire. A) Unité octasaccharidique disulfate d'infernane natif ( $R = \text{SO}_3^- \cdot \text{Na}^+$ ) (Akoumany et al., 2019; Collicec-Jouault et al., 2023), B) quatre unités répétitives d'octasaccharide d'infernane montrant un squelette linéaire ramifié à GALA2S avec trois chaînes latérales, C, C') infernane ramifié entièrement greffé à trois résidus AU par unité répétitive, conduisant à neuf chaînes de pNIPAM greffées pour neuf AU (100 %) et D, D') infernane ramifié partiellement greffé à l'un des GlcA de la chaîne latérale par unité répétitive, soit trois chaînes de pNIPAM greffées pour neuf AU (33 %).

positions 3-O et 2-O par des résidus  $\alpha$ -Glc terminaux entraîne la formation de liaisons hydrogène stables entre les groupements hydroxyles de ces résidus et les groupements carboxylates des résidus GlcA. Malgré ces interactions dans les chaînes latérales, les trois groupements carboxylates (GalA2S et deux GlcA) dans l'unité répétitive semblent être disponibles pour la réaction avec la fonction amine terminale du pNIPAM-NH<sub>2</sub>.

Pour étudier l'effet du greffage du pNIPAM sur la chaîne étendue d'infernane, les chaînes de pNIPAM ont été liées de manière covalente aux groupements carboxylates du polysaccharide. Le degré de polymérisation du pNIPAM a été fixé à 21 pour être comparable à la longueur du fragment d'infernane. Au niveau de substitution maximale du modèle (densité de greffage de 100 %), tous les groupements carboxylates ont été greffés avec des chaînes de pNIPAM (neuf chaînes de pNIPAM pour neuf AU disponibles) (Figure 36.C). Lors des simulations de DM à 300 K, les chaînes de pNIPAM greffés entrent en contact induisant une flexion du squelette infernane, comme indiqué par la diminution de la distance entre extrémités de  $\sim 5$  nm à  $\sim 2$  nm (Figure 36.C', Figure 37.B). Pour étudier si le squelette étendu

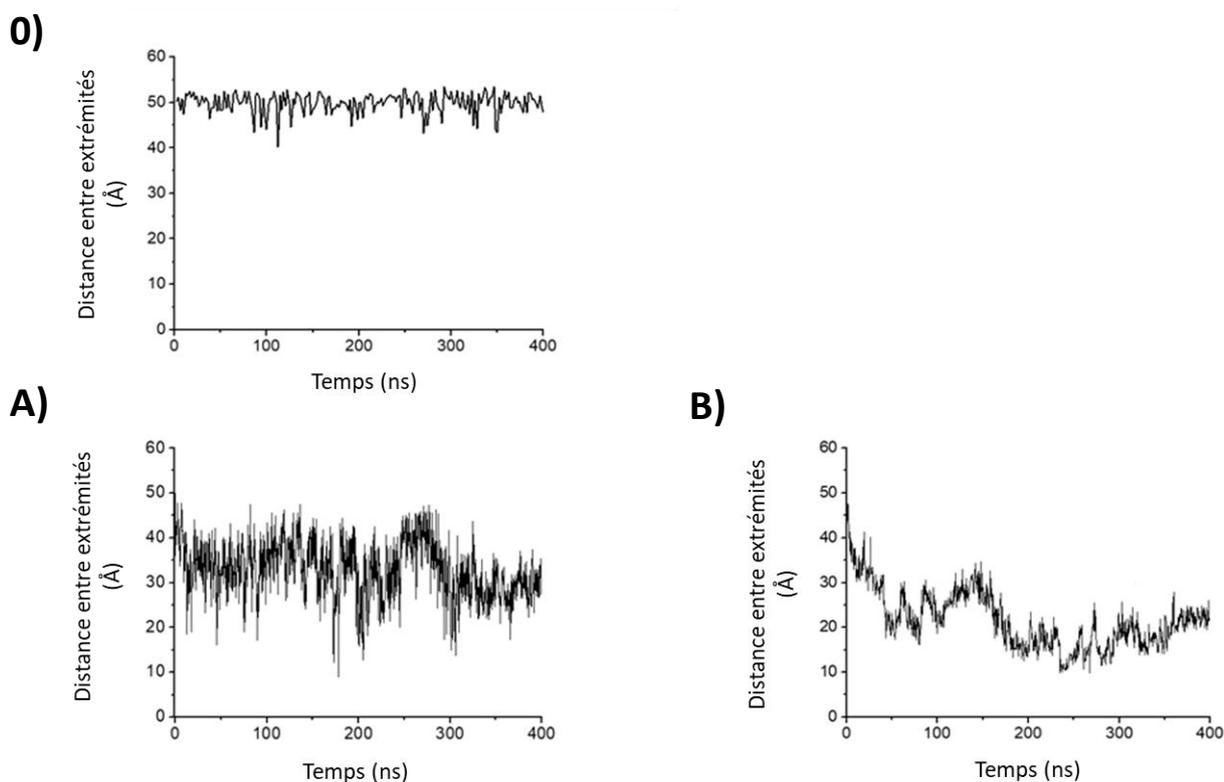


Figure 37. La distance de bout en bout du squelette dans 0) infernane (système 0, Tableau IX) A) infernane partiellement greffé aux GlcA latéraux (système A, Tableau IX) B) infernane totalement greffé à GalA2S et aux GlcA (système B, Tableau IX).

pourrait également se replier en raison de l'agrégation des chaînes de pNIPAM greffées pour une densité de greffage plus faible, une seule chaîne de pNIPAM par unité répétitive a été liée à l'un des GlcA de la chaîne latérale de l'infernane, correspondant à 33 % de densité greffage (Figure 36.D). Dans ces nouvelles simulations, les chaînes de pNIPAM se sont une nouvelle fois regroupées et la longueur du squelette infernane a diminué à 3 nm (Figure 36.D', Figure 37.A). L'effet de la flexion du squelette a été observé quel que soit la position du greffage : chaîne latérale (GlcA) ou squelette. A densité et longueur données des chaînes de pNIPAM, les interactions entre les groupements isopropylamides adjacents stabilisent leur conformation étendue sous la LCST (Deshmukh et al., 2012; Ono & Shikata, 2006; Tavagnacco et al., 2018). Un tel comportement diffère de celui observé pour le greffage d'une chaîne pNIPAM par unité répétitive ou de l'infernane 100 % greffé où les chaînes de pNIPAM greffées induisent une flexion de l'infernane pour maximiser leurs interactions.

Les simulations de DM ont montré la tendance des chaînes de pNIPAM, lorsqu'elles sont greffées à l'infernane, à interagir les unes avec les autres, entraînant la flexion du squelette d'infernane. Cela implique que les interactions entre les chaînes de pNIPAM sont plus favorables que les forces maintenant le squelette polysaccharidique étendu. Les résultats obtenus pour des fragments courts de polysaccharide peuvent être extrapolés à plus grande échelle. En effet, dans les régions de la chaîne d'infernane enrichies par des chaînes de pNIPAM greffées, le squelette polysaccharidique présenterait une courbure due aux interactions des chaînes de pNIPAM greffées, entraînant le compactage local de la chaîne d'infernane. Ainsi, ces modifications structurales locales rendraient possibles les interactions des chaînes de pNIPAM greffées des régions éloignées de l'infernane, entraînant un compactage global de l'assemblage macromoléculaire.

### 3.2. Caractérisation physico-chimique des polymères EPS-pNIPAM greffés

L'infernane natif a été greffé par un pNIPAM-NH<sub>2</sub> avec deux masses molaires moyennes différentes, Mn 5 500 g/mol (p5) ou Mn 20 000 g/mol (p20) à différents rapports molaires COOH:NH<sub>2</sub> (Tableau VIII, II.2.2). Le seuil de coupure de masse molaire de la membrane utilisée pour la dialyse étant de 50 000 g/mol, la masse d'EPS (de masse molaire moyenne supérieure à 10<sup>6</sup> g/mol) initialement utilisée pour ces conditions de greffage est considérée inchangée au terme de la purification. Quatre masses de produits finaux issus du greffage EPS/p5, et quatre

masses de produits finaux issus du greffage EPS/p20 ont ainsi été obtenues en fonction des conditions : de 113 mg (condition 1) à 166 mg (condition 3) pour le greffage EPS/p5 et de 105 mg (condition 8) à 157 mg (condition 7) pour le greffage EPS/p20, soit environ 70 % de la masse de produit final attendue (i.e. addition des masses initiales d'EPS/pNIPAM hormis pour la condition 1 où le pNIPAM est en excès, Tableau VIII) (Tableau X).

**Tableau X. Conditions de réaction (issues du Tableau VIII) et masses de produits obtenues.**

Condition de réaction	EPS initial (mg)	pNIPAM-NH <sub>2</sub> initial (mg)	Produit final (mg)	pNIPAM-NH <sub>2</sub> éliminé à la dialyse (mg)	pNIPAM restant (mg)
1	10	161	113 ± 2	58	103
2	20	200	143 ± 3	77	123
3	40	200	166 ± 4	74	126
4/4 bis	40	120	120 ± 4	40	80
5	5	151	107 ± 5	49	102
6	10	161	112 ± 1	59	102
7	20	200	157 ± 1	63	137
8	20	120	105 ± 1	35	85

La différence massique entre la masse obtenue au terme de la réaction et la somme des masses initiales d'EPS/pNIPAM utilisées est associée à l'élimination de pNIPAM-NH<sub>2</sub> libre, non greffé, lors de la dialyse (environ 30 % de la masse de pNIPAM initial). Dans cette configuration, la masse de pNIPAM restante varie de 80 mg (condition 4) à 126 mg (condition 3) pour les produits finaux EPS/p5 et de 85 mg (condition 8) à 137 mg (condition 7) pour les produits finaux EPS/p20. Afin d'évaluer l'impact de la densité greffage de l'EPS *via* la composition massique EPS/pNIPAM au sein du produit final, il est indispensable de vérifier que tout le pNIPAM a été réellement greffé sur l'EPS. En effet, la condition 4 bis (sans greffage, pas d'ajout d'EDC/NHS) présente une masse de pNIPAM restant identique à la condition 4 (~ 80 mg) bien qu'elle ne soit, dans ce cas précis, non greffée. Du pNIPAM libre non greffé peut donc toujours être présent au sein du polymère final, éventuellement associé à la chaîne polysaccharidique par des interactions faibles non-covalentes, de type liaisons hydrogène, van der Waals ou interactions électrostatiques. Pour caractériser au mieux le produit final obtenu, les techniques classiques d'analyses que sont les techniques séparatives, les dosages spectroscopiques, l'infrarouge (ATR-FTIR) et la RMN ont été employées.

### 3.2.1. Greffage d'infernane, masse molaire moyenne et conformation par FI-AF4-MALS-dRI

Les polysaccharides greffés ont été caractérisés par FI-AF4-MALS-dRI (Plateforme TFFFC, École d'Ingénieurs de Purpan, Toulouse) afin de déterminer leur densité de greffage, leur masse molaire moyenne et leur conformation. Si la technique de fractionnement standard utilisant la chromatographie d'exclusion stérique (SEC) peut être intéressante pour des macromolécules de masse molaire intermédiaire, la dégradation par contrainte de cisaillement et l'adsorption sur la phase stationnaire peut se produire pour des composés de haute masse molaire tels que les polysaccharides, surtout s'ils sont branchés (Gaborieau & Castignolles, 2011; Shin et al., 2007; Vilaplana & Gilbert, 2010). Dans le cas des EPS greffés, le recouvrement obtenu en HPSEC dans les conditions d'éluion classiquement utilisées pour l'EPS natif (protocole en III.2.6.1.2) est inférieur à 10 %. La SEC n'est donc pas adaptée à l'étude de ces polymères. Une méthode alternative est offerte par la technique AF4, fonctionnant sans phase stationnaire. Après des étapes de focalisation/relaxation, les macromolécules sont séparées en fonction de leur coefficient de diffusion translationnelle relatifs à leur taille, par un flux parabolique longitudinal. Le risque d'agglomération des composés de haute masse molaire est cependant toujours possible. Ainsi, l'utilisation d'un système d'entrée de fritte (ang. Frit inlet), sans étape de focalisation, permet d'injecter des quantités plus élevées de composés avec une meilleure récupération que les techniques FFF conventionnelles et une

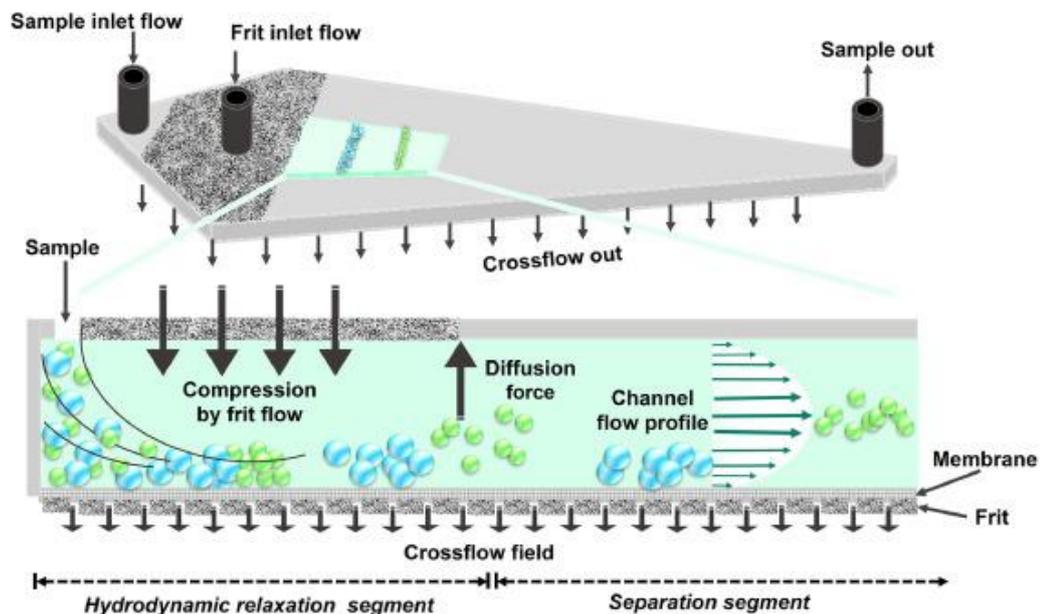


Figure 38. Représentation schématique du système FI-AF4 (Ramirez et al., 2021).

élution plus douce, empêchant ainsi l'agrégation des composés sur la membrane (Fuentes et al., 2019; Lee et al., 2017; Ramirez et al., 2021) (Figure 38).

Les fractogrammes issus de l'analyse FI-AF4-MALS-dRI (protocole en II.2.3.2) de l'EPS et du pNIPAM 5 500 g/mol (p5) seuls sont présentés sur la Figure 39. Le pNIPAM seul a été principalement élué de 1 à 9,5 min ; sa fraction massique a été estimée à 96 % pour un recouvrement de 89 % (domaine pNIPAM). La majeure partie de l'EPS seul a été éluée de 9,5 à 18 min (73 % de la fraction massique) (domaine EPS). La Figure 40 présente les fractogrammes FI-AF4 des quatre polymères EPS-p5 greffés et de l'EPS-p5-0% non greffé obtenu sans l'ajout des agents de couplage (EDC/NHS), ainsi que des quatre polymères EPS-p20 greffés. Au sein des fractogrammes dRI des EPS-p5 et EPS-p20, deux pics principaux sont toujours présents, le premier élué dans le domaine pNIPAM, correspondant au pNIPAM libre non greffé restant dans l'échantillon et le second, dans le domaine EPS, correspondant à l'EPS ou à l'EPS greffé. Il a été observé que malgré la dialyse utilisant une membrane au seuil de coupure de 50 000 g/mol, le pNIPAM n'ayant pas réagi (libre, non greffé) n'était pas complètement éliminé et était toujours intégré dans l'échantillon final. Les quantités de pNIPAM greffé et libre ont ensuite été estimées en prenant en compte : (1) la valeur mesurée expérimentalement de l'incrément d'indice de réfraction  $dn/dc$  du pNIPAM, (2) la quantité de pNIPAM totale restant dans l'échantillon après la dialyse (et en considérant que seul le pNIPAM peut être retiré, c'est à dire en gardant la quantité d'EPS inchangée), (3) la quantité de pNIPAM totale injectée pour l'analyse FI-AF4-MALS-dRI dans les échantillons d'EPS-pNIPAM (après soustraction de la quantité d'EPS), (4) la quantité de pNIPAM libre éluée dans le domaine pNIPAM des fractogrammes FI-AF4-dRI et (5) en considérant le recouvrement du pNIPAM libre constant au cours de l'analyse (89 %). En fonction de la quantité de pNIPAM greffée, l'efficacité de la réaction est définie comme le rapport entre les masses de pNIPAM greffées et initialement ajoutées (Tableau VIII), et la densité de greffage des AU de l'EPS comme le pourcentage d'AU de la chaîne d'infernane fonctionnalisés par du pNIPAM (Tableau XI).

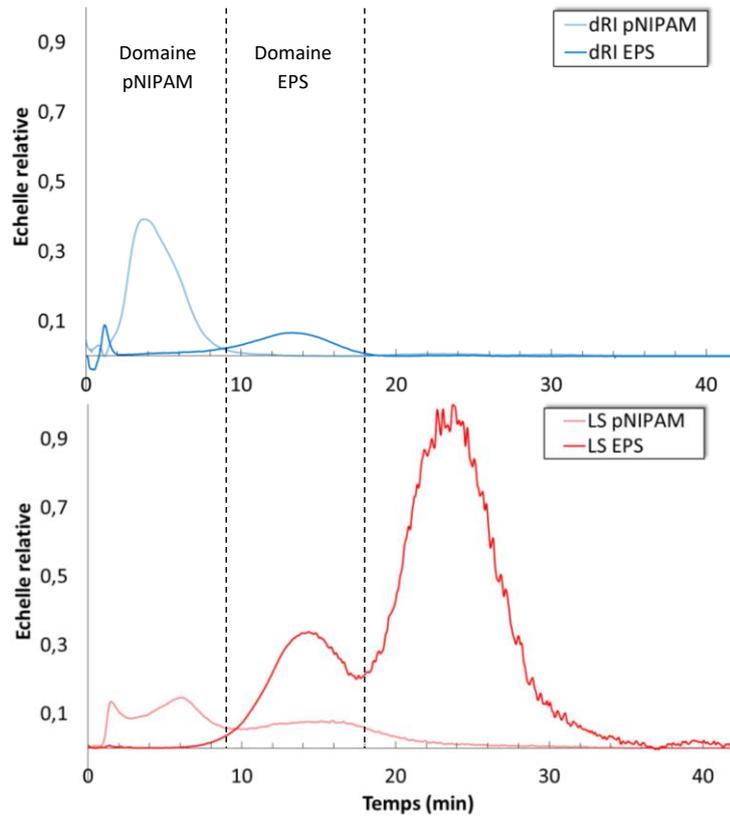


Figure 39. Fractogrammes FI-AF4-MALS-dRI de l'EPS et du pNIPAM p5 (1 mg/mL).

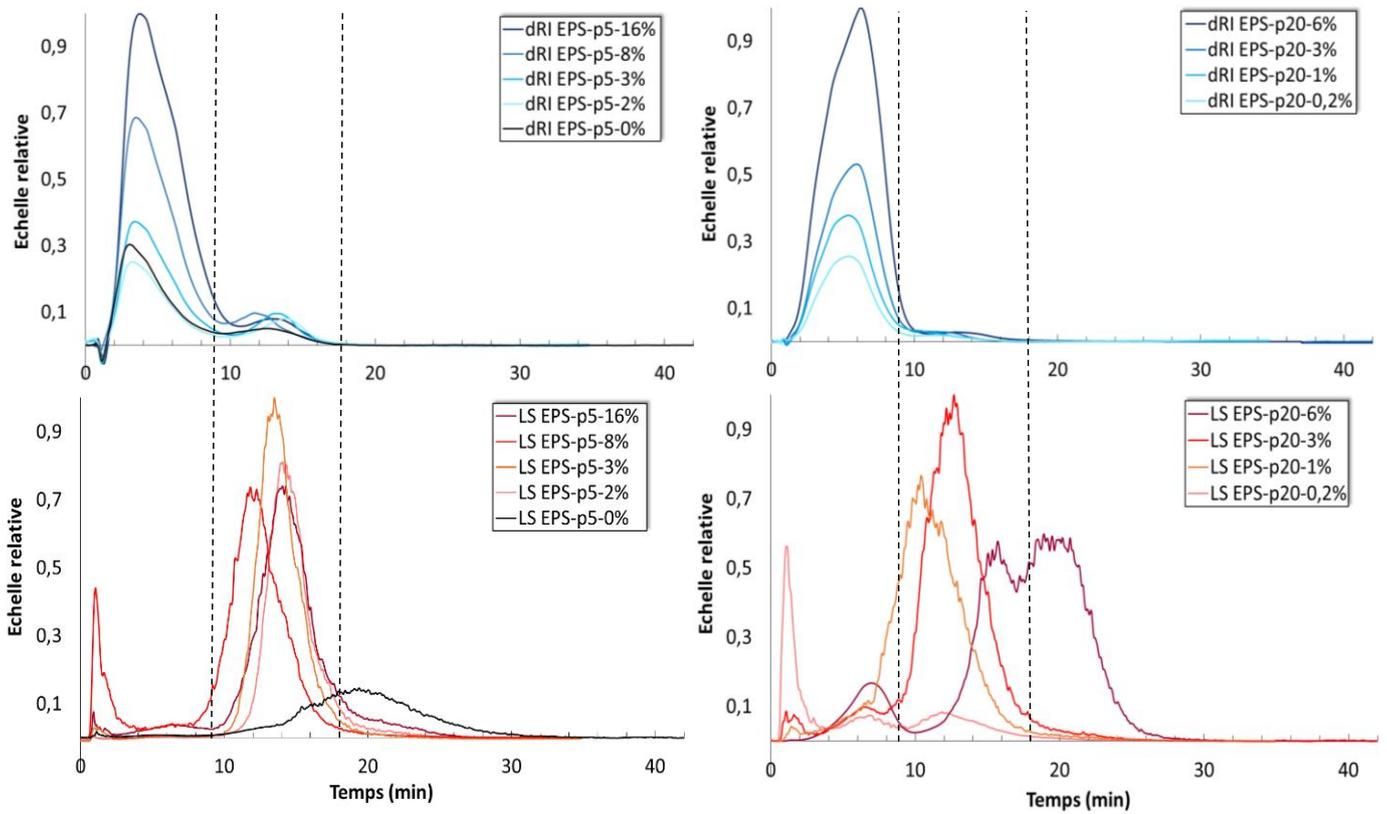


Figure 40. Fractogrammes FI-AF4-MALS-dRI des EPS-p5 et des EPS-p20 (1 mg/mL en EPS). L'EPS-p5-0% présente une composition massique en EPS et pNIPAM identique à l'EPS-p5-2%, mais sans greffage covalent du pNIPAM (Tableau VIII).

Pour les échantillons d'EPS-p5, la quantité la plus faible de p5 (8,2 mg) a été greffée dans l'EPS-p5-2%. En considérant que 1701 AU sont disponibles pour le greffage par chaîne polysaccharidique, on peut estimer que  $\sim 34$  AU (2 % des AU greffés) ont été efficacement fonctionnalisés, ce qui correspond à 34 chaînes de pNIPAM greffées sur une chaîne polysaccharidique. La plus grande quantité de p5 (16,7 mg), ce qui représente  $\sim 273$  chaînes de pNIPAM (16 % d'AU greffés), a été greffée pour l'EPS-p5-16% (Tableau XI). Au sein des polymères EPS-p5, le taux d'infernane varie de 37 % pour l'EPS-p5-16% à 83 % pour l'EPS-p5-2% préparé en utilisant respectivement le rapport molaire COOH:NH<sub>2</sub> le plus bas (1:1,5) et le plus élevé (1:0,29).

Pour les EPS-p20, issus du greffage du pNIPAM 20 000 g/mol (p20), une multiplication par quatre de la longueur de la chaîne pNIPAM n'a eu aucun impact significatif sur l'efficacité de la réaction et sur la densité de greffage, par rapport aux échantillons d'EPS-p5 obtenus en utilisant des rapports molaires COOH:NH<sub>2</sub> proches (Tableau VIII). En effet, entre 1,2 % (20 AU) et 5,9 % (100 AU) des AU ont été fonctionnalisés pour l'EPS-p20-1% et l'EPS-p20-6%, respectivement, soit des masses de p20 comprises entre 8,9 mg et 11,1 mg. La quantité la plus faible de p20 greffé (1,6 mg) a été obtenue pour l'EPS-p20-0,2% ce qui correspond à 0,2 % des AU (4 AU) fonctionnalisés. Dans les échantillons d'EPS-p20, la taux d'EPS varie de 31 % à 93 %, du plus au moins greffés des EPS-p20 respectivement (Tableau XI).

L'analyse FI-AF4-MALS-dRI a également permis de déterminer les caractéristiques moléculaires des échantillons d'EPS-pNIPAM, telles que la masse molaire moyenne, le rayon de giration (R<sub>g</sub>) et la conformation des chaînes (Tableau XI). Pour la détermination de la masse molaire moyenne, l'incrément d'indice de réfraction dn/dc de l'EPS pur a été utilisé car la présence de pNIPAM libre dans les échantillons ne permet pas la mesure de la valeur exacte du dn/dc des polysaccharides greffés. Néanmoins, une augmentation importante de la masse molaire moyenne en poids M<sub>w</sub> a été observée pour les échantillons d'EPS-p5 et d'EPS-p20 (M<sub>w</sub> > 10<sup>9</sup> g/mol) ainsi qu'une multiplication par cinq du R<sub>g</sub> ( $\sim 500$  nm), par rapport à l'infernane de départ (M<sub>w</sub> de 1,6 x 10<sup>6</sup> g/mol et un R<sub>g</sub> de 100 nm). Cette augmentation est bien supérieure à la simple addition de chaînes de pNIPAM sur le squelette infernane pour ces densités de greffage (1,62 x 10<sup>6</sup> g/mol  $\leq$  M<sub>w</sub> EPS greffé attendue  $\leq$  3,11 x 10<sup>6</sup> g/mol). Or, elle

Tableau XI. Caractérisation des produits finaux obtenus en termes de composition, d'efficacité de la réaction<sup>a</sup>, du nombre d'AU greffés<sup>b</sup> et de la densité de greffage des AU<sup>c</sup>, ainsi que de la masse molaire moyenne en poids (Mw), du rayon de giration (Rg) et du coefficient hydrodynamique (v). Les EPS-pNIPAM (EPS-p5 ou EPS-p20) sont désignés selon leur densité de greffage « x » des AU (%) (EPS-p5-x% ou EPS-p20-x%).

Condition de réaction	Polymère	Composition						Caractéristiques du greffage			Caractéristiques moléculaires		
		Produit final (mg)	EPS (mg)	pNIPAM-NH <sub>2</sub> libre (mg)	pNIPAM-NH <sub>2</sub> greffé (mg)	Taux d'EPS dans produit final (%)	Taux d'EPS dans EPS-pNIPAM ou EPS greffé (%)	Efficacité de la réaction (%) <sup>a</sup>	Nombre d'AU greffés <sup>b</sup>	Densité de greffage des AU (%) <sup>c</sup>	Mw (g/mol)	Rg (nm)	v
-	EPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,6 ± 0,1 × 10 <sup>6</sup>	104 ± 4	0,73
-	pNIPAM (p5/p20)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0 ± 0,1 × 10 <sup>5</sup>	67 ± 3	-
<b>1</b>	EPS-p5-16 %	113 ± 2	10	86 ± 2	16,7 ± 1,1	9	37	<b>10,4 ± 1,0</b>	<b>273 ± 20</b>	<b>16,1 ± 1,2</b>	0,9 ± 0,6 × 10 <sup>9</sup>	482 ± 5	0,06
<b>2</b>	EPS-p5-8%	143 ± 3	20	107 ± 2	16,1 ± 1,4	14	55	<b>8,1 ± 0,7</b>	<b>132 ± 12</b>	<b>7,7 ± 0,7</b>	0,8 ± 0,6 × 10 <sup>9</sup>	471 ± 5	0,04
<b>3</b>	EPS-p5-3%	166 ± 4	40	114 ± 3	12,3 ± 1,4	24	76	<b>6,2 ± 0,7</b>	<b>50 ± 6</b>	<b>3,0 ± 0,4</b>	1,3 ± 0,1 × 10 <sup>9</sup>	503 ± 5	0,04
<b>4</b>	EPS-p5-2%	120 ± 4	40	72 ± 3	8,2 ± 0,9	33	83	<b>6,8 ± 0,8</b>	<b>34 ± 4</b>	<b>2,0 ± 0,2</b>	1,3 ± 0,1 × 10 <sup>9</sup>	510 ± 5	0,05
<b>4 bis</b>	EPS-p5-0%	122	40	82	-	33	-	-	-	-	1,2 ± 0,1 × 10 <sup>6</sup>	99 ± 7	0,68
<b>5</b>	EPS-p20-6%	107 ± 5	5	91 ± 4	11,1 ± 1,8	5	31	<b>7,4 ± 1,2</b>	<b>100 ± 18</b>	<b>5,9 ± 1,0</b>	0,3 ± 0,3 × 10 <sup>9</sup>	448 ± 4	0,09
<b>6</b>	EPS-p20-3%	112 ± 1	10	91 ± 2	10,7 ± 1,8	9	48	<b>6,6 ± 1,1</b>	<b>48 ± 9</b>	<b>2,8 ± 0,5</b>	1,0 ± 0,1 × 10 <sup>9</sup>	491 ± 5	0,05
<b>7</b>	EPS-p20-1%	157 ± 1	20	128 ± 2	8,9 ± 2,4	13	69	<b>4,5 ± 1,2</b>	<b>20 ± 6</b>	<b>1,2 ± 0,4</b>	0,9 ± 0,9 × 10 <sup>9</sup>	490 ± 5	0,22
<b>8</b>	EPS-p20-0,2 %	105 ± 1	20	83 ± 2	1,6 ± 1,5	19	93	<b>1,3 ± 1,3</b>	<b>4 ± 4</b>	<b>0,2 ± 0,2</b>	1,2 ± 0,1 × 10 <sup>6</sup>	214 ± 4	0,51

$$(a) \text{ Efficacité de la réaction (\%)} = \frac{\text{pNIPAM greffé (mg)}}{\text{pNIPAM initial (mg)}} \times 100 \text{ (Tableau VIII pour les masses de pNIPAM initiales)}$$

$$(b) \text{ Nombre d'AU greffés par chaîne d'EPS} = \frac{\text{pNIPAM greffé (mol)}}{\text{EPS (mol)}}$$

$$(c) \text{ Densité de greffage des AU (\%)} = \frac{\text{Nombre d'AU greffés}}{\text{Nombre d'AU par chaîne d'EPS}^d} \times 100$$

$$(d) \text{ Nombre d'AU par chaîne d'EPS} = \frac{M_n \text{ EPS (g/mol)}}{M \text{ unité répétitive (g/mol)}} \times 3 \text{ AU dans l'unité répétitive (détails Tableau VIII)}$$

ne peut être due à d'éventuelles réactions de pontages inter-chaînes d'EPS, la condition réactionnelle préliminaire EPS + EDC/NHS (sans pNIPAM-NH<sub>2</sub>) analysée en HPSEC MALS-dRI n'ayant pas montré d'évolution de masse molaire moyenne vis-à-vis de l'EPS natif. En revanche, aucune augmentation de masse molaire moyenne n'a été observée pour EPS-p20-0,2% qui ne comporte que 4 chaînes de pNIPAM greffées sur le squelette polysaccharidique. De même, pour EPS-p5-0%, obtenu en mélangeant simplement l'EPS et le pNIPAM, sans ajouter les agents de couplage EDC/NHS. Par conséquent, l'augmentation de la masse molaire moyenne dans les échantillons d'EPS-pNIPAM provient d'associations inter-chaînes entre les chaînes de polysaccharides médiées par les chaînes de pNIPAM greffées, conduisant à la formation d'agrégats. Le pNIPAM libre présent dans l'échantillon n'est pas impliqué dans la formation d'associations inter-chaînes, puisqu'aucune augmentation de la masse molaire moyenne n'a été observée dans l'échantillon non greffé (EPS-p5-0%).

Le coefficient hydrodynamique  $\nu$  calculé à partir de la pente du tracé log-log du rayon de giration  $R_g$  en fonction de la masse molaire moyenne  $M_w$  indique un changement de conformation moléculaire lors du greffage en passant d'une pelote statistique à une structure sphérique dense (Figure 41, Tableau XI). En effet, une conformation en pelote statistique a été observée pour l'EPS seul (0,73), l'EPS mélangé avec du pNIPAM (EPS-p5-0%) (0,68) et l'EPS-p20-0,2% (0,51) n'ayant que 4 chaînes de pNIPAM greffées. La diminution nette du coefficient hydrodynamique d'un ordre de grandeur a ensuite été constatée pour les échantillons d'EPS-p5 (de 0,04 à 0,06) et d'EPS-p20 (de 0,05 à 0,22), indiquant une structure sphérique dense en solution permise par les interactions inter-chaînes médiées par les chaînes de pNIPAM greffées. Le coefficient hydrodynamique intermédiaire obtenu pour l'EPS-p20-1% (0,22) pourrait suggérer une conformation en pelote statistique/sphérique mixte, très probablement due à la quantité de pNIPAM greffé plus faible, essentielle pour l'établissement d'associations inter-chaînes.

Même si les simulations de DM ont montré que tous les AU sur le squelette d'infernane et sur la chaîne latérale étaient disponibles pour le greffage, l'efficacité de la réaction du pNIPAM varie de 6,2 % (EPS-p5-3%) à 10,4 % (EPS-p5-16%) et de 1,3 % (EPS-p20-0,2%) à 7,4 % (EPS-p20-6%) pour le greffage du p5 et p20 respectivement (Tableau XI) et ce malgré un double ajout séquentiel d'EDC/NHS. Augmenter la quantité relative en NH<sub>2</sub> (pNIPAM) vis-à-vis des COOH de l'EPS (diminution du ratio molaire COOH:NH<sub>2</sub>) améliore la densité de greffage

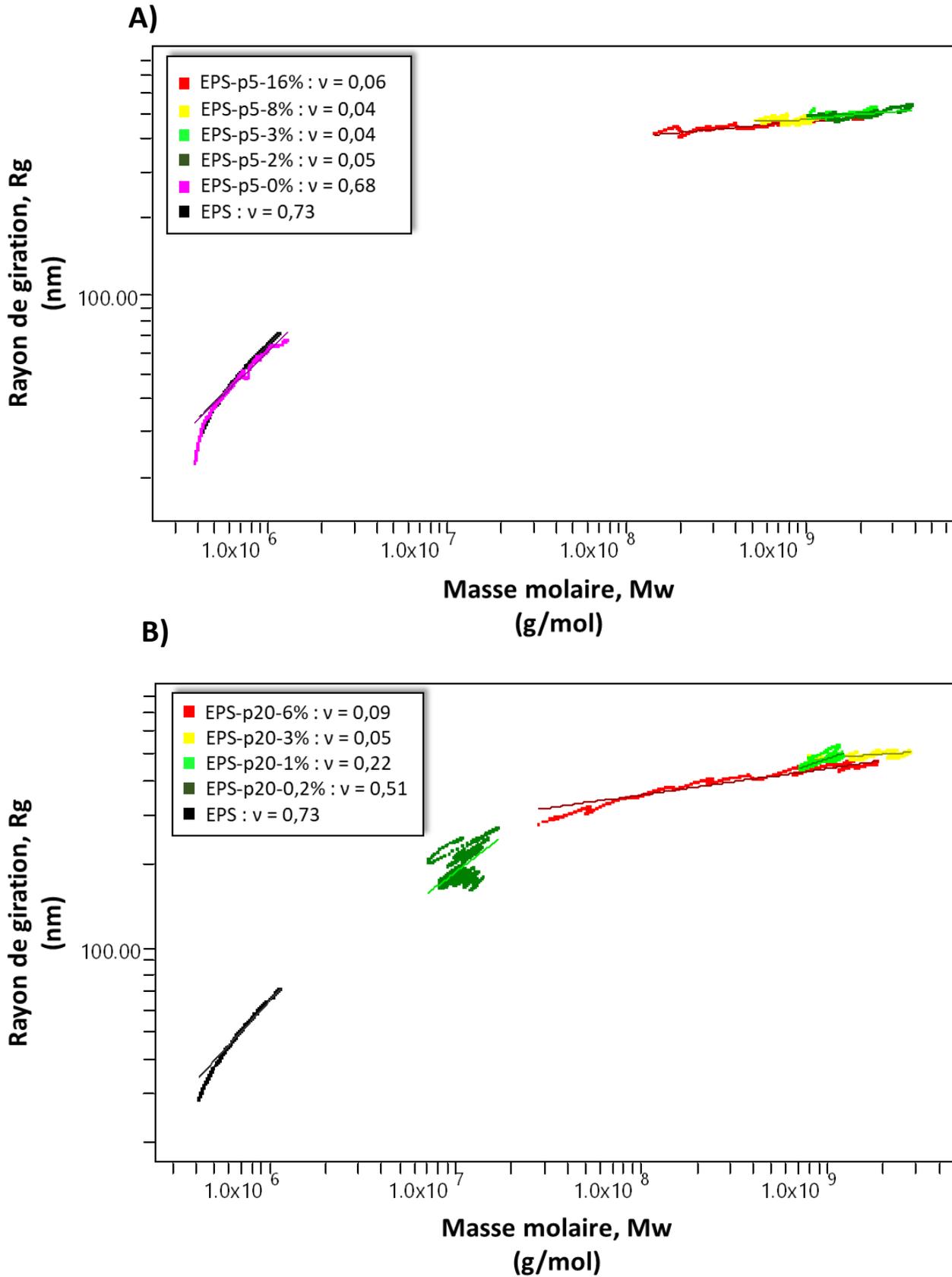


Figure 41. Coefficients hydrodynamiques  $v$  calculés à partir de la pente du tracé log-log du rayon de giration ( $R_g$ ) en fonction de la masse molaire moyenne en poids ( $M_w$ ) obtenus en FI-AF4-MALS-dRI pour A) les EPS-p5 et B) les EPS-p20 (à 1 mg/ml en EPS).

des AU (de 0,2 à 16 %) en augmentant la probabilité de rencontre entre le pNIPAM à terminaison amine et l'acide carboxylique du polysaccharide activé par EDC/NHS et ce particulièrement lorsque le pNIPAM est en excès molaire (1:1,5, condition 1, EPS-p5-16%). Toutefois, l'efficacité de la réaction de greffage du pNIPAM (pourcentage de pNIPAM greffé vis-à-vis du pNIPAM initial) reste relativement faible (10,4 %). Il est possible d'envisager que le greffage des premières chaînes de pNIPAM puisse limiter le greffage d'autres chaînes en raison de l'encombrement stérique et de la diminution de l'accessibilité des AU voisins. Il est également envisageable que le pH de la réaction, de 4,8, ne permette pas d'atteindre des pourcentages de greffage très importants, du fait que l'extrémité amine du pNIPAM soit majoritairement sous forme ammonium. Une autre possibilité serait que toutes les chaînes de pNIPAM commercial ne soient pas fonctionnalisées par une extrémité amine et donc indisponibles pour le greffage dans ce cas précis. Enfin, la masse molaire moyenne du pNIPAM mesurée par FI-AF4-MALS-dRI en solution aqueuse est beaucoup plus élevée (~ 100 000 g/mol) (Tableau XI), par rapport à celle déterminée par les fournisseurs (5 500 g/mol pour p5 par titration à l'acide chlorhydrique (Sigma Aldrich) et 20 000 g/mol pour p20 par SEC en diméthylformamide (DMF) (Polymer Source)). Les chaînes de pNIPAM ont tendance à s'agréger en solution aqueuse sous la LCST *via* les interactions inter-chaînes, en formant des clusters tels que décrits par Yan et al. (2015). Cette agrégation pourrait également limiter le greffage des chaînes de pNIPAM sur l'EPS en diminuant leur disponibilité.

Bien que plusieurs études décrivent le greffage de polysaccharides anioniques par le pNIPAM, seulement quelques-unes déterminent la densité de greffage des AU. Safakas et al. (2021) ont rapporté le greffage de 3 chaînes de pNIPAM (23 000 g/mol) par chaîne d'alginate (140 000 g/mol), tandis que Guo et al. (2018) ont fonctionnalisé une chaîne d'alginate (60 000 g/mol) avec 2 chaînes de pNIPAM (14 000 g/mol). Même si la présence de pNIPAM libre résiduel est parfois supposée (Barbier et al., 2023), elle n'est quasiment jamais quantifiée. Les techniques séparatives exploitant les différences notables de masses molaires des polymères greffés et du pNIPAM libre sont très peu exploitées malgré leur efficacité (Bokias et al., 2001). Dans notre cas, l'analyse FI-AF4-MALS-dRI révèle ainsi que le pNIPAM libre représente de 60 % (EPS-p5-2%) à 76 % (EPS-p5-16%) des produits finaux EPS/p5 et de 79 % (EPS-p20-0,2%) à 85 % (EPS-p20-6%) des produits finaux EPS/p20 (Figure 42). La taille des agrégats de pNIPAM libre (~ 100 000 g/mol) semble avoir limité son élimination par dialyse à travers la membrane

au seuil de coupure de 50 000 g/mol pourtant bien supérieure à la masse molaire moyenne des pNIPAM utilisés (p5, Mn 5 500 g/mol et p20, Mn 20 000 g/mol). L'efficacité de la dialyse du pNIPAM libre est en effet de 39 % pour le p5 et 34 % pour le p20. D'autres études ont également eu recours à la dialyse pour l'élimination de chaînes de pNIPAM non greffées de taille similaire (Mn 14 000 g/mol (Tan et al., 2012)) voire supérieure (Mn 44 000 g/mol (D'Este et al., 2012) sans pour autant quantifier *in fine* le pNIPAM résiduel.

Afin d'améliorer l'équilibre osmotique et ainsi favoriser l'élimination du pNIPAM libre, le nombre de jours de dialyse a été doublé (6 jours), de même que le nombre de changements du dialysat par jour (4 fois par jour). Des tampons basiques (bicarbonate de sodium 500 mM, pH 8,5 et acide borique 500 mM, pH 9,5) favorisant la forme amine du pNIPAM ont également été employés, dans l'hypothèse que des interactions ioniques entre la forme ammonium du pNIPAM-NH<sub>2</sub> et les acides uroniques non greffés de l'EPS participent à la séquestration du pNIPAM libre. La présence de sel pouvait également favoriser la dissociation des agrégats de pNIPAM. Or, aucune de ces modifications ne s'est avérée significativement efficace. Ceci semble démontrer que seules les chaînes non agrégées de pNIPAM libre ont été éliminées lors de la dialyse au seuil de coupure 50 000 g/mol et que le pNIPAM restant est principalement séquestré pour des raisons stériques.

La composition des produits finaux (discutée dans ce paragraphe) étudiés dans le reste du manuscrit est résumée sur la Figure 42. La proportion en EPS et pNIPAM greffé au sein des EPS-pNIPAM (polymères greffés hors pNIPAM libre) est également détaillée sur la Figure 43.

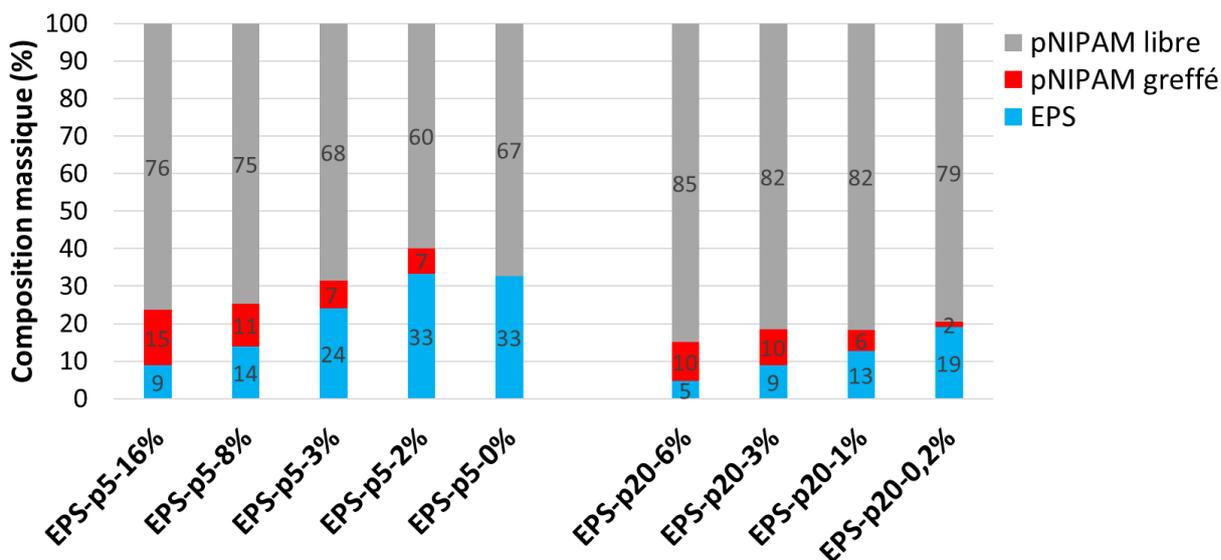


Figure 42. Composition des produits finaux issus du greffage EPS/p5 et EPS/p20. L'EPS-p5-0% est une association non covalente entre l'EPS et le pNIPAM.

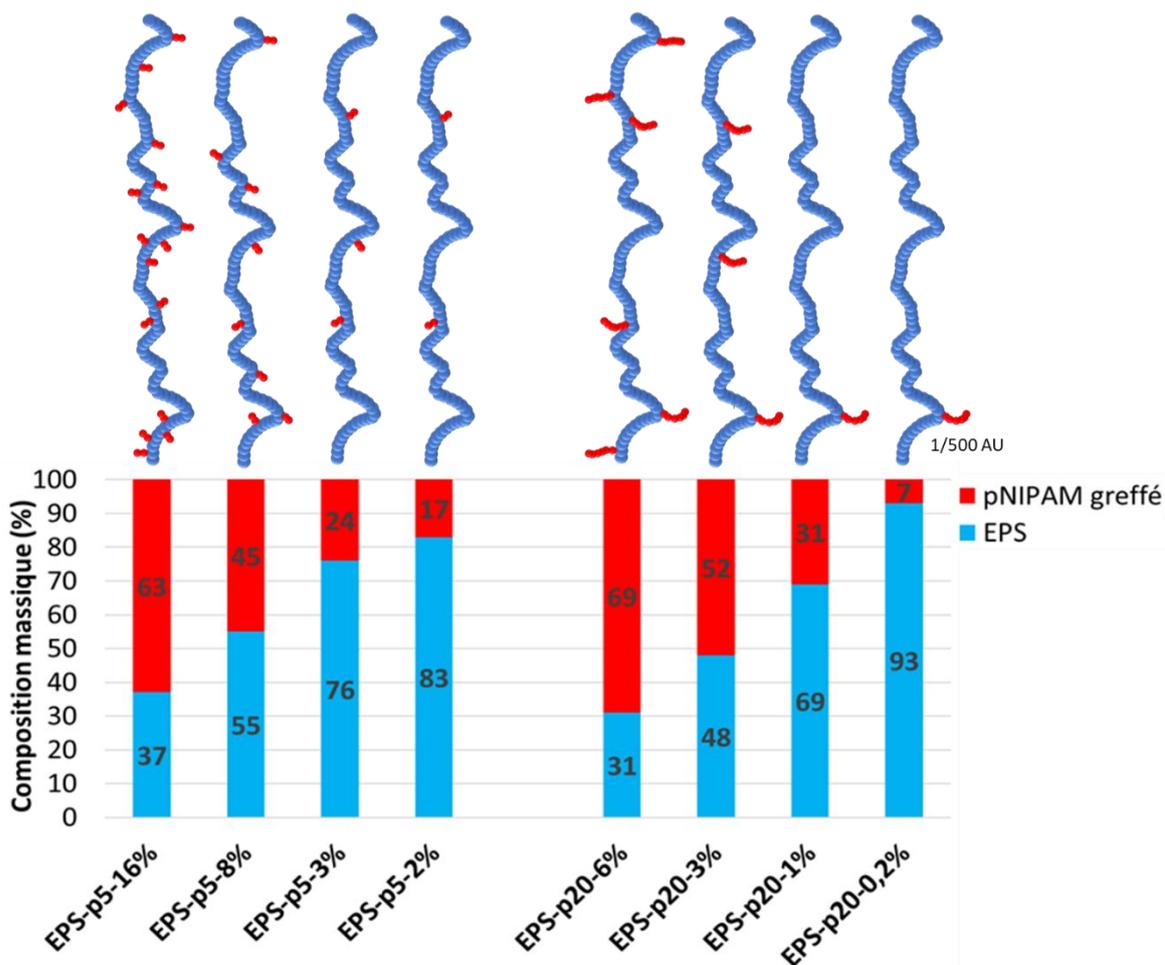


Figure 43. Composition détaillée des polymères greffés, EPS-pNIPAM, en EPS et pNIPAM greffé. Le schéma représente la densité de greffage (Tableau XI) d'une chaîne d'EPS simplifiée modélisée par 100 acides uroniques successifs (en bleu) greffés par x chaînes de pNIPAM (en rouge)

### 3.2.2. Estimation de la présence de pNIPAM libre par dosages spectroscopiques

Malgré l'utilisation d'une membrane de dialyse au seuil de coupure (50 000 g/mol) respectivement 10 fois et 2,5 fois plus grand que le p5 et p20, le pNIPAM non greffé, représente une part non négligeable des produits finaux démontrant l'importance d'analyser leur composition au terme du greffage. Dans le cadre d'une série de réactions de greffage ou d'une phase d'optimisation de la purification, l'évaluation rapide de cette composition peut être souhaitable. Or, en FI-AF4, la durée de la séquence d'élution d'un échantillon est de 42 minutes. A cela s'ajoute l'élution d'un blanc nécessaire pour l'établissement de la ligne de base. Enfin, pour des résultats fiables, un triplicat est essentiel. La durée totale d'analyse pour une condition est donc de 252 minutes. Ainsi, le FI-AF4 est un procédé robuste mais lourd en terme de temps d'analyse.

A l'inverse, les dosages spectroscopiques reposent sur des réactions rapides de quelques minutes à quelques heures, généralement réalisables en microplaque permettant un screening rapide d'un ensemble d'échantillons. Les acides uroniques de l'EPS étant greffés par l'extrémité amine du pNIPAM au cours de la réaction de greffage, le suivi de la diminution du nombre de fonctions carboxyles libres est une des possibilités. En effet, en comparaison d'un EPS natif, une quantification directe du pourcentage d'acides uroniques greffés serait possible par des dosages d'acides uroniques standards (Blumenkrantz & Asboe-Hansen, 1973; Cesaretti et al., 2003; Van den Hoogen et al., 1998). La question de l'accessibilité des acides uroniques de l'EPS pouvant être posée, notamment après le greffage par quelques chaînes de pNIPAM, le suivi de la diminution du nombre de fonctions amines a été privilégié. Une fois greffée, l'extrémité amine du pNIPAM, à l'origine du pont amide liant EPS et pNIPAM, n'est plus disponible. Quantifier la présence de la fonction amine revient donc à doser le pNIPAM libre non greffé. Connaissant la concentration de produit final utilisée pour le dosage et les proportions d'EPS (considérées inchangées) pour chacune des conditions, la proportion de pNIPAM greffé pourra être supposée à partir de la détermination du pNIPAM libre, permettant ainsi de remonter à la densité de greffage des acides uroniques de l'EPS.

Udenfriend et al. (1972) sont les premiers à avoir décrit la fluorescamine comme un réactif permettant la détection à haute sensibilité des amines primaires (en comparaison de la ninhydrine). Cette méthode est aujourd'hui utilisée couramment (Grant & Pattabhi, 2001;

Shiroya et al., 1995; Sugiura et al., 2009). Par exemple, le degré de fonctionnalisation d'un pNIPAM (Mn 39 200 g/mol) par NH<sub>2</sub> a été évalué par Lee et al. (2010). Parmi les paramètres susceptibles d'impacter la réaction, l'un des plus importants est le pH du milieu. Si le pH est trop bas, l'extrémité amine du pNIPAM sera protonée et donc indisponible pour la réaction. A l'inverse, si le pH est trop élevé, l'hydrolyse de la fluorescamine semble prédominer sur la réaction fluorogène. En milieu neutre ou légèrement alcalin (8 à 9), les fluorophores sont stables à température ambiante pendant des heures (De Bernardo et al., 1974) et la réaction est terminée en quelques minutes (Udenfriend et al., 1972). Il est également reconnu que la réaction est affectée par les sels du tampon. A pH 8, la réaction serait 4 fois plus importante en tampon phosphate 0,1 M qu'en tampon borate 0,1 M (Stein et al., 1974). La cinétique de l'hydrolyse de la fluorescamine à pH 8 serait également réduite de moitié en tampon phosphate par rapport au tampon borate, tandis qu'une diminution de la concentration de borate de 0,10 M à 0,05 M à pH 9 entraînerait une augmentation du taux d'inactivation de la fluorescamine. Sur la base de ces résultats, le dosage de la fluorescamine a été appliqué aux produits finaux EPS/p5 afin de quantifier la présence de pNIPAM-NH<sub>2</sub> libre en comparant les valeurs obtenues à celles déterminées en FI-AF4-MALS-dRI. Différents sels de tampons à 0,1 M, pH 8,5 ont été testés pour évaluer leur effet sur la réaction (protocole en II.2.3.3.1).

Les pourcentages massiques de pNIPAM libre déterminés par le dosage fluorimétrique sont bien inférieurs à ceux obtenus en FI-AF4-MALS-dRI (Tableau XII). Ils varient de 14 % à 34

**Tableau XII. Pourcentages massiques de pNIPAM libre au sein des produits finaux EPS/p5 obtenus par FI-AF4, par dosage fluorescamine et dosage TNBS (à 1 mg/mL). Pour les dosages spectroscopiques, une gamme de p5 « brut » (Sigma) a été utilisée (0 à 0,4 mg/mL).**

		EPS-p5-16%	EPS-p5-8%	EPS-p5-3%	EPS-p5-2%	EPS-p5-0%
<b>FI-A4F</b>	<b>Acétate d'ammonium 0,1M</b>	<b>76</b>	<b>75</b>	<b>68</b>	<b>60</b>	<b>67</b>
	<b>Borate 0,1 M pH 8,5</b> (pente = 299,63 ; R <sup>2</sup> = 0,9953)	32	34	32	24	40
<b>Fluorescamine</b>	<b>Bicarbonate de sodium 0,1 M pH 8,5</b> (pente = 140,07 ; R <sup>2</sup> = 0,9991)	21	17	20	18	35
	<b>PBS 0,1 M pH 8,5</b> (pente = 435,31 ; R <sup>2</sup> = 0,9932)	28	27	28	24	30
	<b>Eau</b> (pente = 474,13 ; R <sup>2</sup> = 0,9975)	23	31	21	14	23
<b>TNBS</b>	<b>Bicarbonate de sodium 0,1 M pH 8,5</b> (pente 0,601 ; R <sub>2</sub> = 0,9982)	21	22	26	24	31

% en fonction du tampon et de l'EPS-p5 étudié contre 60 % à 76 % d'après FI-AF4-MALS-dRI (Figure 42). Afin de déterminer si la diminution mesurée provient du dosage à la fluorescamine, un autre dosage des amines primaires a été utilisé. Le dosage TNBS est un dosage colorimétrique qui repose sur la formation d'un composé orangé en présence d'amine primaire (protocole en II.2.3.3.2). Liu et al. (2017) ont ainsi mesuré le degré de fonctionnalisation d'un pNIPAM ( $M_n$  3 500 à 5 200 g/mol) par  $NH_2$ , de même que Chen et al. (2011) (pNIPAM,  $M_w$  36 000 g/mol) *via* ce dosage. Le greffage des fonctions amines d'un chitosane par un pNIPAM-COOH a également été ainsi évalué (Chen & Cheng, 2009). Or, ce dosage colorimétrique donne des résultats relativement similaires à ceux du dosage fluorimétrique par la fluorescamine avec des pourcentages de pNIPAM libre variant de 21 à 26 %.

Pour la réalisation de ces deux dosages, une gamme de p5 « brut » issu du contenant commercial Sigma puis solubilisé dans le tampon considéré a été utilisée. Or, le pNIPAM libre dosé au sein des produits finaux a subi le cycle de la réaction (solubilisation dans MES 50 mM, pH 4,8) puis la dialyse (NaCl 24 h et eau osmosée 48 h). Il s'avère qu'une gamme de p5 « dialysé », issu d'un p5 pour lequel le procédé de la réaction a été appliqué (condition de réaction sans EPS/EDC/NHS, puis dialyse), présente une pente dont la valeur est divisée par 2 en comparaison d'une gamme de p5 « brut » (exemple : 70,174,  $R^2 = 0,9992$  en tampon bicarbonate 0,1 M pH 8,5) et ce quel que soit le tampon et le dosage considéré (fluorescamine/TNBS). Pour une même concentration en pNIPAM libre, la réponse obtenue est donc deux fois plus faible. Deux hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer ce résultat : (1) les conditions de solubilisation et de dialyse diminueraient par la suite la réactivité de l'extrémité amine du pNIPAM libre issu du procédé ; cette diminution pourrait être due à l'agrégation des chaînes de pNIPAM comme observée par FI-AF4-MALS-dRI et/ou (2) le p5 « brut » contiendrait des résidus (certainement issus de la polymérisation du NIPAM et de la fonctionnalisation du pNIPAM obtenu) capables de réagir avec les réactifs fluorescamine/TNBS et ainsi d'augmenter la réponse du dosage. Ces molécules seraient éliminées lorsque le pNIPAM est dialysé.

Avec cette nouvelle pente, la valeur du pourcentage de pNIPAM libre est donc multipliée par 2. Pour l'EPS-p5-0%, qui ne contient que de l'EPS et du pNIPAM libre, le dosage à la fluorescamine utilisant le tampon bicarbonate 0,1 M, pH 8,5 ainsi que le dosage TNBS

s'approche ainsi du pourcentage d'amine libre défini par FI-AF4 (67 %) avec 70 % et 62 % respectivement. Cependant, il s'avère que le pourcentage d'amine libre pour les échantillons greffés, bien que doublé, ne dépasse pas 46 %. Une différence de réponse entre les composés EPS-p5 greffés et EPS/p5 libre (EPS-p5-0%) est donc observée et semble provenir des caractéristiques des polymère formés EPS-pNIPAM. Pour ces polymères, Il est possible d'envisager que le pNIPAM libre soit en interaction avec les chaînes de pNIPAM greffées et/ou séquestré au sein des agrégats formés par les interactions inter-chaînes d'EPS-pNIPAM identifiés en FI-AF4-MALS-dRI. Le pNIPAM libre serait donc moins disponible pour la réaction avec la fluorescamine. L'autre hypothèse provient d'une altération de la réponse des dosages provoquée par l'EPS-pNIPAM. En effet, la fluorescamine présente la capacité de réagir avec une large gamme de composés nucléophiles (amines, alcools et thiols). Or, seules les amines primaires peuvent donner des produits fluorescents avec le réactif. Ainsi, les alcools peuvent donc en interagissant avec la fluorescamine conduire à une diminution de la réponse de fluorescence (Castell et al., 1979; De Bernardo et al., 1974; Derayea & Samir, 2020). Les groupements hydroxyles de l'EPS pourraient diminuer la réponse du dosage. Il n'y a cependant pas de raison évidente permettant de justifier pourquoi cet effet serait renforcé dans le cas d'un EPS-pNIPAM vis-à-vis d'un EPS seul, la quantification du pNIPAM libre étant acceptable dans le cas de l'EPS-p5-0%. Outre les réactions covalentes parasites possibles, l'environnement de réaction du dosage affecte également l'intensité de fluorescence des dérivés de fluorescamine, une fois formés (Stein et al., 1974). Comme preuve de concept, Giovannini et al. (2021) ont mélangé la forme fluorescente de la fluorescamine (activée après conjugaison avec le chitosane) avec une argile de montmorillonite (MMT) (composé de silicate d'aluminium et de magnésium hydraté) à différentes concentrations. La réponse de la fluorescamine-chitosane en présence de MMT a été augmentée. A l'inverse, Suliman et al. (2008) ont relevé une diminution du signal de la fluorescence en présence de SDS. Ainsi, les mécanismes qui conduisent à l'altération des propriétés optiques d'un fluorophore et chromophore liés aux molécules environnantes (formation de liaisons hydrogène, interactions acide-base, transfert de charge) pourraient également expliquer les différences observées par les dosages spectroscopiques de pNIPAM libre entre les EPS-pNIPAM greffés et le mélange libre EPS/pNIPAM (EPS-p5-0%), au vu des caractéristiques physico-chimiques propres de l'EPS-pNIPAM ( $M_w > 10^8$  g/mol, structure dense).

Le pourcentage de pNIPAM libre étant fortement sous-estimé par ces méthodes spectroscopiques, elles pourront être utilisées uniquement à des fins de détection « on/off » indiquant la présence ou l'absence relative de pNIPAM libre au sein des produits finaux.

### 3.2.3. Analyse du greffage par réflexion totale atténuée - Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (ATR-FTIR)

Les polymères EPS natif, pNIPAM (p5 et p20) et EPS-pNIPAM (libre ou greffés) ont été analysés par spectroscopie ATR-FTIR (protocole en II.2.3.4). Les spectres EPS, p5 et EPS-p5 sont présentés sur la Figure 44.A et ceux des échantillons d'EPS-p20 sur la Figure 44.B.

Les régions d'absorption de l'infernane concordent avec les bandes vibrationnelles décrites par Raguénès et al. (1997) et par Guezennec et al. (1998). Une large bande d'absorption autour de  $3310\text{ cm}^{-1}$  et une bande faible autour de  $2920\text{ cm}^{-1}$  sont associées, respectivement, aux vibrations d'étirement OH et CH. Deux fortes absorptions à  $1600\text{ cm}^{-1}$  et  $1408\text{ cm}^{-1}$  sont attribuées aux vibrations d'étirement asymétriques et symétriques des groupements carboxylates. La bande d'absorption autour de  $1350\text{ cm}^{-1}$  est attribuée aux vibrations de déformation  $\text{CH}_2/\text{CH}_3$  et C-OH. Les bandes d'absorption à  $1250$ ,  $820$  et  $600\text{ cm}^{-1}$  sont attribuées aux esters de sulfate. La bande autour de  $1016\text{ cm}^{-1}$  coïncide avec les vibrations d'étirement du C-O des cycles pyranoses du polysaccharide.

Les spectre ATR-FTIR du p5 et p20 présentent les signaux caractéristiques du pNIPAM. La bande d'absorption autour de  $3300\text{ cm}^{-1}$  est associée à la vibration d'étirement NH. Les bandes amide I ( $1635\text{ cm}^{-1}$ ), amide II ( $1535\text{ cm}^{-1}$ ) et amide III ( $1170 - 1130\text{ cm}^{-1}$ ) sont caractéristiques des vibrations de déformation C=O, NH et d'étirement CN, respectivement. Les deux bandes à  $1387$  et  $1367\text{ cm}^{-1}$  sont associées à la vibration de déformation symétrique des méthyles du groupement isopropyle du pNIPAM. Enfin, les bandes autour de  $2800$  à  $3100\text{ cm}^{-1}$  et à  $1457\text{ cm}^{-1}$  correspondent aux vibrations d'étirement asymétriques et de déformation asymétriques des groupements CH/CH<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>.

Les spectres des polysaccharides greffés EPS-pNIPAM ont un profil d'absorption similaire à celui du pNIPAM seul hormis à  $1016\text{ cm}^{-1}$ , où l'on observe la diminution de la bande du cycle pyranose, conformément à la proportion massique d'EPS au sein de chaque produit final (de 9 à 33 % pour les EPS-p5 et de 5 à 19 % pour les EPS-p20 respectivement, Figure 42). Aucune nouvelle bande d'absorption attestant du greffage du pNIPAM sur l'EPS n'est observée car la réaction de couplage conduit à la formation d'une liaison amide entre les

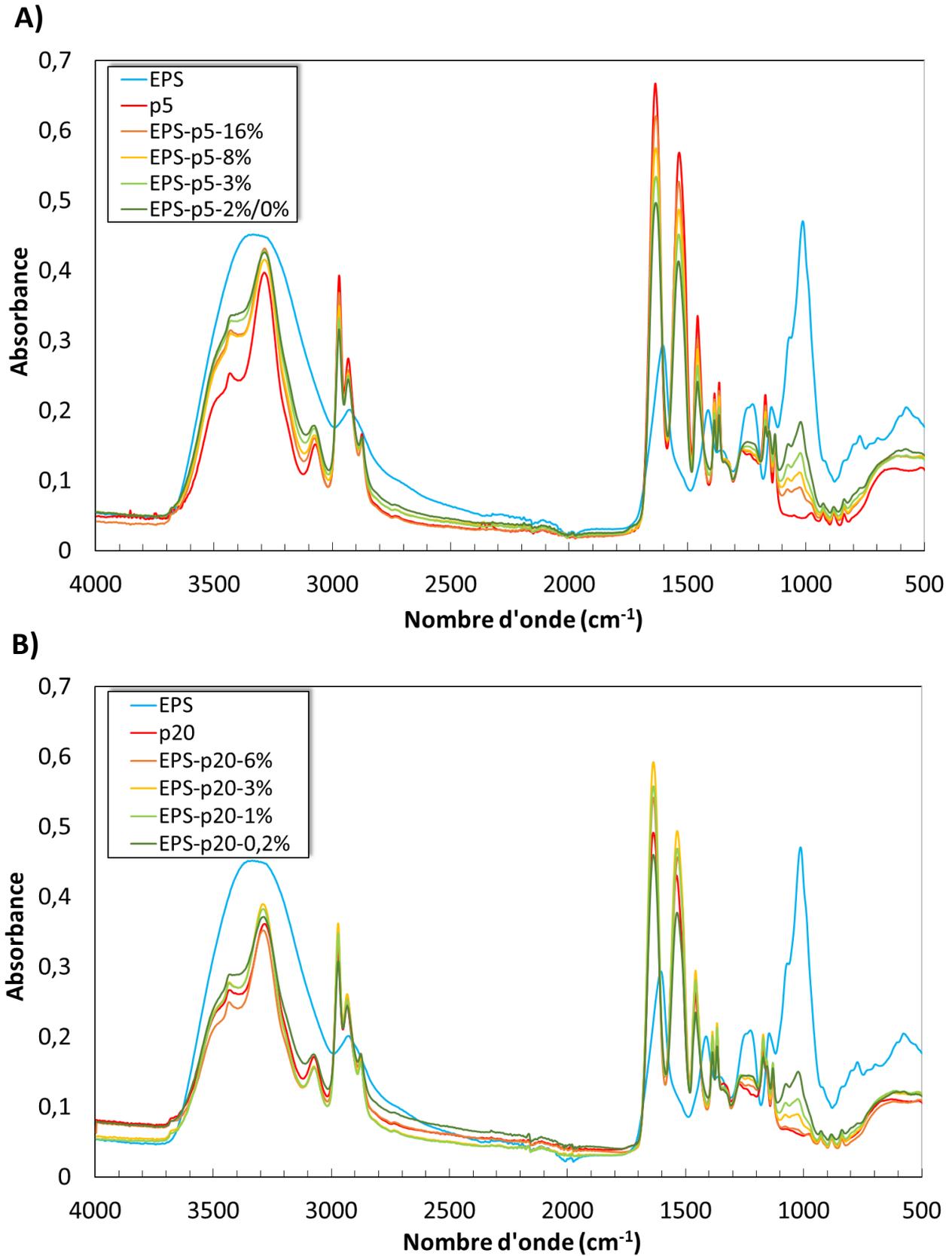


Figure 44. Spectres ATR-FTIR d'échantillons A) d'EPS-p5 et B) d'EPS-p20.

acides carboxyliques de l'EPS et l'amine du pNIPAM, déjà présente au sein de l'unité répétitive du pNIPAM (une chaîne de pNIPAM p5 et p20 comportent respectivement 48 et 176 fonctions amides ; 5 500 ou 20 000 g/mol divisé par la masse molaire de l'unité répétitive 113 g/mol). Le greffage, autrement dit la liaison amide formée, aura donc un impact très faible sur l'intensité totale de la bande amide en ATR-FTIR (2 % (1/49) et 0,6 % (1/177) pour le greffage EPS/p5 et EPS/p20 respectivement). Ainsi, il n'est pas possible à partir des spectres ATR-FTIR de faire la distinction entre le pNIPAM libre et le pNIPAM greffé dans le cas d'un greffage conduisant à la formation d'une liaison amide comme affirmés par D'Este et al. (2012). En effet, le spectre ATR-FTIR d'EPS-p5-2% se superpose à celui de l'EPS-p5-0% non greffé. Néanmoins, la technique FTIR est couramment employée pour justifier l'efficacité du greffage de pNIPAM-NH<sub>2</sub>/polysaccharide-COOH comme pour l'alginate (Li et al., 2015; Soledad Lencina et al., 2014), l'acide hyaluronique (Chen et al., 2011; Ha et al., 2006), le carboxyméthyle guar (Gupta et al., 2011) ou encore le pNIPAM-COOH/polysaccharide-NH<sub>2</sub> avec le chitosane (Chen & Cheng, 2006; Lai & Luo, 2017) qui conduisent pourtant à la formation d'un pont amide présent au sein du pNIPAM. Seul le rapport massique pNIPAM/polysaccharide sera une nouvelle fois acquis par cette approche, l'information ayant déjà été obtenue par la pesée du produit final au terme de la lyophilisation.

#### 3.2.4. Analyse du greffage par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Afin de mieux comprendre la structure de l'EPS-pNIPAM, la spectroscopie RMN a été appliquée pour caractériser finement le greffage covalent entre les deux polymères (protocole en II.2.3.5). Les spectres RMN-<sup>1</sup>H de l'EPS, du p5, de l'association non covalente (EPS-p5-0%) ainsi que du polymère greffé EPS-p5-2% ont été mesurés à 40 °C, une température supérieure à la LCST du pNIPAM. Cette température offrait une meilleure résolution des pics obtenue pour les protons situés dans un système plus rigide (Coronado et al., 2011). Une comparaison des spectres a clairement révélé une prédominance écrasante des pics liés à p5 par rapport à l'unité répétitive EPS (Figure 45), comme déjà observée pour le greffage de pNIPAM sur des polysaccharides de haute masse molaire (Ciocoiu et al., 2018; Coronado et al., 2011; Ter Boo et al., 2016). Cela pourrait être dû : 1) au nombre plus élevé d'unités répétitives p5 par rapport à l'EPS (environ 48 unités x 34 chaînes greffées soit 1632 unités répétitives contre 567 (Tableau VIII), respectivement), mais également 2) à un temps de relaxation transversal plus court de la chaîne polysaccharidique causé par des mouvements lents associés à sa longueur élevée.

Pour pouvoir caractériser la liaison covalente entre les deux polymères, un spectre  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -homonucléaire et un spectre  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -hétéronucléaire 2D-RMN (COSY et DEPT-HSQC, respectivement) ont été mesurés. L'attention s'est concentrée sur la région des spectres entre environ 2,5 et 3,5 ppm, où se situent les signaux  $^1\text{H}$  des groupements méthylènes du groupement aminoéthanethiol ( $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$ , indiqué en e et f Figure 45/46) à l'extrémité p5 terminale (Lima et al., 2021). En particulier, les groupements  $\text{CH}_2\text{N}$  et  $\text{CH}_2\text{S}$  résonnent à  $\delta_{\text{H/C}}$  3,19/39,6 ppm et 2,82/30,1 ppm (f et e), respectivement, dans le spectre de p5 seul et de son mélange avec le polysaccharide (EPS-p5-0%) (Figure 46), révélant ainsi que toutes interactions ioniques entre l'amine du pNIPAM et les groupements carboxyles de l'EPS n'ont eu aucun effet sur le déplacement chimique de la fraction aminoéthanethiol. Or, une augmentation de la valeur du déplacement chimique  $^1\text{H}$  lié au groupement  $\text{CH}_2\text{N}$  (f') a été observée dans le

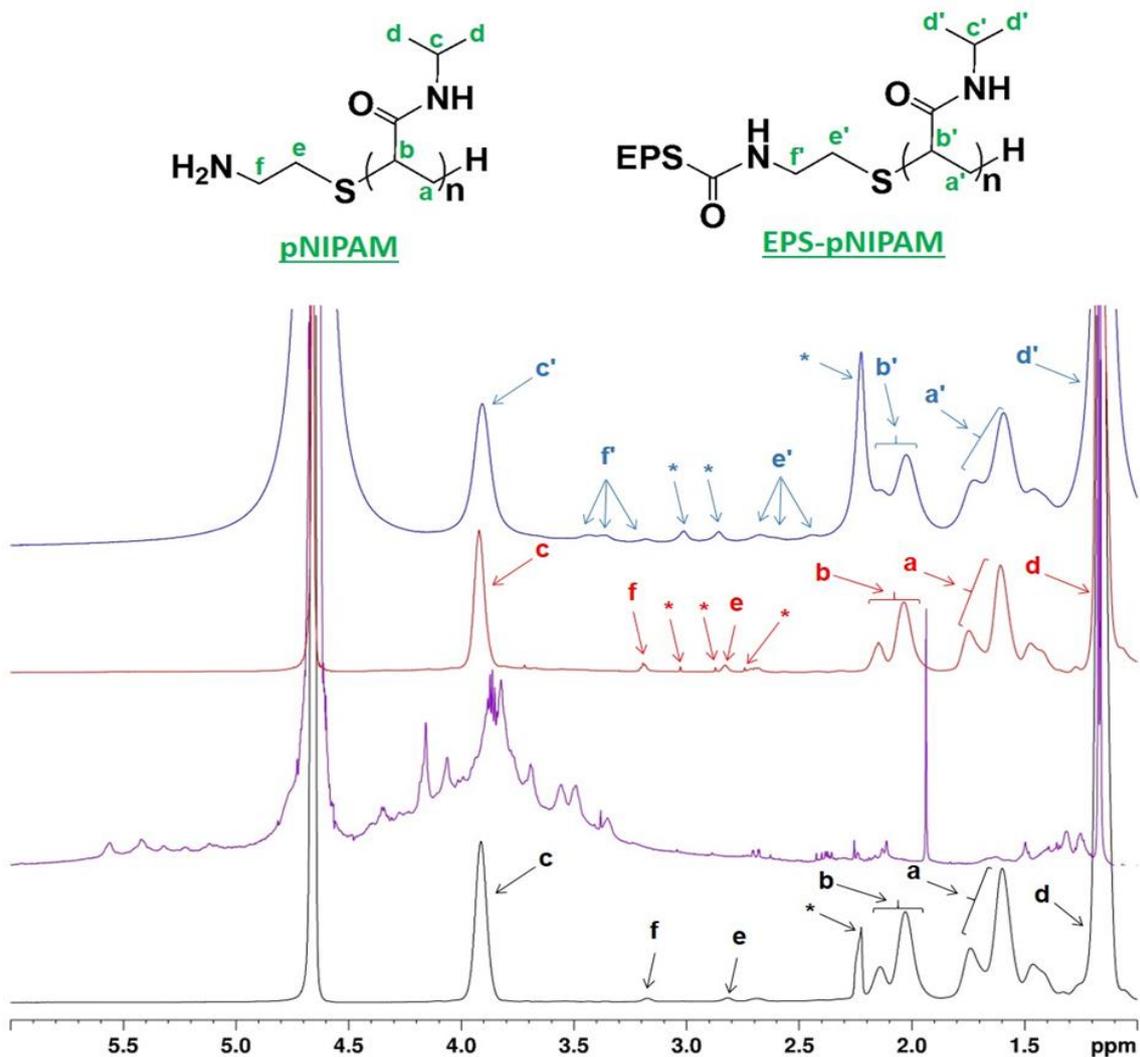


Figure 45. Spectres RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 600 MHz, 40 °C) du p5 (noir), de l'EPS (violet), de l'EPS-p5-0% (rouge) et de l'EPS-p5-2% (bleu). Les signaux marqués d'un astérisque sont liés à des contaminants de faible masse molaire, comme le démontre leur absence dans les spectres RMN- $^1\text{H}$  diffusionnelle (DOSY, voir Figure S1).

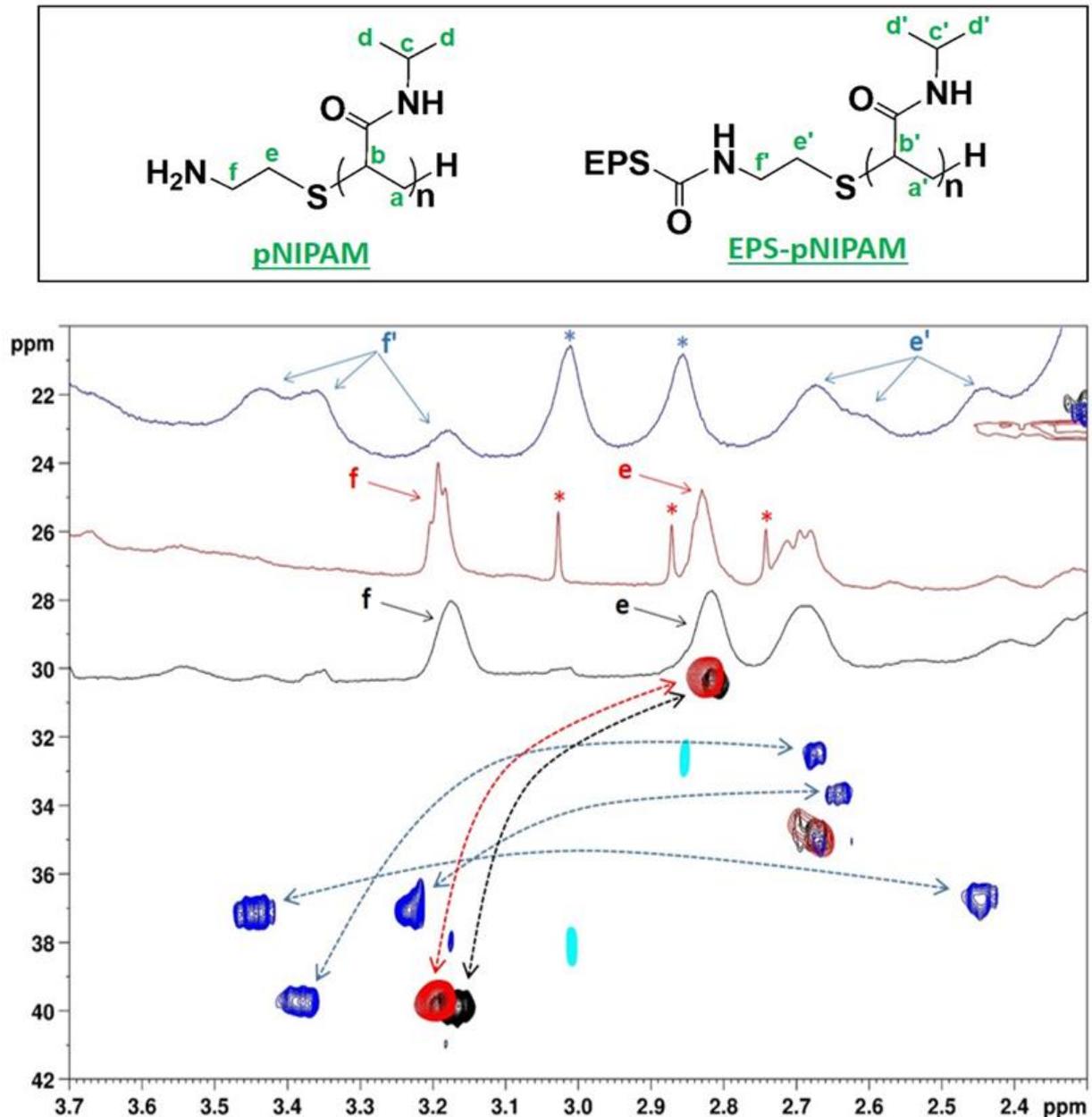


Figure 46. Structure chimique du pNIPAM et de l'EPS greffé. Région agrandie des spectres RMN- $^1\text{H}$  et  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -DEPT-HSQC (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 40 °C) des échantillons p5 (noir), EPS-p5-0% (rouge) et EPS-p5-2% (bleu) (groupements  $\text{CH}_2$  en noir, rouge et bleu, groupements  $\text{CH}$  et  $\text{CH}_3$  en gris, orange et bleu clair dans les spectres DEPT-HSQC de p5, EPS-p5-0% et EPS-p5-2%, respectivement). Les signaux marqués d'un astérisque sont liés à des contaminants de faible masse molaire, comme en témoigne leur absence dans les spectres RMN- $^1\text{H}$  diffusionnelle (DOSY, voir Figure S1). Les flèches relient les signaux liés aux protons sur les atomes de carbones adjacents, comme le révèlent les spectres COSY (voir Figures S2-S4). Les spectres RMN complets  $^1\text{H}$  et  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -DEPT-HSQC sont présentés sur les Figures S5-S7.

spectre du polymère greffé EPS-p5-2%, en accord avec la présence d'un groupement électroattracteur lié à l'atome d'azote, c'est-à-dire un groupement carboxyle formant une liaison amide (Chen et al., 2005). De plus, les signaux uniques de CH<sub>2</sub>N et CH<sub>2</sub>S (f et e respectivement), dans les spectres p5 et EPS-p5-0% DEPT-HSQC se sont divisés en trois signaux différents dans le spectre EPS-p5-2% (f' et e' respectivement), suggérant ainsi que l'amidoéthanethiol (CONHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S) est divisé en trois environnements chimiques différents (Figure 46). Cela pourrait être attribué à un effet des groupements C=O impliqués dans les liaisons amides, situés sur trois unités AU différentes de l'unité répétitive EPS.

La RMN-<sup>1</sup>H est classiquement employée afin de déterminer l'efficacité du greffage polysaccharide/pNIPAM (Barbier et al., 2023; D'Este et al., 2012; M.Liu et al., 2019; Soledad Lencina et al., 2014). Lorsque ce dernier est établi par la formation d'un pont amide, déjà présent au sein du pNIPAM, le greffage ne pourra être démontré par l'apparition d'un nouveau signal. L'étude RMN des composés issus de tels greffages repose alors généralement sur l'intégration des signaux caractéristiques des deux polymères tels que l'hydrogène du carbone anomérique (ou autres) du polysaccharide, et les hydrogènes des groupements méthyles/méthylènes du pNIPAM. Or, à l'image de la technique FTIR, cette approche permet uniquement d'évaluer la composition massique polysaccharide/pNIPAM, et n'est donc en aucun cas une preuve de greffage. Seule l'utilisation de la RMN telle que réalisée au cours de cette étude permet de démontrer le greffage covalent entre les polymères. La comparaison systématique avec une association non covalente polysaccharide/pNIPAM (non greffé) est également importante.

Dans le cas du greffage invernane/pNIPAM, on pourrait imaginer que le GalA de la chaîne principale est plus facilement accessible pour le greffage par les chaînes de pNIPAM que les 2 résidus GlcA de la chaîne latérale. Or, les résultats obtenus en RMN montrent que l'ensemble des AU est disponible pour le greffage puisque les 3 positions sont occupées par les chaînes de pNIPAM, confirmant ainsi les résultats de simulations de DM (II.3.1).

### 3.3. Caractérisation des propriétés thermosensibles de l'infernane greffé.

La composition des produits finaux ainsi que les densités de greffage de l'infernane étant déterminées, la question de l'impact de ces caractéristiques sur les propriétés thermosensibles des EPS-pNIPAM se pose. Notamment, les chaînes de pNIPAM greffées peuvent-elles induire (à ces densités de greffage) une transition de phase de l'ensemble du polymère EPS-pNIPAM en fonction de la température ? Ceci passe par la détermination de la température de transition (LCST) des polymères greffés et en évaluant l'évolution conformationnelle des chaînes d'EPS-pNIPAM autour de cette température.

#### 3.3.1. Détermination de la LCST dans des solutions semi-diluées d'infernane greffé

La détermination de la LCST a été réalisée par une mesure de l'absorbance en fonction de la température des solutions semi-diluées de polymères EPS-pNIPAM (protocole en II.2.4.1). À température ambiante, toutes les solutions préparées à 1 mg/mL sont transparentes et l'absorbance est quasiment nulle (Figure 47). La turbidité apparaît à 32 °C puis continue à croître avec la température comme le montre l'augmentation progressive de l'absorbance jusqu'à 38 °C. Le passage d'un aspect transparent à opaque à 32 °C résulte de la transition de phase induite par l'association des chaînes polysaccharidiques permise par les chaînes de pNIPAM greffées, montrant ainsi une nature thermosensible de l'infernane greffé. En effet, dans les solutions semi-diluées au-dessus de la LCST, des repliements intra-chaînes et des associations inter-chaînes entre les chaînes de pNIPAM se produisent, où les chaînes greffées créent des agrégats de type micelle diffusant la lumière et agissant comme des réticulations physiques (Guo et al., 2015; Mortisen et al., 2010; Petit et al., 2007). Cependant, il ne peut être exclu que la présence de pNIPAM libre (60 à 76 % pour les EPS/p5, Figure 42) dans les échantillons d'EPS-pNIPAM contribue à l'augmentation globale de l'absorbance, en particulier pour les EPS à faible densité de greffage, une évolution d'absorbance similaire étant observée entre l'EPS-p5-0% non greffé et l'EPS-p5-2% légèrement greffé (Figure 47.A). Barbier et al. (2023) mettent d'ailleurs en avant que l'opalescence au-dessus de la LCST des polymères hyaluronane-pNIPAM formés serait associée à la présence de pNIPAM non greffé résiduelle (sans pour autant le quantifier). Cependant, la LCST de l'infernane greffé serait à minima proche du pNIPAM pur (32 °C) au vu du profil d'évolution de l'absorbance proche de celui du pNIPAM, et serait indépendante du pourcentage de greffage comme rapporté pour d'autres

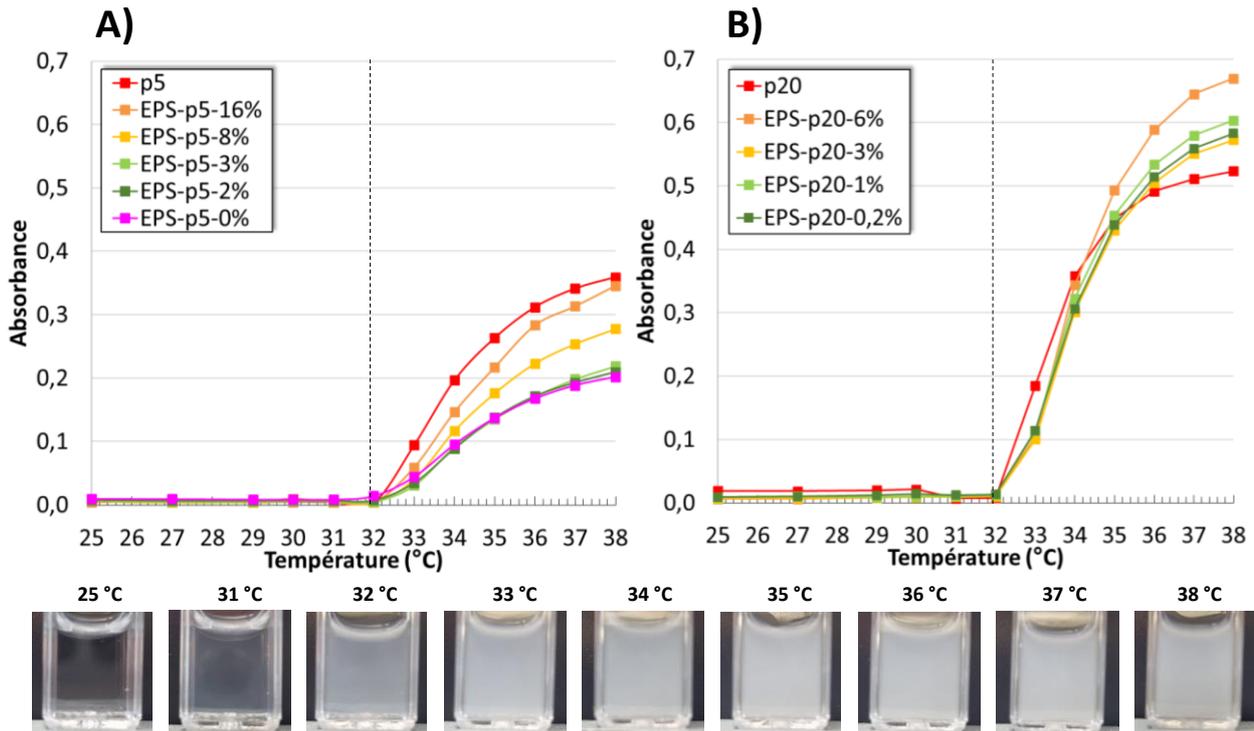


Figure 47. Évolution de l'absorbance avec la température pour des solutions semi-diluées (1 mg/mL, PBS, pH 7,4) A) de p5 et d'EPS-p5, et B) de p20 et d'EPS-p20. Des photographies illustrent l'évolution de la turbidité de la solution de p5 avec la température.

polysaccharides-pNIPAM greffés, tels que l'alginate (Vasile & Nita, 2011), l'hyaluronane (Chen & Cheng, 2009) et le pullulane (Constantin et al., 2017). Des propriétés thermosensibles similaires avec une LCST à 32 °C sont également observées pour les EPS-p20 (Figure 47.B), mais une absorbance plus élevée est mesurée en raison des chaînes de pNIPAM plus longues.

Des mesures de DLS ont ensuite été effectuées pour déterminer l'effet de la température sur la taille des polymères EPS-pNIPAM dans des solutions semi-diluées à 1 mg/mL (protocole en II.2.4.2) (Tableau XIII). En dessous de la LCST, à 25 °C, une population majeure de ~ 10 nm est présente pour le pNIPAM seul (p5 ou p20) (Figure 48.A/B), ainsi qu'une population de ~ 200 nm, résultant très probablement de l'association de chaînes de pNIPAM, comme déjà observée par FI-AF4-MALS-dRI (Tableau XI). Au-dessus de la LCST, à 38 °C, une seule population de pNIPAM de ~ 2300 nm a été mesurée, indiquant une agrégation des chaînes, induite par le réarrangement de l'eau à proximité de la surface du polymère, dominée par des interactions hydrophobes (Solorzano et al., 2020; Tavagnacco et al., 2018). Des résultats similaires ont déjà été rapportés par Yan et al. (2015) pour le pNIPAM seul en dessous et au-dessus de la LCST. À l'inverse, l'EPS seul ne présente aucune propriété thermosensible,

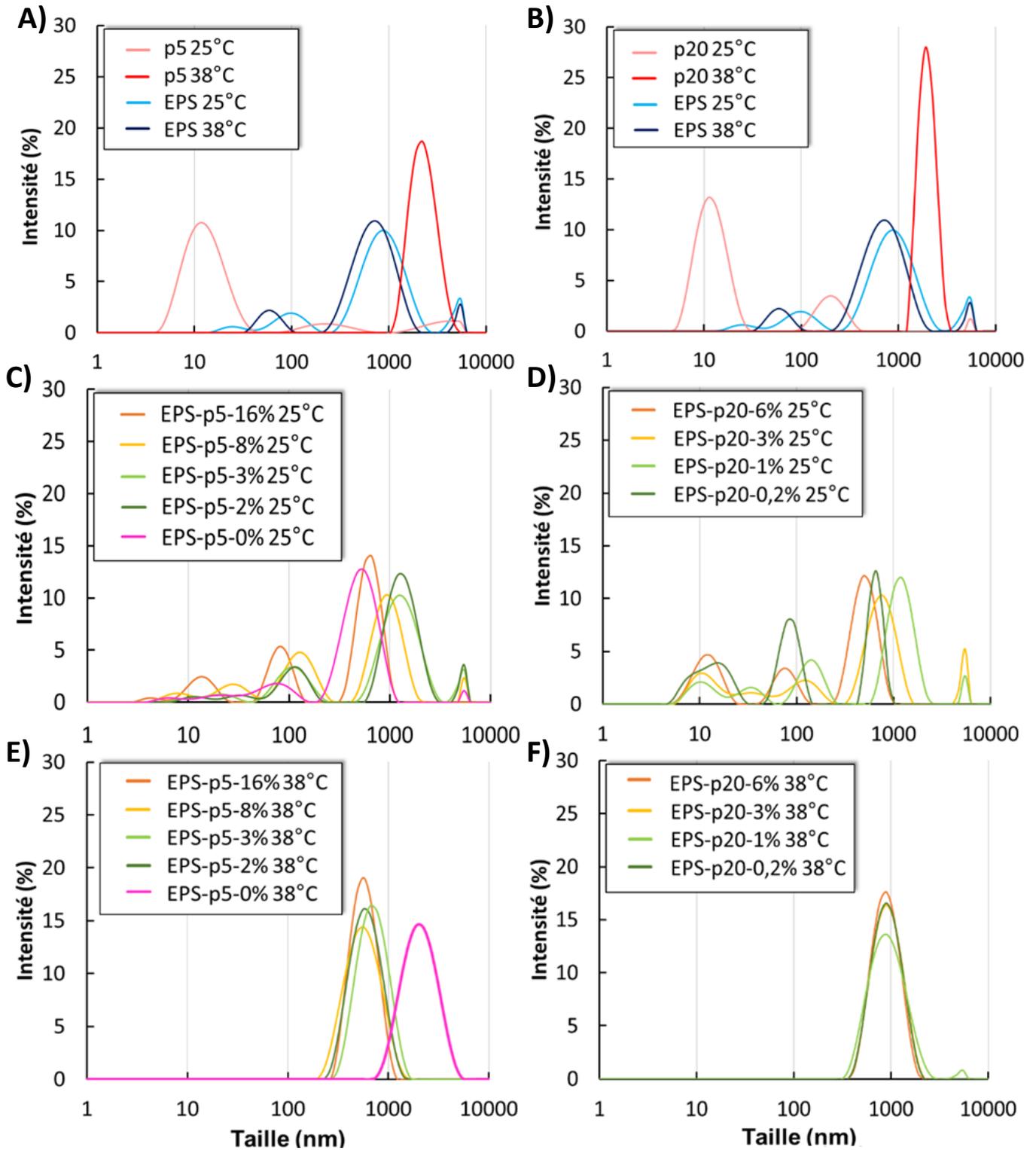
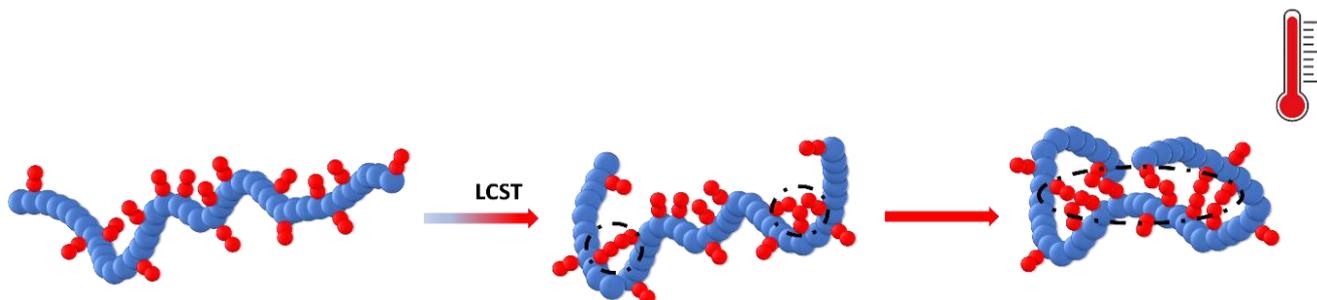


Figure 48. Taille des particules des solutions semi-diluées (1 mg/mL, PBS, pH 7,4) en dessous (25 °C) et au-dessus (38 °C) de la LCST. A) EPS et p5 à 25 °C et 38 °C, B) EPS et p20 à 25 °C et 38 °C, C) EPS-p5 à 25 °C, D) EPS-p5 à 38 °C, E) EPS-p20 à 25 °C et F) EPS-p20 à 38 °C. Voir Tableau XIII pour plus de détails.

la taille de la population majoritaire étant de  $\sim 900$  nm quelle que soit la température (Figure 48.A, Tableau XIII).

Dans le cas des polymères EPS-p5, en dessous de la LCST (à 25 °C), quatre populations sont observées (Figure 48.C) dont la principale (population 4) correspond le plus probablement à l'EPS greffé avec une taille variant de 643 nm pour l'EPS le plus greffé (EPS-p5-16%) à 1361 nm pour l'EPS faiblement greffé (EPS-p5-2%) (Tableau XIII). L'augmentation des tailles mesurées sous la LCST est corrélée au taux croissant d'EPS par échantillon (tous préparés à 1 mg/mL, contenant ainsi de 9 % à 33 % d'EPS) (Figure 42). Avec l'augmentation de la concentration d'EPS, les interactions inter-chaînes médiées par les chaînes de pNIPAM greffées sont favorisées, conduisant à des tailles plus élevées que l'EPS pur à ces mêmes concentrations (Figure 48.A/C). L'EPS-p5-0% non greffé qui comporte le même taux d'EPS que l'EPS-p5-2% (33 %) présente ainsi une taille inférieure à celui-ci, 539 nm contre 1361 nm respectivement. Ce résultat est en accord avec la conformation sphérique dense et les Mw supérieures à  $10^9$  g/mol uniquement obtenues pour les EPS greffés en FI-AF4-MALS-dRI à température ambiante (II.3.2.1). Les autres populations d'intensité plus faible à 25 °C sont très probablement issues de chaînes agrégées de pNIPAM libre.

Au-dessus de la LCST, à 38 °C, une diminution de la taille des particules (588 nm (EPS-p5-16%) à 730 nm (EPS-p5-2%)) est observée pour tous les échantillons d'EPS-p5 greffés avec la présence d'une seule population (Figure 48.E, Tableau XIII). Cette diminution indique le changement conformationnel des EPS greffés, où les interactions intra/inter-chaînes impliquant les chaînes de pNIPAM greffées conduisent au repliement de la chaîne polysaccharidique, permettant d'adopter une structure plus compacte schématisée sur la Figure 49, et ce d'autant plus que le polysaccharide est greffé. Ce repliement témoigne de la flexibilité de la chaîne de polysaccharide greffée discutée en simulations de DM (II.3.1),



**Figure 49.** Représentation schématique de l'évolution conformationnelle d'une chaîne isolée d'EPS-pNIPAM hypothétique en dessous et au-dessus de sa LCST médiée par les interactions intramoléculaires entre les chaînes de pNIPAM greffées. Les interactions intermoléculaires ne sont pas représentées mais participent néanmoins au changement conformationnel.

Tableau XIII. Distribution en intensité des tailles des particules de solutions semi-diluées de l'EPS, du pNIPAM (p5/p20) et des EPS-p5 et EPS-p20 (1 mg/mL, PBS, pH 7,4) à 25 °C et 38 °C. Associé à la Figure 48.

		25 °C						38 °C							
		EPS	p5	EPS-p5-16%	EPS-p5-8%	EPS-p5-3%	EPS-p5-2%	EPS-p5-0%	EPS	p5	EPS-p5-16%	EPS-p5-8%	EPS-p5-3%	EPS-p5-2%	EPS-p5-0%
Population 1	Taille (nm)	-	14	14	8	18	12	19	-	-	-	-	-	-	-
	%	-	84	13	5	6	3	6	-	-	-	-	-	-	-
Population 2	Taille (nm)	28	-	-	28	-	32	-	-	-	-	-	-	-	-
	%	3	-	-	10	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-
Population 3	Taille (nm)	100	258	83	129	113	114	70	61	-	-	-	-	-	-
	%	12	8	23	27	20	18	13	10	-	-	-	-	-	-
Population 4	Taille (nm)	945	-	643	977	1341	1361	539	756	2330	588	593	624	730	2167
	%	79	-	63	56	69	71	79	86	100	100	100	100	100	100
Population 5	Taille (nm)	4940	3500	-	-	5120	5270	5460	5220	-	-	-	-	-	-
	%	7	8	-	-	5	5	1	4	-	-	-	-	-	-

		25 °C					38 °C						
		EPS	p20	EPS-p20-6%	EPS-p20-3%	EPS-p20-1%	EPS-p20-0,2%	EPS	p20	EPS-p20-6%	EPS-p20-3%	EPS-p20-1%	EPS-p20-0,2%
Population 1	Taille (nm)	-	12	12	13	11	14	-	-	-	-	-	-
	%	-	80	25	17	11	30	-	-	-	-	-	-
Population 2	Taille (nm)	28	-	-	38	33	-	-	-	-	-	-	-
	%	3	-	-	6	7	-	-	-	-	-	-	-
Population 3	Taille (nm)	100	206	78	120	144	86	61	-	-	-	-	-
	%	12	19	15	13	19	32	10	-	-	-	-	-
Population 4	Taille (nm)	945	-	517	772	1219	658	756	1980	919	954	974	980
	%	79	-	60	57	59	38	86	100	100	100	100	100
Population 5	Taille (nm)	4940	5460	-	-	-	-	5220	-	-	-	-	-
	%	7	1	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-

particulièrement accentuée au-dessus de la LCST où les interactions entre les chaînes de pNIPAM greffées intra/intermoléculaires sont davantage favorisées. Un tel effondrement au-dessus de la LCST a également été observé en DLS pour d'autres polysaccharides tels que l'alginate (Vasile & Nita, 2011), le galactomannane (Lima et al., 2021) ou le dextrane (Carneiro et al., 2021), après greffage par du pNIPAM. A l'inverse, l'échantillon d'EPS-p5-0% non greffé présente à 38 °C une taille bien supérieure, similaire au pNIPAM seul (~ 2200 nm). Par conséquent, les chaînes polysaccharidiques greffées possèdent des propriétés thermosensibles propres qui résultent de la présence des chaînes de pNIPAM greffées, indépendamment du pNIPAM libre au sein du polymère final.

Des résultats similaires ont été obtenus pour les EPS-p20. A température ambiante, la taille des particules augmente avec le taux d'EPS relatif aux interactions inter-chaînes établies hormis pour l'EPS-p20-0,2% (658 nm, 19 % d'EPS), très faiblement greffé, qui présente une taille en solution légèrement supérieure à celle de l'EPS à cette concentration (Tableau XIII), en accord avec les résultats de FI-AF4-MALS-dRI montrant que la masse molaire et la conformation établies étaient proches de celles de l'EPS natif (Tableau XI). Néanmoins, à l'image des EPS-p5, tous les EPS-p20 affichent des propriétés thermosensibles au-dessus de la LCST et notamment une taille de particules inférieure au pNIPAM seul (~ 950 nm, supérieure à celle des EPS-p5 due à la longueur de chaîne du pNIPAM greffé) (Figure 48.D/F et Tableau XIII).

### 3.3.2. Étude de la morphologie de la chaîne d'infernane greffée par microscopie de force atomique (AFM)

L'imagerie AFM en mode contact intermittent à l'air a été utilisée pour étudier la morphologie des chaînes d'infernane greffées par le pNIPAM en dessous et au-dessus de la LCST (protocole en II.2.4.3). L'imagerie a été réalisée sur des échantillons fortement dilués afin d'éviter l'agrégation des chaînes au cours du séchage. Pour évaluer la morphologie des chaînes polysaccharidiques en dessous et au-dessus de la LCST, des solutions aqueuses d'EPS, de pNIPAM (p5 et p20) et d'EPS-pNIPAM à 1 mg/mL ont été incubées à 20 °C ou à 37 °C, avant d'être diluées à 5 µg/mL dans de l'eau (maintenue à 20 °C ou 37 °C). Avant l'imagerie, les échantillons ont été séchés sur une surface de mica fraîchement clivée à 20 °C ou à 37 °C.

En dessous de la LCST, la morphologie des chaînes polysaccharidiques greffées diffère déjà de celle observée pour l'EPS natif (non greffé) (Figure 50.A et Figure 51.A). Les chaînes apparaissent plus longues et fortement connectées avec une augmentation du diamètre des chaînes (en hauteur) de 0,36 nm pour l'EPS natif non greffé à 0,43 nm et 0,71 nm pour l'EPS-p5-8% et l'EPS-p5-16%, principalement observée sur les parties ramifiées. Des résultats similaires ont été obtenus pour l'EPS-p20-1% (0,95 nm), suggérant qu'au moins deux chaînes polysaccharidiques greffées pouvaient s'associer *via* des chaînes de pNIPAM (associations inter-chaînes) (Figure 50.B et Figure 51.B).

Au-dessus de la LCST, des chaînes d'EPS repliées ont été uniquement observées pour l'EPS-p5-16% le plus greffé. Bien que la densité de greffage soit plus faible ( $\leq 16\%$ ) que dans les simulations de DM réalisées à température ambiante ( $\geq 33\%$  minimum), les images AFM illustrent clairement l'existence d'une flexion locale des chaînes polysaccharidiques (accentuée au-dessus de la LCST) induite par les interactions intra-chaînes. Cette flexion favoriserait également les interactions des chaînes de pNIPAM des régions éloignées de l'EPS entraînant le repliement de la chaîne globale. En plus des chaînes polysaccharidiques repliées,

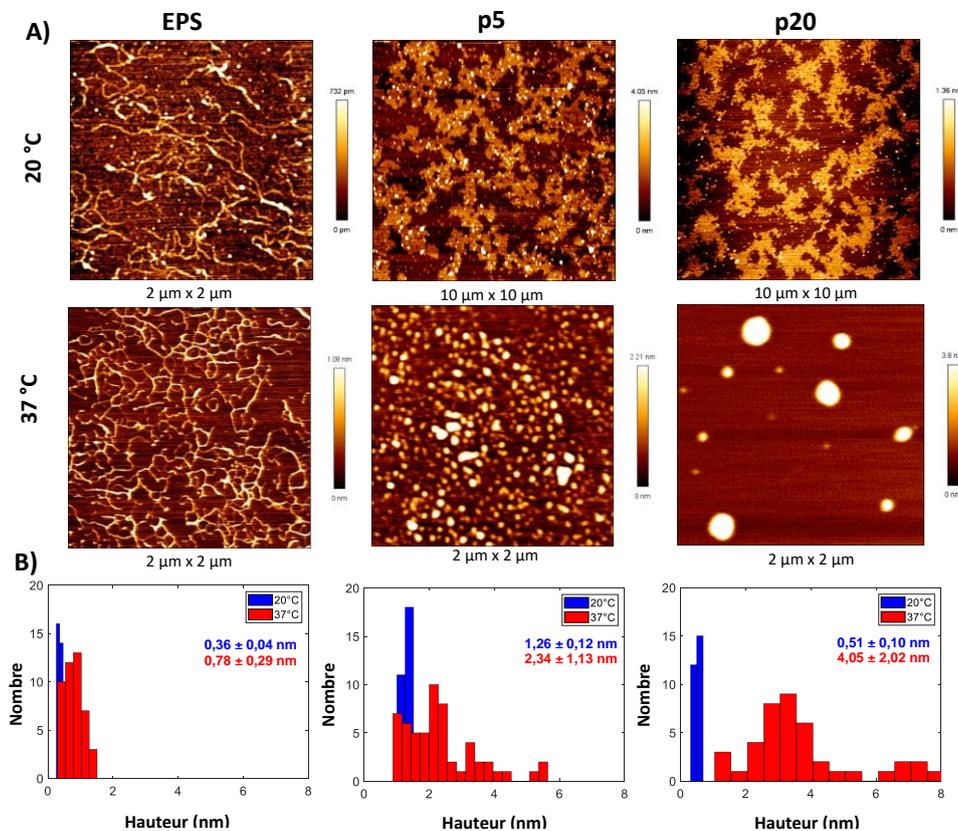


Figure 50. A) Images de hauteurs AFM ( $2\ \mu\text{m} \times 2\ \mu\text{m}$  ou  $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ ) obtenues en contact intermittent dans l'air et B) distribution de hauteurs de l'EPS, du p5 et du p20 à 20 °C et 37 °C.

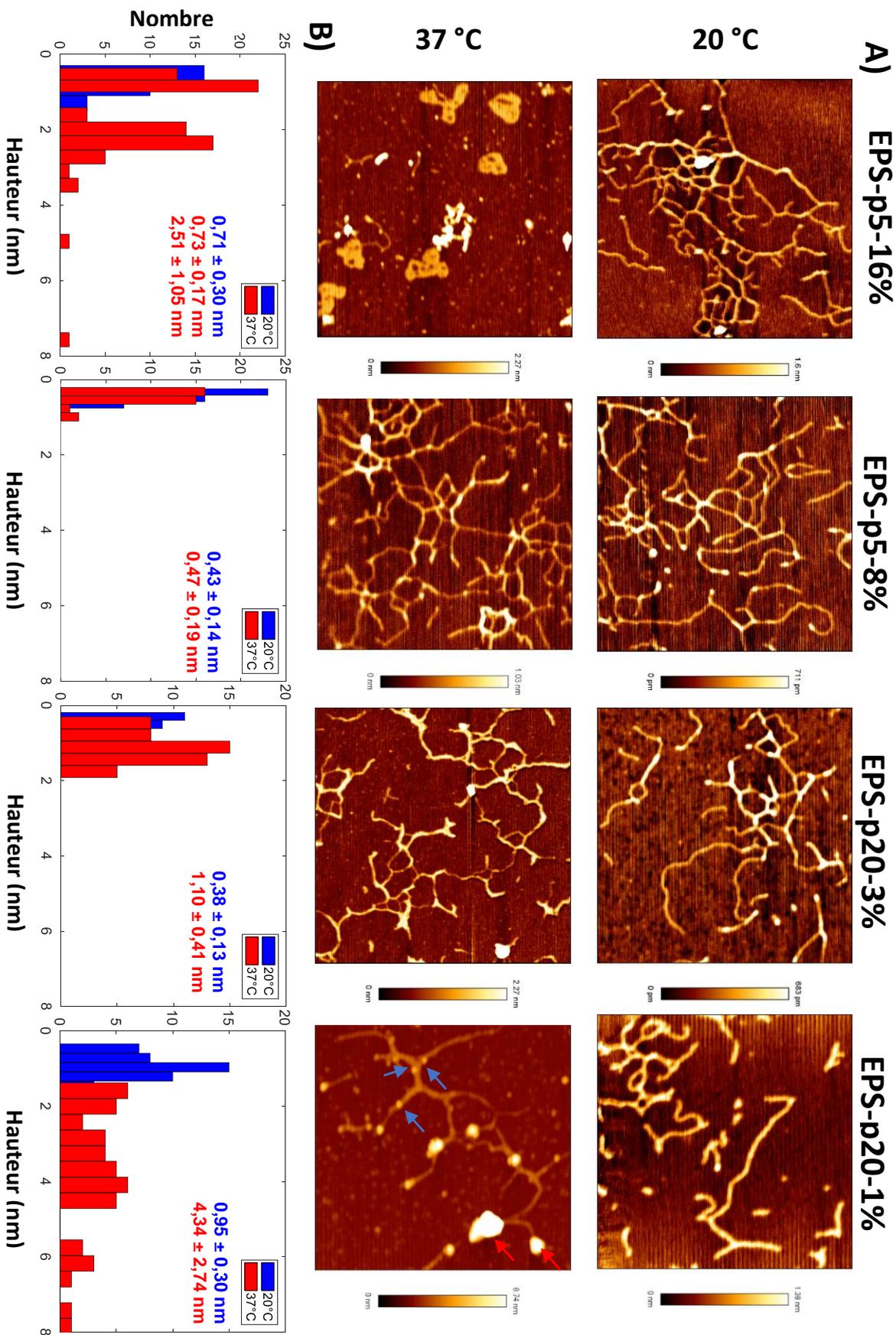


Figure 51. A) Images de hauteurs AFM (2  $\mu\text{m}$  x 2  $\mu\text{m}$ ) obtenues en contact intermittent dans l'air et B) distribution de hauteurs d'EPS-p5-16%, d'EPS-p5-8%, d'EPS-p20-3% et d'EPS-p20-1% à 20 °C et 37 °C. Pour l'EPS-p20-1%, les flèches bleues indiquent la présence d'assemblages nanométriques de chaînes de PNIPAM greffées tandis que les flèches rouges indiquent la présence supposée de nanoparticules de PNIPAM libre associées au PNIPAM greffé sur la chaîne de polysaccharide.

des chaînes de pNIPAM libres non greffées associées sous forme de nanoparticules de 2,5 nm de diamètre ont également été observées dans l'échantillon d'EPS-p5-16% (Figure 51.A/B).

Aucun repliement similaire de chaîne n'a été visualisé au-dessus de la LCST, dans les conditions très diluées utilisées, pour les autres EPS-p5 et les EPS-p20 moins greffés, où les morphologies des chaînes sont restées similaires en dessous et au-dessus de la LCST (Figure 51.A). En effet, la quantité d'AU fonctionnalisés par les chaînes de pNIPAM de ces EPS greffés ( $\leq 132$  AU) pourrait être insuffisante pour permettre l'établissement d'interactions intramoléculaires entre les chaînes de pNIPAM greffées (statistiquement plus éloignées les unes des autres car moins nombreuses) et par conséquent pour entraîner la flexion locale puis globale de la chaîne d'EPS. De plus, même si les solutions ont toutes été réalisées à 5  $\mu\text{g/mL}$ , le taux d'EPS est inversement proportionnel à la densité de greffage (Figure 42). Pour les polymères moins greffés, les interactions inter-chaînes sont ainsi favorisées vis-à-vis des interactions intramoléculaires par un taux d'EPS plus important. En effet, les chaînes de polysaccharides greffées étaient clairement ramifiées sous la LCST, formant déjà un réseau connecté dans des solutions hautement diluées en comparaison de l'EPS (Figure 50.A et Figure 51.A).

Pour les échantillons d'EPS-p20 au-dessus de la LCST, quelques assemblages nanométriques ont été observés sur les chaînes polysaccharidiques (indiqués par les flèches bleues sur la Figure 52), correspondant très probablement à des structures micellaires formées par les chaînes de pNIPAM greffées en accord avec les modèles reportés dans la littérature (Guo et al., 2015; Mortisen et al., 2010; Petit et al., 2007). Le pNIPAM libre s'associant également sous forme de nanoparticules avec la température (Figure 50.A), il est également possible d'envisager qu'au-dessus de la LCST, le pNIPAM libre s'associe aux micelles formées par le pNIPAM greffé (indiquées par les flèches rouges sur la Figure 52, EPS-p20-1%).

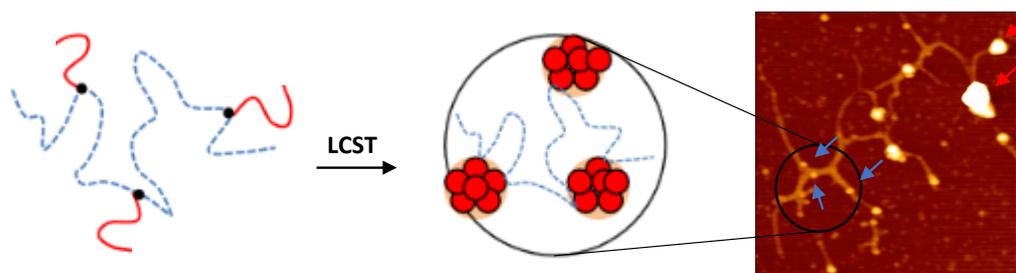


Figure 52. Représentation schématique issue de Guo et al. (2015) des assemblages micellaires de pNIPAM greffés indiqués par des flèches bleues dans l'échantillon d'EPS-p20-1%. Les flèches rouges indiquent la présence supposée de nanoparticules de pNIPAM libre associées aux micelles de pNIPAM greffés sur la chaîne de polysaccharide.

### 3.4. Formation d'un réseau connecté de chaînes d'EPS-pNIPAM par des simulations de Monte Carlo.

Le comportement thermosensible des chaînes d'infernane greffées ayant été montré, l'étape suivante consistait à déterminer si ces chaînes pouvaient former un réseau infini au-dessus de la LCST. Dans ce but, des simulations de Monte Carlo ont été menées afin d'étudier la capacité des chaînes d'infernane greffées à former un réseau infini subissant une transition sol-gel près de la percolation, c'est-à-dire lorsqu'au moins un *cluster* forme un chemin continu par des chaînes connectées d'un côté à l'autre du réseau (protocole en II.2.5). Dans ces simulations réalisées à 37 °C sur un réseau carré bidimensionnel de taille L, seules les interactions attractives à courte portée entre les chaînes de pNIPAM greffées appartenant à des chaînes polysaccharidiques voisines ont été considérées (autrement dit les interactions inter-chaînes). Contrairement à d'autres simulations de Monte Carlo ou aux simulations de DM précédentes (II.3.1), où l'échelle d'analyse était atomique (Cornette et al., 2003; Tzounis et al., 2017), moléculaire ou au niveau de la chaîne unique de polymère, la brique élémentaire de ces simulations était la chaîne individuelle d'EPS-p20 (en particulier l'EPS-p20-6%).

Trois résultats de la même simulation sont représentés sur la Figure 53.A pour différentes probabilités d'occupation  $\phi$  de 0,03, 0,06 et 0,08, cette dernière correspondant au seuil de percolation. La simulation effectuée sur un réseau carré de 2  $\mu\text{m}$  de taille montre clairement la construction du réseau d'EPS-pNIPAM avec la formation de clusters isolés où les chaînes polysaccharidiques voisines sont connectées. Toutes les chaînes appartenant au même cluster ont été mises en évidence avec la même couleur et les couleurs sont liées à la taille du cluster (c'est-à-dire le nombre de chaînes formant le cluster ou le nombre de pixels correspondant). Au fur et à mesure que la taille des amas augmente avec le nombre de chaînes déposées ou  $\phi$ , les amas voisins fusionnent jusqu'à la percolation, où un chemin continu de chaînes connectées existe, traversant le réseau d'un côté à l'autre. Fait intéressant, les simulations de Monte Carlo ont correctement décrit les associations inter-chaînes observées par AFM, en considérant des concentrations de polymères similaires (nombre de chaînes déposées comparables sur une surface de 4  $\mu\text{m}^2$ ) (Figure 51.A). Ces simulations ont révélé qu'un réseau percolé de chaînes d'EPS-pNIPAM pouvait être obtenu en ne considérant que les interactions attractives entre les chaînes de pNIPAM greffées appartenant à des chaînes d'EPS voisines.

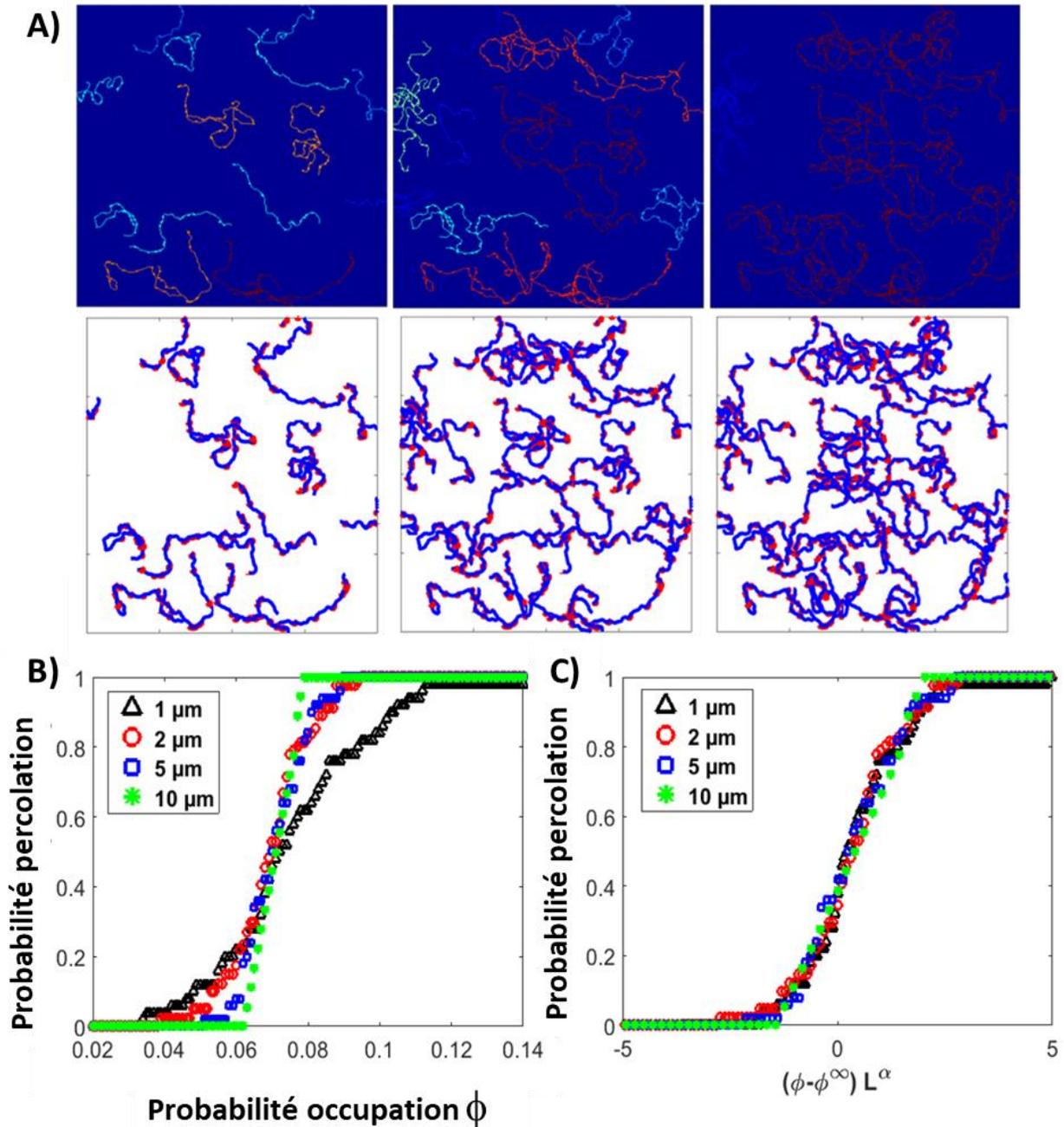
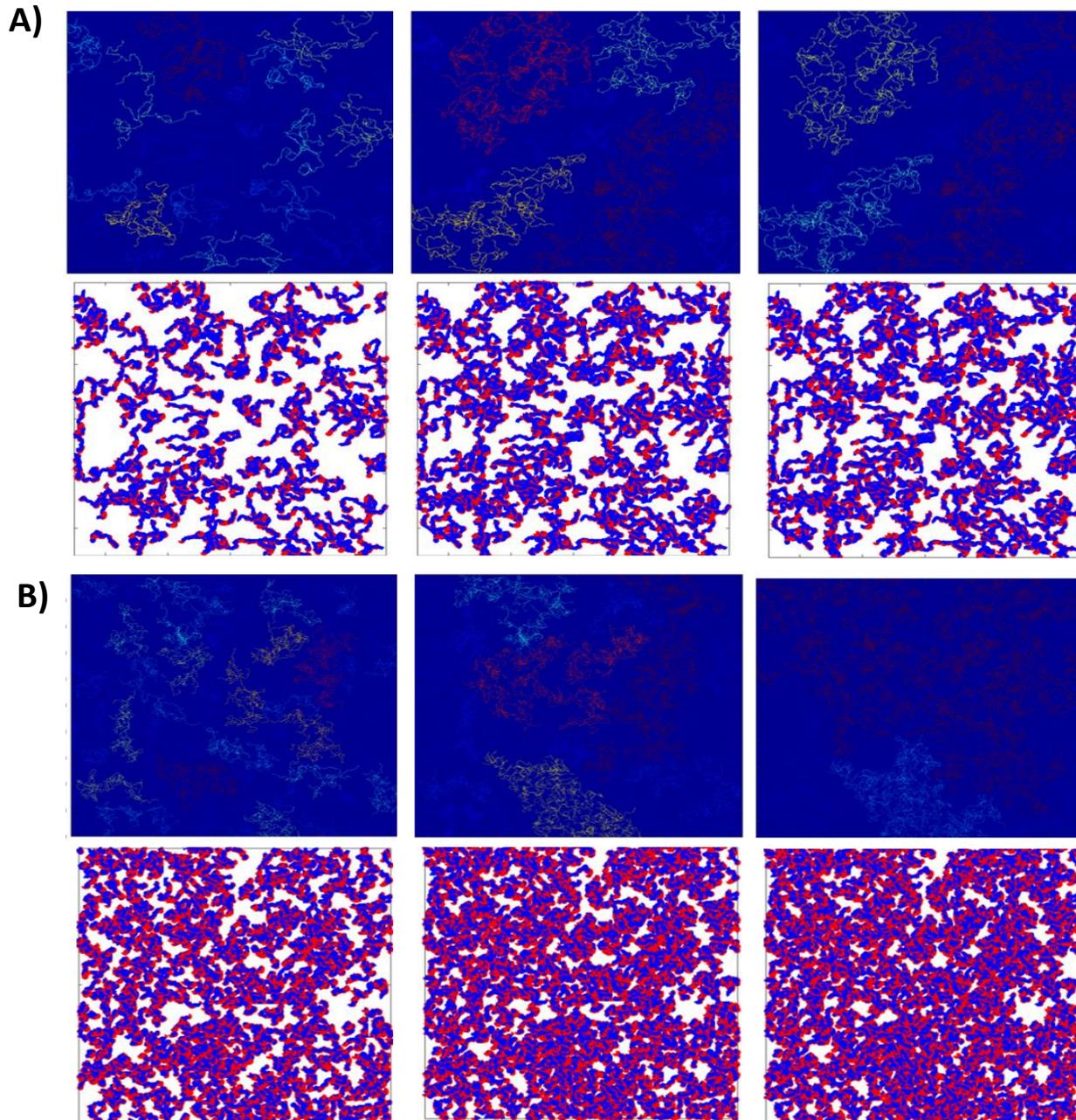


Figure 53. A) Résultats de la simulation de Monte Carlo sur un réseau carré de  $2 \mu\text{m}$  montrant la formation progressive de clusters à partir de chaînes d'EPS-pNIPAM connectées pour différentes probabilités d'occupation de 3,1 %, 6,2 % et 8 %. Les mêmes simulations montrant des chaînes d'EPS en bleu et de pNIPAM repliées en rouge ont été présentées en dessous (pour une meilleure visualisation, la largeur de ligne a été multipliée par cinq). B) Courbes de probabilité de percolation en fonction de la probabilité d'occupation pour différentes tailles du réseau carré. C) Courbe maîtresse de la probabilité de percolation en fonction de la probabilité d'occupation normalisée.

D'autres simulations de Monte Carlo ont ensuite été effectuées en faisant varier la taille du réseau carré, conduisant au même résultat qualitatif (Figure 54).



**Figure 54.** Résultats de la simulation de Monte Carlo montrant la formation progressive de clusters à partir de chaînes d'EPS-pNIPAM connectées, A) sur un réseau carré de  $5\ \mu\text{m}$  pour différentes probabilités d'occupation de 5,0 %, 7,5 % et 7,6 % (de gauche à droite), et B) sur un réseau carré de  $10\ \mu\text{m}$  pour différentes probabilités d'occupation de 3,8 %, 5,6 % et 8,3 % (de gauche à droite). Les mêmes simulations montrant les chaînes d'EPS en bleu et de pNIPAM repliées en rouge ont été présentées en dessous (pour une meilleure visualisation, la largeur de la ligne a été multipliée par cinq par rapport à la représentation du-dessus).

La transposition de ces simulations de Monte Carlo aux expériences futures n'est pas simple car les simulations ont été réalisées pour des tailles finies du réseau alors que les expériences correspondent à un réseau infini. Cependant, l'extrapolation du seuil de percolation vers un système infiniment grand ( $\phi^\infty$ ) peut être effectuée par une analyse d'échelle de taille finie (Wu et al., 2007). En effet, les courbes de probabilité de percolation en fonction de  $\phi$ , calculées à partir de simulations pour des réseaux de différentes tailles, se croisent en un seul point correspondant à  $\phi^\infty$ . La Figure 53.B montre ces courbes obtenues à partir de simulations sur des réseaux de tailles croissantes : 1  $\mu\text{m}$ , 2  $\mu\text{m}$ , 5  $\mu\text{m}$  et 10  $\mu\text{m}$ . L'augmentation de la taille du réseau rend les courbes de probabilité de percolation plus raides, qui tendent vers le cas limite de la fonction de Heaviside centrée sur  $\phi^\infty$  pour un système infini. À partir de ces simulations, le seuil de percolation pour un réseau infiniment grand de chaînes d'EPS-pNIPAM connectées peut être estimé à 0,068.

Pour supprimer l'effet de la taille finie des simulations, la probabilité d'occupation a été normalisée par  $(\phi - \phi^\infty)L^\alpha$  où  $\alpha$  est l'exposant critique de la transition de phase se produisant dans le système étudié. La Figure 53.C représentant la probabilité de percolation en fonction de cette variable réduite, a révélé que toutes les courbes de la Figure 53.B se sont alignées sur une seule courbe maîtresse. Ce résultat, avec de nombreux points inclus dans la courbe d'alignement, souligne que les valeurs de  $\phi^\infty$  et  $\alpha$  ont été déterminées avec précision. En d'autres termes, le seuil de percolation et l'exposant critique des réseaux d'EPS-pNIPAM étaient identiques pour différentes tailles de réseau, révélant le caractère universel de la transition sol-gel près de la percolation. En effet, les valeurs d' $\alpha$  étaient très proches avec 0,75, 0,77, 0,73 et 0,72 pour les quatre tailles de réseau simulées. Une telle analyse d'échelle de taille finie a déjà été menée pour étudier la percolation de particules ou de segments linéaires sur des réseaux bidimensionnels (Cornette et al., 2003; Wu et al., 2007). La percolation de ces systèmes appartenait également à la même classe d'universalité que celle des modèles de percolation aléatoire.

Ainsi, nos simulations de Monte Carlo ont révélé que les interactions inter-chaînes médiées par les chaînes de pNIPAM greffées sont suffisamment fortes pour former un réseau infini de chaînes de polysaccharide, une caractéristique cruciale pour l'établissement d'un hydrogel.

## 4. Conclusion

Ce chapitre visait à octroyer à l'infernane, un EPS bactérien marin présentant des propriétés biologiques mimétiques des GAG, des propriétés thermosensibles pour des applications en ingénierie tissulaire. Les objectifs étaient donc (1) de greffer un polymère thermosensible, le pNIPAM, à l'infernane, (2) d'évaluer les caractéristiques physico-chimiques des EPS greffés, les EPS-pNIPAM, à savoir le degré de greffage, la masse molaire moyenne, la conformation et la morphologie des chaînes polysaccharidiques greffées et (3) de déterminer les propriétés thermosensibles des EPS-pNIPAM. L'influence de la longueur des chaînes de pNIPAM sur ces propriétés a également été évaluée par l'utilisation de pNIPAM-NH<sub>2</sub> de deux masses molaires distinctes (Mn 5 500 g/mol et 20 000 g/mol).

Le greffage des acides uroniques de l'EPS natif à l'extrémité amine du pNIPAM-NH<sub>2</sub> a ainsi été réalisé avec succès par la chimie des carbodiimides utilisant EDC/NHS. En faisant varier le rapport molaire EPS/pNIPAM ainsi que la masse molaire du pNIPAM, huit produits finaux ont été obtenus. Pour décrire leur composition ainsi que leurs caractéristiques physico-chimiques, différentes techniques d'analyses conventionnelles telles que la FI-AF4-MALS-dRI, les dosages spectroscopiques, l'ATR-FTIR et la RMN ont été employées. Les EPS greffés se distinguent ainsi par leur densité de greffage des acides uroniques (de 0,2 à 16 %), par la masse molaire du pNIPAM greffé ainsi que par la proportion d'EPS au sein des polymères greffés EPS-pNIPAM (de 31 à 93 %) (FI-AF4-MALS-dRI). Bien que l'ensemble des acides uroniques de l'EPS soit disponible pour le greffage (simulations de DM), la réaction de greffage reste partielle avec moins de 10 % du pNIPAM initial greffés (FI-AF4-MALS-dRI). Les chaînes de pNIPAM greffées sont néanmoins réparties sur les 3 AU de l'EPS (RMN). La masse molaire de pNIPAM (de 5 500 à 20 000 g/mol) ne semble pas avoir d'impact sur le rendement réactionnel. La caractérisation de la densité de greffage a été une tâche complexe car la distinction entre le pNIPAM greffé et le pNIPAM libre est délicate dans le cas d'un greffage établi par la formation d'un pont amide, déjà présent au sein du pNIPAM (ATR-FTIR, dosages spectroscopiques, RMN). Cette distinction, habituellement négligée dans la littérature, a été levée grâce à la technique séparative FI-AF4-MALS-dRI, exploitant la différence notable des coefficients de diffusion des polymères greffés et du pNIPAM libre (liés à leur masse molaire) et confirmée par la RMN.

Une approche expérimentale a ensuite été réalisée pour évaluer les propriétés thermosensibles des EPS greffés, notamment l'évolution des conformations et interactions établies en fonction de la température, *via* plusieurs techniques complémentaires (UV-visible, DLS, et imagerie AFM). Une température de transition LCST de l'ordre de 32 °C a été mesurée pour les différents échantillons d'infernane greffés, indépendamment de leur composition et densité de greffage (UV-visible). En dessous de cette température, de gros agrégats résultant d'associations inter-chaînes médiées par les chaînes de pNIPAM greffées ont été mis en évidence par DLS confirmant les conformations denses et les masses molaires moyennes supérieures à 10<sup>9</sup> g/mol obtenues en FI-AF4-MALS-dRI (contrairement au non greffé et à l'EPS très peu greffé EPS-p20-0,2%).

Au-dessus de la LCST, le comportement des chaînes de polysaccharides diffère également de celui de l'association non-covalente EPS/pNIPAM. La taille des polysaccharides greffés a diminué, particulièrement dans le cas des EPS-p5, ce qui a conduit à des structures plus compactes provoquées par des interactions hydrophobes devenues dominantes (DLS). Pour mieux comprendre la conformation moléculaire des chaînes d'infernane greffées et leur capacité à établir des interactions intra et inter-chaînes, une approche théorique basée sur des simulations de DM a été développée. Les simulations de DM à température ambiante ont montré la tendance des chaînes de pNIPAM, lorsqu'elles sont greffées à l'infernane, à interagir les unes avec les autres par des interactions intra-chaînes, entraînant la flexion du squelette polysaccharidique. Un tel repliement de la chaîne d'EPS-pNIPAM a été clairement favorisé au-dessus de la LCST et observé par imagerie AFM, pour une densité de greffage suffisante ( $\geq 16$  %) en solution hautement diluée. A l'inverse, les proportions plus importantes en EPS des chaînes d'EPS-pNIPAM faiblement greffées ( $\leq 8$  %) ont favorisé les associations inter-chaînes, conduisant à un réseau de chaînes polysaccharidiques connectées (imagerie AFM), et dont le compactage au-dessus de la LCST a été observé uniquement pour des concentrations plus élevées (1 mg/mL, DLS).

La possibilité de former un réseau percolé a également été confirmée par des simulations de Monte Carlo, qui ne considéraient que des interactions à courte distance entre les chaînes de pNIPAM greffées appartenant à des chaînes d'EPS voisines. Les interactions inter-chaînes médiées par les chaînes de pNIPAM greffées étaient suffisamment fortes pour

former un réseau infini de chaînes de polysaccharides, une condition nécessaire pour l'établissement d'un hydrogel.

Il ressort donc de cette étude que le pNIPAM peut être greffé avec succès sur l'infernane, conférant ainsi des propriétés thermosensibles à cet EPS. La composition des polymères EPS-pNIPAM obtenus ainsi que leur densité de greffage, ajusté par le rapport molaire EPS:pNIPAM, ont un impact indéniable sur ces propriétés thermosensibles. Dans le prochain chapitre, la capacité de l'infernane-pNIPAM à former des hydrogels sera évaluée avant de mesurer les propriétés mécaniques des hydrogels obtenus et d'étudier leur cytocompatibilité pour les futures applications en ingénierie tissulaire.



## **Chapitre III**

# **Caractérisation & Cytocompatibilité des hydrogels d'EPS-pNIPAM**

---



## 1. Introduction

Au terme du Chapitre II, huit polymères thermosensibles EPS-pNIPAM ont été obtenus avec succès. La composition, la densité de greffage ainsi que les propriétés physico-chimiques et thermosensibles de ces EPS greffés ont été caractérisées à l'aide de différentes techniques complémentaires. Afin d'évaluer leur potentiel pour une utilisation en ingénierie tissulaire en tant que matrice modulant les activités biologiques des cellules, une caractérisation non plus des chaînes à l'échelle moléculaire mais des hydrogels doit être réalisée, idéalement dans des conditions les plus proches des tests biologiques *in vitro/in vivo*.

Dans ce contexte, ce chapitre III porte sur l'étude des hydrogels issus des polymères EPS-pNIPAM. L'objectif est donc (1) de tester la capacité de gélification des EPS-pNIPAM à 37 °C, (2) de mesurer le gonflement ainsi que les propriétés mécaniques des hydrogels dans leur état complètement hydraté, et enfin (3) de déterminer leur cytocompatibilité en présence de cellulesensemencées.

L'ensemble de ces analyses permettra d'apporter une meilleure compréhension de l'influence simultanée de la composition/de la densité de greffage des polymères EPS-pNIPAM sur les propriétés mécaniques des hydrogels et, *in fine*, sur le développement cellulaire. Cette compréhension est indispensable pour une utilisation optimale de ces hydrogels en ingénierie tissulaire.



## 2. Matériels et méthodes

### 2.1. Test de gélification et stabilité des hydrogels d'EPS greffés en condition de test *in vitro*

Afin d'évaluer qualitativement les propriétés de gélification des EPS greffés à température corporelle (37 °C) en condition de test *in vitro* (III.2.6.3), différentes solutions en régime concentré (7 % ou 10 % m/v) ont été préparées dans du tampon PBS (Gibco 1X, pH 7,4). Les EPS-p20, l'EPS-p5-16% et l'EPS-p5-8% ont été solubilisés à une concentration de 10 % m/v tandis que les EPS-p5-3%, EPS-p5-2% et EPS-p5-0% ont été solubilisés à 7 % m/v. Le p5 et p20 ont également été solubilisés à 10 % m/v en comparaison. Après 24 h de solubilisation, les solutions ont rapidement été vortexées puis centrifugées afin d'éliminer d'éventuelles bulles d'air formées. 30 µL de solutions ont alors été déposés dans une plaque 24 puits (Nunclon Delta) puis incubés 1 h à 37 °C (5 % CO<sub>2</sub>, humidité contrôlée). Après gélification, la plaque 24 puits a été positionnée sur une plaque thermostatée à 37 °C (Scienceware CultureTemp™). Les hydrogels ont alors été recouverts par 1 mL de milieu de Eagle modifié par Dulbecco (DMEM 1X (+) 4,5 g/L D-glucose/L-glutamine (+) 110 mg/L sodium pyruvate (Gibco), supplémenté en sérum foetal de veau (VWR) (10 % v/v), pénicilline/streptomycine (Gibco) (1 % v/v) et GlutaMAX 100X (Gibco) (1 % v/v), préalablement chauffé à 39 °C. La plaque 24 puits a de nouveau été déposée en incubateur à 37 °C (5 % CO<sub>2</sub> humidité contrôlée). La stabilité des hydrogels dans ces conditions a été évaluée sur une durée de 7 jours. Des photographies ont été prises au premier jour (J0), au troisième jour (J3), ainsi qu'au septième jour (J7) d'observation.

### 2.2. Estimation de la cinétique de transition sol/gel des EPS greffés

La cinétique de transition sol/gel des EPS greffés en régime concentré (7 ou 10 % m/v) à température physiologique (37 °C) a été évaluée qualitativement par des mesures spectroscopiques. Pour cela, les polymères EPS greffés ont été solubilisés dans du tampon PBS (Gibco 1X, pH 7,4) à 10 % m/v (p5, p20, EPS-p20, EPS-p5-16% et EPS-p5-8%) ou 7 % m/v (EPS-p5-3%, EPS-p5-2%) puis stockées à température ambiante. Après 24 h, le lecteur de microplaques Varioskan Lux (Thermo Scientific) a été préalablement thermostaté à 37 °C pendant 10 minutes. Afin de recouvrir, la surface du puits, 100 µL de chaque solution (préalablement vortexée et centrifugée) ont été déposés dans une microplaque 96 puits. Des

mesures d'absorbance à 550 nm (comme pour II.2.4.1) ont été effectuées toutes les 10 secondes pour une durée de 10 minutes.

### 2.3. Mesure du gonflement des hydrogels d'EPS greffés en condition de test *in vitro*

Le taux de gonflement des hydrogels d'EPS-greffés en milieu DMEM a été mesuré en inserts (Greiner Bio-one, ThinCert™ 24 puits, 0,4 µm, polytétraphtalate d'éthylène). Les solutions d'EPS greffés ont été préparées dans du tampon PBS (Gibco 1X, pH 7,4) à 10 % m/v (EPS-p20, EPS-p5-16% et EPS-p5-8%) ou 7 % m/v (EPS-p5-3%, EPS-p5-2%) puis stockées à température ambiante. Après 24 h, chaque insert a été préalablement taré (masse<sub>insert</sub>) puis 100 µL de chaque solution (préalablement vortexée et centrifugée) ont été déposés. Chaque insert contenant les solutions a de nouveau été pesé (masse<sub>insert + hydrogel</sub>) puis déposé en plaque 24 puits (Greiner Bio-one). La masse de solution déposée (masse<sub>hydrogel initial</sub>) est ensuite obtenue par la différence de ces deux masses. En incubateur, les solutions ont été gélifiées 1 h à 37 °C (5 % CO<sub>2</sub>, humidité contrôlée). Sur plaque chauffante (Scienceware CultureTemp™) à 37 °C et pour chaque insert, 1 mL de DMEM thermostaté à 39 °C a été déposé sous l'insert, dans le puits, puis 200 µL par-dessus les hydrogels (t = 0 h).

La mesure du gonflement des hydrogels a été réalisée en triplicat. La mesure consistait à prélever le milieu DMEM (sous et sur l'insert), nommé « surnageant » pour t = 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 21 ou 22 h, 30 ou 31 h, 47 ou 48 h et 54 ou 55 h après le premier dépôt (t = 0 h). Après chaque prélèvement, un nouvel ajout de DMEM a été réalisé. Pour obtenir la masse du surnageant de l'hydrogel au temps t (masse<sub>surnageant hydrogel</sub>), chaque surnageant récupéré a été pesé dans un Eppendorf préalablement taré. La masse de surnageant absorbé (masse<sub>surnageant absorbé</sub>) est ensuite obtenue par la différence de la masse de surnageant initialement déposé et de la masse<sub>surnageant hydrogel</sub> prélevée au temps t.

Le taux de gonflement à un instant t des hydrogels d'EPS-greffés est ainsi défini par le ratio de la masse d'hydrogel après gonflement (masse<sub>surnageant absorbé</sub> + masse<sub>hydrogel initial</sub>) et de la masse initiale d'hydrogel (équation 4) :

$$\text{Taux de gonflement} = \frac{\text{masse (surnageant absorbé)} + \text{masse (hydrogel initial)}}{\text{masse (hydrogel initial)}} \quad (4)$$

La masse de surnageant absorbé a été incrémentée à chaque prélèvement.

## 2.4. Détermination de la structure des hydrogels d'EPS-pNIPAM par microscopie électronique à balayage (MEB)

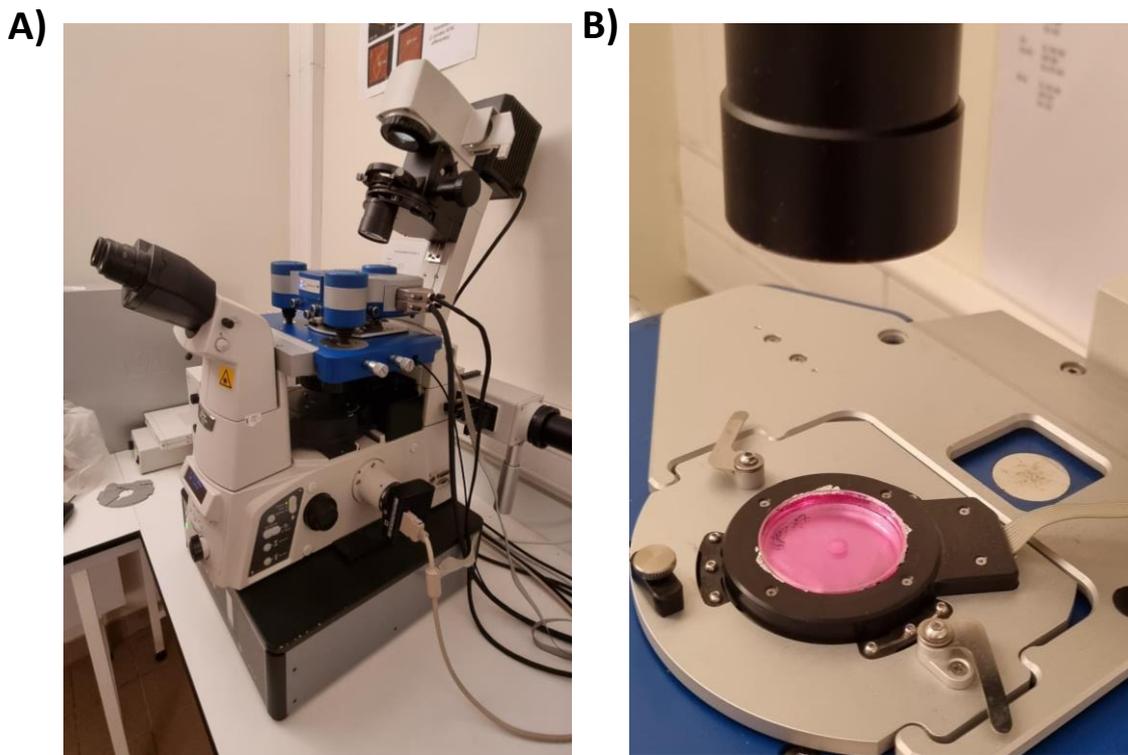
La structure des hydrogels d'EPS-pNIPAM a été observée par MEB. Les solutions d'EPS greffés ont été préparées dans du tampon PBS (Gibco 1X, pH 7,4) à 10 % m/v (EPS-p20, EPS-p5-16% et EPS-p5-8%) ou 7 % m/v (EPS-p5-3% et EPS-p5-2%). Après 24 h, 200  $\mu$ L de solutions (préalablement vortexées et centrifugées) ont été déposés en cryotube puis gélifiés en bain marie à 37 °C. Après 10 min, les cryotubes ont été déposés dans un contenant approprié et immédiatement recouverts par de l'azote liquide. Après congélation rapide, les cryotubes ont été lyophilisés. Les observations des hydrogels lyophilisés ont été effectuées par Nicolas Stephant (IMN, Nantes) en utilisant le microscope JEOL 7600F (JEOL, États-Unis).

## 2.5. Mesure des propriétés mécaniques des hydrogels d'EPS greffés par AFM en condition de test *in vitro*

Les propriétés mécaniques des hydrogels d'EPS-greffés ont été mesurées par AFM. Les solutions d'EPS greffés ont été préparées dans du tampon PBS (Gibco 1X, pH 7,4) à 10 % m/v (EPS-p20-3%, EPS-p20-1%, EPS-p20-0,2%, EPS-p5-16% et EPS-p5-8%) ou 7 % m/v (EPS-p5-3%) puis stockées à température ambiante pendant 24 h. 30  $\mu$ L de solutions (préalablement vortexées et centrifugées) ont été déposés puis gélifiés sur boîte de Pétri maintenue à 37 °C pendant 30 minutes (Scienceware CultureTemp™). Les hydrogels ont ensuite été immergés dans du DMEM (à 39 °C) pendant 30 minutes à 37 °C avant d'effectuer les expériences à l'aide d'un AFM Nanowizard® (JPK, Allemagne) (Figure 55). Ce microscope AFM est équipé d'une platine chauffante permettant de contrôler la température du milieu liquide au sein de la boîte de Pétri avec une précision de 0,1 °C. Toutes les mesures mécaniques des hydrogels ont ainsi été réalisées dans le milieu DMEM à 37 °C. Des expériences préliminaires n'ont pas montré de réelles différences dans les réponses des hydrogels au cours du temps sur un suivi de 4 heures après leur préparation. Par conséquent, toutes les mesures AFM ont été effectuées entre 30 min et 2 heures après la préparation des hydrogels. Les mesures AFM ont été réalisées sur plusieurs localisations pour un même hydrogel et sur deux hydrogels provenant de deux synthèses différentes pour chaque condition. Des leviers ayant une sphère en verre de 5  $\mu$ m de diamètre (SQube) ont été utilisés pour ces expériences. La raideur normale de ces leviers a

systématiquement été calibrée par la méthode du bruit thermique (implémentée dans le logiciel JPK) avant les mesures, et était comprise entre 0,1 et 0,2 N/m.

Deux expériences différentes ont été effectuées par AFM, soit en mesurant des courbes de forces conventionnelles, soit en modifiant ces courbes par l'ajout d'une phase de maintien de la pointe dans l'hydrogel. Les courbes de force ont été enregistrées avec une vitesse constante de 1  $\mu\text{m/s}$ . Ces forces ont ensuite été converties en courbes force-indentation, et la partie approche a été ajustée par le modèle de Hertz pour déterminer le module élastique des hydrogels. Pour les mesures micro-rhéologiques, des courbes de force modifiées ont été réalisées en ajoutant une phase de maintien de 5 s entre les parties approche et de retrait (enregistrées à haute vitesse, 20  $\mu\text{m/s}$ ). Avant chaque expérience de relaxation, plusieurs courbes de force ont été réalisées sur les différents hydrogels afin de déterminer avec précision la force à appliquer correspondant à la profondeur d'indentation choisie.



**Figure 55.** A) Photographie d'un microscope inversé surmonté d'un système AFM Nanowizard® (JPK, Allemagne). B) Photographie d'un hydrogel d'EPS-p5-8% préparé pour la mesure par AFM (30  $\mu\text{L}$ , 10 % m/v PBS, gélifié 30 min à 37 °C et recouvert par du milieu DMEM).

## 2.6. Evaluation de la cytotocompatibilité des hydrogels d'EPS-greffés

### 2.6.1. Tests de désinfection/stérilisation des hydrogels d'EPS greffés

Afin de pouvoir évaluer la cytotocompatibilité *in vitro* des hydrogels d'EPS-pNIPAM, différentes stratégies de désinfection ou stérilisation des EPS greffés, accessibles au laboratoire, ont été appliquées. Des tests préliminaires sur l'EPS natif à la concentration maximale en EPS au sein de l'hydrogel d'EPS-p5-2% (~ 2 % m/v d'EPS), ont été réalisés.

#### 2.6.1.1. Méthode de désinfection/stérilisation

##### Température

L'EPS natif (20 mg) a été solubilisé à 2 % m/v (eau stérile) en Eppendorf (bain marie) ou cryotube (autoclave) de polypropylène. Après 24 h, différentes conditions de température et temps de chauffage ont été appliquées. Les solutions ont été chauffées à 70 °C (60 min), 80 °C (15 min, 30 min et 60 min) ou à 90 °C (15 min, 30 min, 60 min) en bain marie, et à 105 °C (18 min) ou 121 °C (5 et 15 min) en autoclave. Les solutions ont été immédiatement refroidies en bain d'eau glacée.

##### UV-C

La désinfection par les UV-C a été réalisée sur des solutions d'EPS natif sous poste de sécurité microbiologique (PSM) (Figure 56). Les solutions d'EPS natif (20 mg) ont été préparées à 2 % m/v (eau stérile) en Eppendorf de polypropylène. Les distances  $D$  (en hauteur) entre les échantillons et la lampe UV (Analytik Jena UVP Handheld UVGL-55, 6 W) étaient de 5 ou 14 cm. La durée de désinfection sous UV-C (254 nm) était de 15 min (uniquement pour la condition 14 cm), 30 min ou 60 min. Pour une durée de 60 min, les Eppendorfs contenant les solutions ont été retournés à la moitié du temps de désinfection.

La puissance du flux de rayonnement reçu par unité de surface (irradiance) est donnée par l'équation 5 :

$$Irradiance \left( \frac{W}{m^2} \right) = \frac{Puissance (W)}{Surface (m^2)} \quad (5)$$

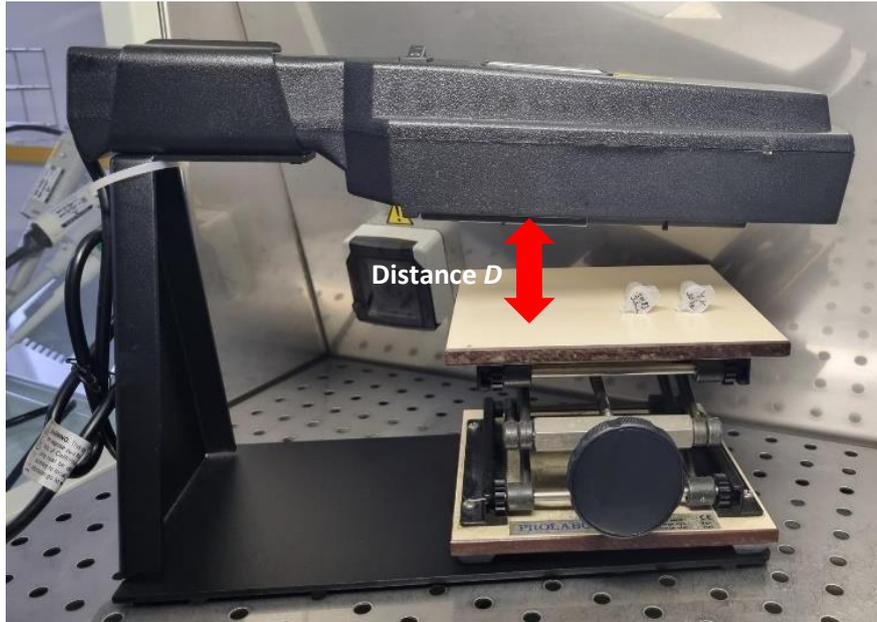


Figure 56. Photographie du montage de désinfection par UV-C des solutions d'EPS à une distance  $D$  de la lampe. Ici  $D = 5$  cm.

L'irradiance à la sortie de la lampe était donc de  $1852 \text{ W/m}^2$ . Selon la loi physique des carrés inverses, l'énergie reçue à une distance  $D$  de l'origine sera inversement proportionnelle à cette distance au carré. Ainsi, en approximant l'origine du rayonnement à  $1 \text{ cm}$  de la sortie de la lampe, l'irradiance était de  $74 \text{ W/m}^2$  (25 fois moindre) et de  $9,5 \text{ W/m}^2$  (196 fois moindre) pour les échantillons situés à  $D = 5$  et  $14 \text{ cm}$  respectivement.

La dose d'UV (exposition énergétique) reçue est donnée par l'équation 6 :

$$\text{Dose} \left( \frac{\text{J}}{\text{m}^2} \right) = \text{Irradiance} \left( \frac{\text{W}}{\text{m}^2} \right) \times \text{temps} (s) \quad (6)$$

Ainsi les doses d'UV appliquées ont été les suivantes :

À  $D = 5 \text{ cm}$  de la lampe :  $74 \times \text{temps} (s)$

- 30 min : Dose =  $133\,200 \text{ J/m}^2$
- 60 min : Dose =  $266\,400 \text{ J/m}^2$

À  $D = 14 \text{ cm}$  de la lampe :  $9,5 \times \text{temps} (s)$

- 15 min : Dose =  $8\,550 \text{ J/m}^2$
- 30 min : Dose =  $17\,100 \text{ J/m}^2$
- 60 min : Dose =  $34\,200 \text{ J/m}^2$

### Filtration à 0,22 $\mu\text{m}$

L'EPS natif (65 mg) a été solubilisé à 0,1 % m/v dans de l'eau. La solution a alors été filtrée sous vide de manière séquentielle sur une membrane de pore 0,7  $\mu\text{m}$  (microfibre de verre) puis 0,45  $\mu\text{m}$  (nitrate de cellulose) et enfin de manière stérile à 0,22  $\mu\text{m}$  (acétate de cellulose). Le filtrat final a été transféré en flacon stérile puis lyophilisé. Sous PSM, le produit obtenu a été solubilisé à 2 % m/v dans de l'eau stérile.

#### 2.6.1.1. Evaluation de la biocharge après désinfection/stérilisation

L'efficacité de la désinfection/stérilisation a été déterminée par l'évaluation de la biocharge après étalement sur boîte sous PSM. Pour la flore totale (flore marine et non marine), le milieu PCA (ang. plate count agar) composé de tryptone (5 g/L), d'extrait de levure (2 g/L), de glucose (1 g/L) et d'agar (12 g/L) a été utilisé (Biokar Diagnostics, Beauvais France). Pour la flore marine, le milieu Zobell (milieu 2216E) composé de sels pour aquarium (33 g/L), d'extrait de levure (1 g/L), de tryptone (1 g/L) et d'agar (15 g/L) (Organotechnie, France) a été employé. Après solidification des boîtes de gélose, 70  $\mu\text{L}$  de solutions traitées selon les méthodes décrites ci-dessus ont été déposés (en doublon) puis incubés en aérobiose 48 h à 30 °C. Des photographies des boîtes ont alors été prises.

#### 2.6.1.2. Impact de la désinfection/stérilisation de l'EPS natif par HPSEC-MALS-dRI

L'impact sur la chaîne d'EPS, des conditions de désinfection/stérilisation pour lesquelles aucune colonie n'a été observée, a été évalué en termes de masse molaire moyenne en poids (Mw) et de rayon de giration (Rg). Ces paramètres ont été déterminés par HPSEC, une méthode d'analyse qui repose sur l'élution différentielle selon le volume hydrodynamique des macromolécules au sein d'une colonne remplie d'un gel poreux, couplée à des détecteurs concentration-dépendant, UV (Shimadzu, 280 nm) et réfractomètre différentiel, dRI (OPTilab, Wyatt Technology). Associée à un détecteur MALS (Dawn Heleos-II, Wyatt technology, 663,8 nm), les caractéristiques polymériques peuvent être décrites de façon absolue. Le système HPSEC comprend une colonne de garde (PL aquagel-OH-Mixte 8  $\mu\text{m}$  Agilent de dimension 7,5 mm x L50 mm) et une colonne de séparation (7,5 mm x L300 mm) dont le domaine de fractionnement est compris entre  $10^3$ - $10^7$  g/mol. Les solutions d'EPS traitées puis diluées (0,2 % m/v) ont été filtrées à 0,45  $\mu\text{m}$  (polyfluorure de vinylidène, PVDF). Le débit d'élution du

tampon (0,1 M d'acétate d'ammonium contenant 0,03 % d'azoture de sodium) filtré à 0,1  $\mu\text{m}$  (PVDF) a été fixé à 1 mL/min. Les résultats ont été analysés par le logiciel Astra 6.1. La méthode de Zimm a été employée pour traiter les courbes obtenues. Les masses molaires moyennes ont été calculées à partir de l'incrément d'indice de réfraction spécifique aux polysaccharides ( $dn/dc$ ) de 0,145 mL/g.

#### 2.6.1.3. Sélection de la condition de désinfection/stérilisation des EPS greffés pour les mesures *in vitro*

Les conditions de désinfection/stérilisation non destructrices de l'EPS natif sélectionnées au terme de l'HPSEC-MALS-dRI, ont été appliquées à l'EPS-p5-8%. Après confirmation de l'efficacité des conditions à 7 jours (étalement sur boîte, III.2.6.1.1) et de leur impact sur la gélification de l'EPS-p5-8% (test de gélification, III.2.1), une condition de désinfection a été choisie (i.e. 80°C-30 min) et appliquée à l'ensemble des EPS greffés pour la suite des mesures *in vitro*.

#### 2.6.2. Culture cellulaire adhérente : HEK293

Les tests de viabilité cellulaire *in vitro* ont été réalisés sur des lignées issues de la transformation de cellules de rein embryonnaire humain (ang. human embryonic kidney, HEK293, en particulier HEK293 FT, abrégé en HEK293). La culture cellulaire adhérente a été réalisée en flacon en présence de milieu DMEM (DMEM 1X (+) 4,5 g/L glucose/glutamine (+) 110 mg/L sodium pyruvate (Gibco), supplémenté en sérum fœtal de veau (VWR) (10 % v/v), pénicilline/streptomycine (Gibco) (1 % v/v) et GlutaMAX 100X (Gibco) (1 % v/v)). Arrivées à confluence (surface du flacon et nutriments quasiment épuisés), le passage des cellules est une procédure commune dans laquelle les cellules d'une culture donnée sont réparties dans un nouveau flacon contenant du milieu frais. Sous hotte à flux laminaire, le milieu de culture a été aspiré puis la surface du flacon a été lavée avec 7 mL de PBS (Gibco 1X, pH 7,4) préalablement thermostatés (37 °C). Les cellules ont alors été décollées par l'ajout de 2,5 mL de trypsine-EDTA (Gibco 1X) préalablement thermostaté (37 °C). L'ajout de la trypsine, enzyme protéolytique, permet de catalyser les réactions d'hydrolyse des liaisons matrice-cellules et cellules-cellules et par conséquent de décrocher les cellules adhérentes de la surface du flacon et de dissocier les cellules entre elles. La présence d'EDTA, agent chélateur, permet également la dissociation des jonctions adhérentes fortes, calcium-dépendantes, permises par les cadhérines. Cette action étant favorisée par la chaleur, le flacon a été incubé à 37 °C (5 %

CO<sub>2</sub>, humidité contrôlée) pendant 4 min après l'ajout de trypsine-EDTA. Au terme de cette étape, les cellules ont été suspendues après ajout de 7,5 mL de milieu DMEM à 37 °C. Un nouveau flacon contenant 12 mL de milieu DMEM « frais » a été ensemencé par 1 mL de la culture précédente. La nouvelle culture issue d'un passage au 1/10 a été incubée jusqu'au passage suivant.

### 2.6.3. Ensemencement cellulaire et mesure de la viabilité

#### 2.6.3.1. Ensemencement de cellules HEK293 dans un hydrogel de Cultrex et mise en place d'un test de viabilité *in vitro*

Cette étude visait à mettre en place l'ensemencement de cellules d'HEK293 dans un hydrogel témoin et l'évaluation de leur viabilité par le test AlamarBlue. Pour ce faire un hydrogel de référence utilisé pour la culture *in vitro* a été utilisé. Le Cultrex™ reduced growth factor basement membrane extract (Bio-Techne, Cultrex RGF BME, type R1) est une forme soluble de membrane basale issue du sarcome murin d'Engelbreth-Holm-Swarm. Cet extrait fournit un hydrogel de matrice extracellulaire naturelle qui gélifie à 37 °C pour former une membrane basale reconstituée. L'étude a été réalisée à partir de cellules issues de passage cellulaire numéro 10 et 14.

#### *Ensemencement des cellules HEK293*

Arrivées à confluence, un passage des cellules HEK293 a été réalisé (III.2.6.2). Avant l'étape d'ensemencement, la suspension cellulaire post-trypsination a été passée sur tamis 0,40 µm. Le filtrat a été centrifugé à 500 g pendant 5 min. Le surnageant a été aspiré puis le culot cellulaire a été suspendu dans 1 mL de milieu DMEM. Une suspension cellulaire concentrée a ainsi été obtenue. Pour la numération des cellules, 10 µL de trypan ont été ajoutés à 10 µL de suspension cellulaire préalablement diluée au 1/10 (10 µL de suspension cellulaire concentrée + 90 µL PBS (Gibco 1X, pH 7,4)) puis comptés en lame KOVA. Le nombre de cellules au sein de la suspension cellulaire concentrée correspond à (équation 7) :

$$\text{Nombres de cellules (suspension concentrée)} = 2 \times 10 \times N \times 10^4 \quad (7)$$

où N est le nombre de cellules comptées au sein de 9 carreaux centraux.

Différentes dilutions de cette suspension concentrée correspondant aux différentes concentrations cellulaires à tester ont été préparées à partir de la forme soluble du Cultrex (Tableau XIV). 30 µL de chaque solution « Cultrex + cellules » ont été déposés en doublon dans une plaque 24 puits (Nunclon Delta, Thermo Scientific) puis incubés 30 minutes à 37 °C (5 % CO<sub>2</sub>, humidité contrôlée). Après gélification, 500 µL de milieu de culture DMEM ont été ajoutés dans chaque puits (J0).

**Tableau XIV. Concentrations cellulaires testées en HEK293 pour l'ensemencement dans l'hydrogel témoin Cultrex.**

	Condition 1	Condition 2	Condition 3	Condition 4
<b>Cellule/mL</b>	3x10 <sup>6</sup>	1x10 <sup>6</sup>	0,3x10 <sup>6</sup>	0,1x10 <sup>6</sup>
<b>Cellule/µL</b>	3x10 <sup>3</sup>	1x10 <sup>3</sup>	3x10 <sup>2</sup>	1x10 <sup>2</sup>
<b>Volume Cultrex (µL)</b>	30	30	30	30
<b>Nombre de cellules</b>	90x10 <sup>3</sup>	30x10 <sup>3</sup>	9x10 <sup>3</sup>	3x10 <sup>3</sup>

#### *Test de viabilité AlamarBlue*

La mesure de l'activité métabolique cellulaire a été réalisée à 2 jours (J2), 3 jours (J3), 4 jours (J4) et 7 jours (J7) après ensemencement des cellules par un test fluorométrique. La résazurine, composé oxydé de couleur bleue, est réduite par l'activité métabolique des cellules vivantes en résorufine, composé rose fluorescent (Figure 57). Le protocole a été réalisé comme suit : une solution commerciale AlamarBlue® (G-Biosciences) contenant de la résazurine a été diluée dans du milieu DMEM thermostaté à 37 °C (DMEM + AlamarBlue, 20 % v/v). Le surnageant des hydrogels a été prélevé et substitué par 500 µL de DMEM + AlamarBlue. Après 5h d'incubation à 37 °C (5 % CO<sub>2</sub>, humidité contrôlée), 100 µL de solution ont été prélevés en triplicat et déposés en microplaque 96 puits. La fluorescence a été mesurée au Varioskan LUX (ThermoFisher) (excitation : 560 nm ; émission : 590 nm) avec comme référence le milieu DMEM + AlamarBlue. Le surnageant restant a été aspiré et les hydrogels ont été rincés une première fois par 500 µL de PBS (Gibco 1X, pH 7,4) puis par 500 µL de DMEM. Après 1 h, le milieu DMEM de rinçage a été aspiré et remplacé par 500 µL de milieu frais. Après 24 h, l'opération de rinçage a été répétée, afin de retirer toute trace du réactif.

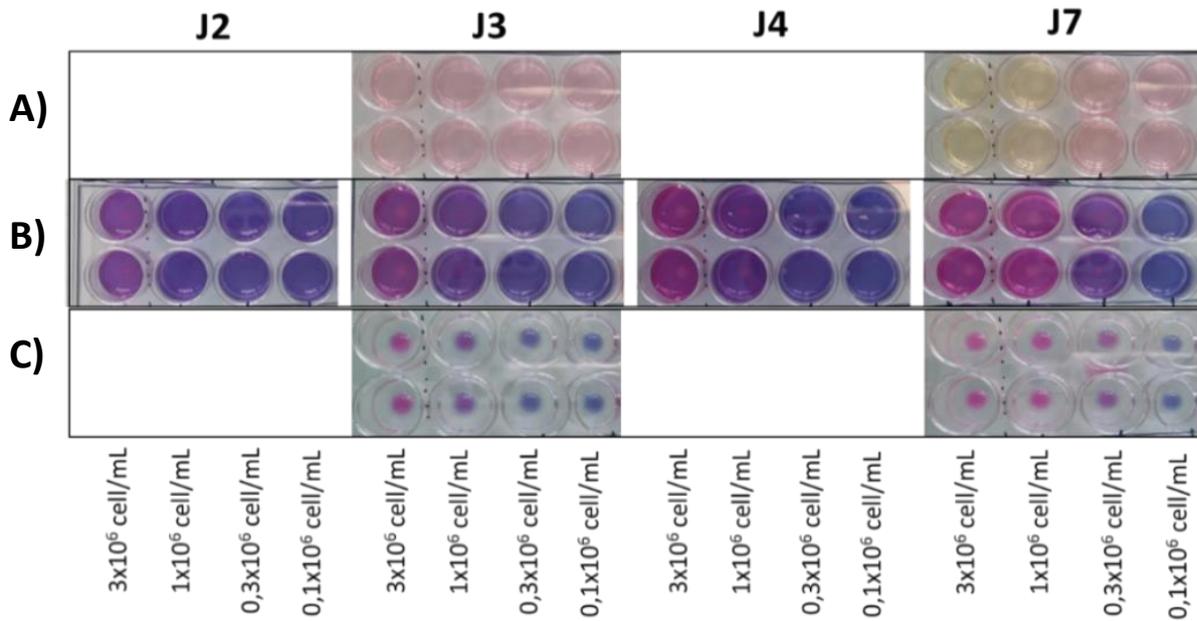


Figure 57. A) Aspect du milieu de culture recouvrant le Cultrex (30 µL) contenant les cellules HEK293 avant test AlamarBlue. B) Test AlamarBlue (20 % v/v DMEM, 5h). C) Aspect du Cultrex contenant les cellules HEK293 après prélèvement du surnageant.

### 2.6.3.2. Ensemencement des cellules HEK293 dans les hydrogels d'EPS-pNIPAM et mesure de la viabilité par AlamarBlue

A partir du protocole réalisé pour l'ensemencement des cellules HEK293 dans le Cultrex (III.2.6.3.1), différentes modifications ont été réalisées sur la base des résultats obtenus en III.3.4.2.1. Le protocole de suivi des cultures a été adapté pour permettre un changement du milieu de culture à 5 jours, lorsque celui-ci s'acidifie du fait de la multiplication cellulaire.

L'étude a été réalisée à partir de cellules HEK293 issues des 5<sup>ème</sup> et 9<sup>ème</sup> passages cellulaires d'une première culture de cellules et d'un 5<sup>ème</sup> passage d'une nouvelle culture issue d'un autre aliquot du même stock.

Les EPS greffés ont été solubilisés en tampon PBS (Gibco, pH 7,4) à 10 % m/v (p5, p20, EPS-p20, EPS-p5-16% et EPS-p5-8%) ou 7 % m/v (EPS-p5-3%, EPS-p5-2%). Les solutions ont été désinfectées pendant 30 min à 80 °C selon le protocole défini en III.2.6.1.1. L'ensemencement des cellules à la concentration sélectionnée en III.3.4.2.1 (i.e. 1 x 10<sup>6</sup> cell/mL), a été réalisé sous hotte à flux laminaire selon le protocole défini en III.2.6.3.1 dans les solutions d'EPS-pNIPAM préalablement vortexées et centrifugées. Après 1 h de gélification à 37 °C (5 % CO<sub>2</sub>, humidité contrôlée) des solutions d' « EPS-pNIPAM + cellules » (30 µL en triplicat sur 2 plaques

différentes), les plaques 24 puits ont été positionnées sur une plaque thermostatée à 37 °C (Scienceware CultureTemp™) à proximité d'un bec benzène électrique maintenant l'asepsie. Afin de réduire au minimum, les potentielles perturbations que pourraient entraîner les changements de milieu (à J3 et J5), les hydrogels d'EPS greffés ont été recouverts par 1 mL de milieu DMEM thermostaté à 39 °C (J0), contre 500 µL pour le Cultrex précédemment.

Les mesures de viabilité par AlamarBlue ont été réalisées 3 jours (J3) et 7 jours (J7) après ensemencement sur 2 plaques d'échantillons en triplicat. La viabilité cellulaire de la première plaque d'échantillons a été évaluée à J3 tandis que celle de la deuxième plaque a été évaluée à J7. Pour cette plaque, le milieu de culture a été partiellement renouvelé (400 µL) à J3 et J5 sans découvrir les hydrogels.

Le protocole a été réalisé comme suit (Figure 58) : une solution commerciale AlamarBlue® (G-Biosciences) a été diluée dans du milieu DMEM, thermostaté à 39 °C (DMEM + AlamarBlue, 20 % v/v). Sur plaque thermostatée, le surnageant des hydrogels a été aspiré. Après solubilisation des hydrogels à température ambiante, les cellules ont été observées au microscope optique (Gx10) puis suspendues par refoulement après ajout de 400 µL de DMEM + AlamarBlue. Après 5 h d'incubation à 37 °C (5 % CO<sub>2</sub>, humidité contrôlée), le contenu des puits a été prélevé et déposé dans des Eppendorfs. Après centrifugation (2700 rpm, 5 min), 100 µL (eux-mêmes en triplicat) de surnageant exempts de cellules ou de fragments d'hydrogels ont été déposés en microplaque 96 puits. La fluorescence a été mesurée au Varioskan LUX (ThermoFisher) (excitation : 560 nm ; émission : 590 nm) (fluorescence du surnageant DMEM + AlamarBlue des hydrogels sans cellule en mesure de référence).

La viabilité des cellules ensemencées dans les hydrogels d'EPS-pNIPAM a été normalisée par rapport celle du témoin positif Cultrex. Les différences significatives de moyennes (n = 9 ; 3 ensemencements en triplicat) à J3 et J7 vis-à-vis du témoin positif ont été évaluées *via* un test t de student (à  $\alpha = 5\%$ ).

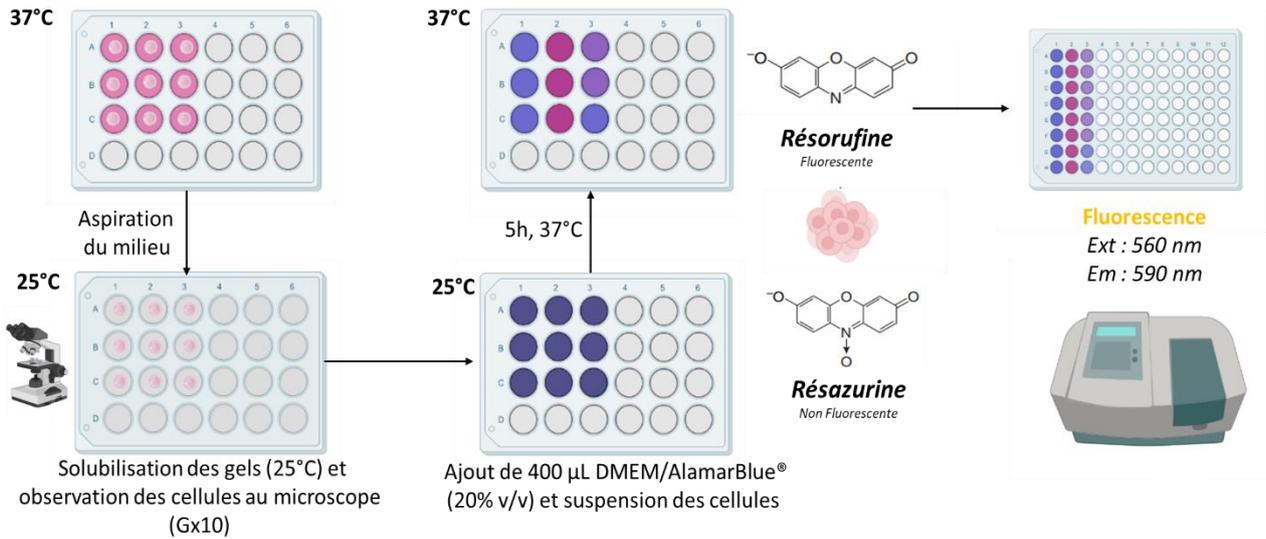


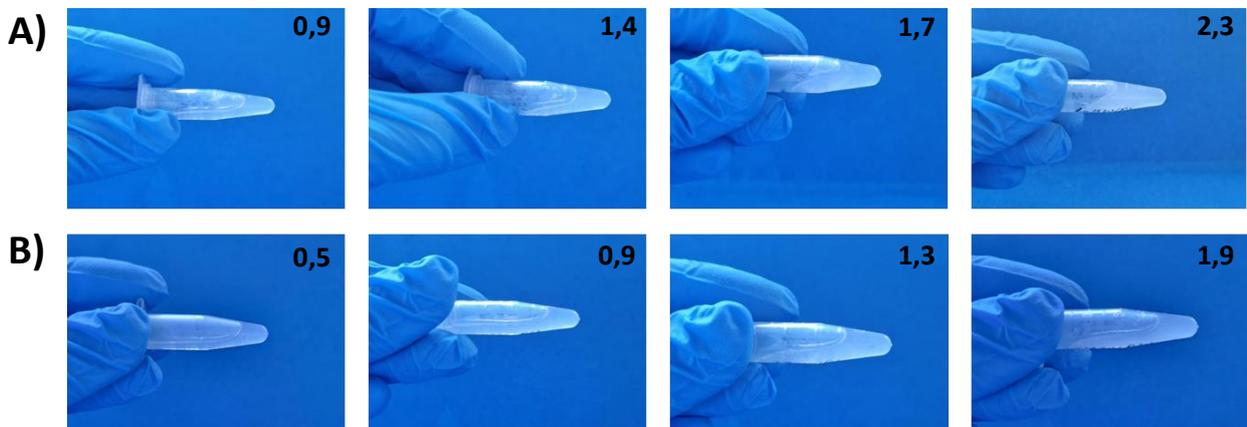
Figure 58. Schéma général du protocole permettant la mesure de la viabilité de cellules HEK293 ensemencées dans les hydrogels d'EPS-pNIPAM par le réactif AlamarBlue®(G-Biosciences) 3 jours (J3) et 7 jours (J7) après leur ensemencement.



### 3. Résultats et discussion

Après avoir montré par des simulations que les EPS greffés ont la capacité d'établir un réseau infini, condition nécessaire pour former des hydrogels au-dessus de leur température de transition, une confirmation expérimentale basée sur des tests de gélification était nécessaire. Les tests de gélification sont couramment réalisés par retournement d'un tube ou d'un vial contenant la solution à tester (Haddow et al., 2020; Pertici et al., 2018). Adaptée pour les solutions liquides, cette méthode est moins pertinente dans le cas de solutions visqueuses, ce qui est le cas pour des polymères de hautes masses molaires moyennes tels que les EPS greffés (Figure 59). Souhaitant montrer que les hydrogels d'EPS-pNIPAM potentiels sont capables de supporter une étude *in vitro*, les tests de gélification ont été réalisés en condition de culture cellulaire, c'est-à-dire en micro-volume (30  $\mu$ L) en présence du milieu DMEM utilisé pour la culture cellulaire (protocole en III.2.1).

En tenant compte de la viscosité des solutions d'EPS-pNIPAM qui augmente avec la concentration croissante en EPS (Figure 42, Figure 59), les EPS-p20 et les EPS-p5-16%/8% ont été préparés à 10 % m/v en PBS et à 7 % m/v pour les EPS-p5-3%/2%/0% et déposés (30  $\mu$ L) en plaque 24 puits (Figure 60. J0-A). Après 1 h à 37 °C (5 % CO<sub>2</sub>, humidité contrôlée), les solutions présentent un aspect blanc opaque (Figure 60. J0-B). L'ajout de DMEM permet de montrer la gélification des solutions. Les hydrogels d'EPS greffés ne sont pas impactés par l'ajout du milieu de culture (Figure 60. J0-C). A l'inverse, le mélange sans greffage covalent



**Figure 59.** Aspect des solutions d'EPS greffés à température ambiante. A) De gauche à droite : EPS-p5-16%, EPS-p5-8% (10 % m/v PBS), EPS-p5-3% et EPS-p5-2% (7 % m/v PBS), B) de gauche à droite : EPS-p20-6%, EPS-p20-3%, EPS-p20-1% et EPS-p20-0,2% (10 % m/v PBS). La concentration en EPS (% m/v) est indiquée sur les photographies.

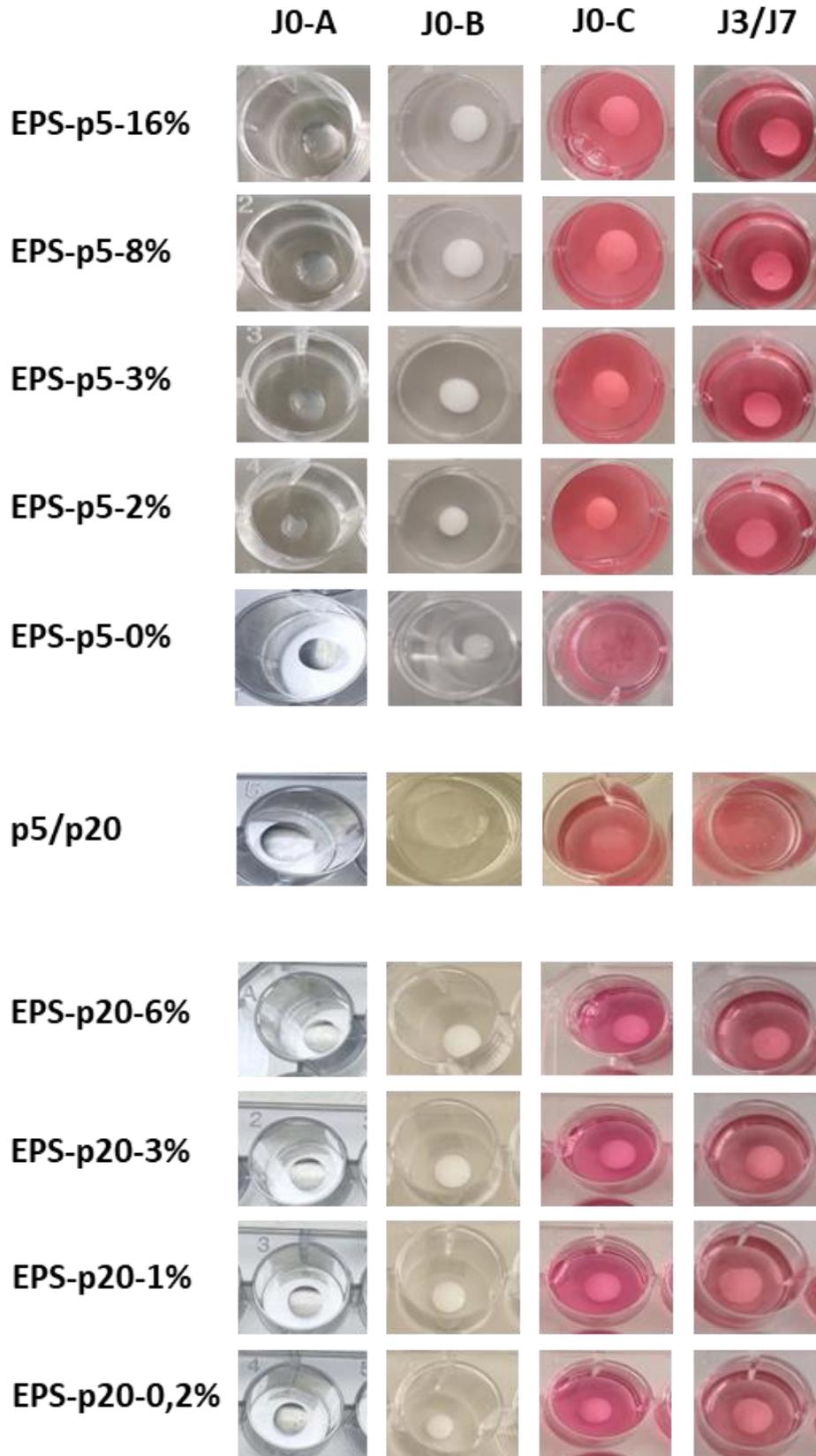


Figure 60. Test de gélification des EPS greffés en condition de culture cellulaire. J0-A) 30  $\mu$ L d'EPS-p20, d'EPS-p5-16%/8%, de p5, de p20 à 10 % m/v PBS et 30  $\mu$ L d'EPS-p5-3%/2%/0% à 7 % m/v PBS ont été déposés. J0-B) Les solutions ont été placées en incubateur 37 °C (5 % CO<sub>2</sub>, humidité contrôlée) pendant 1 h. J0-C) 1 mL de milieu DMEM thermostaté à 39 °C a été déposé. J3/J7) Les hydrogels ont été photographiés 3 jours et 7 jours après gélification.

EPS/pNIPAM (EPS-p5-0%), se dissocie en quelques minutes. Ceci démontre que le pNIPAM libre présent au sein des EPS greffés n'est pas responsable de leur gélification en accord avec les résultats obtenus en DLS montrant que les EPS greffés présentaient un comportement thermosensible différent du mélange EPS/pNIPAM (EPS-p5-0%) (II.3.3.1). De plus, le p5 et le p20 seuls, préparés à 10 % m/v, sont également partiellement dissous par l'ajout de milieu DMEM. Ainsi, ceci confirme une nouvelle fois que seules les chaînes de pNIPAM greffées sur l'EPS permettent l'établissement de jonctions entraînant la formation d'un réseau gélifié. Une densité de greffage de 2 % (34 AU greffés) pour l'EPS-p5-2% suffit à octroyer les propriétés de gélification à l'EPS greffé. De même pour les EPS-p20 où une densité de greffage de 0,2% (4 AU greffés) est suffisante. Les hydrogels sont stables sur toute la durée de l'étude fixée à 7 jours (Figure 60. J3/J7).

### 3.1. Estimation de la cinétique de transition sol/gel des EPS greffés

Dans un contexte d'élaboration d'hydrogels injectables pour l'ingénierie tissulaire, la cinétique de transition sol/gel constitue un paramètre important. La solution injectée doit pouvoir épouser les formes du défaut à traiter avant gélification. De plus, la gélification doit être suffisamment rapide afin d'éviter une fuite et une mauvaise répartition des cellules qu'elle contient potentiellement (Shi et al., 2021).

Dans ce contexte, une mesure de la cinétique de transition sol/gel a été approchée par l'étude du suivi de l'absorbance des solutions d'EPS greffés (protocole en III.2.2) à 37 °C (Figure 61.A/B). Le temps, entre le début de la cinétique (0 s) et le début de l'augmentation de l'absorbance (185 s à 240 s, ~ 3/4 min) est plutôt associé au temps nécessaire pour que les solutions atteignent leur température de transition (LCST ~ 32 °C). Il est donc dépendant du transfert thermique et donc du contexte de la manipulation (volume de solution, viscosité, microplaque, température de chauffage...). Le temps entre le début de l'augmentation de l'absorbance et sa stabilisation est davantage associé à la transition d'état de la solution à un gel. Il est de 1 min à 2 min environ puis l'absorbance est stable au bout de ~ 5 min. Pour autant, les valeurs d'absorbance obtenues ici ne peuvent-être corrélées à un état gélifié des solutions, autrement dit, à des mesures mécaniques du système. Ces solutions gélifiant à 37 °C au vu des résultats précédents (III.3), on pourra néanmoins supposer que les solutions EPS-pNIPAM

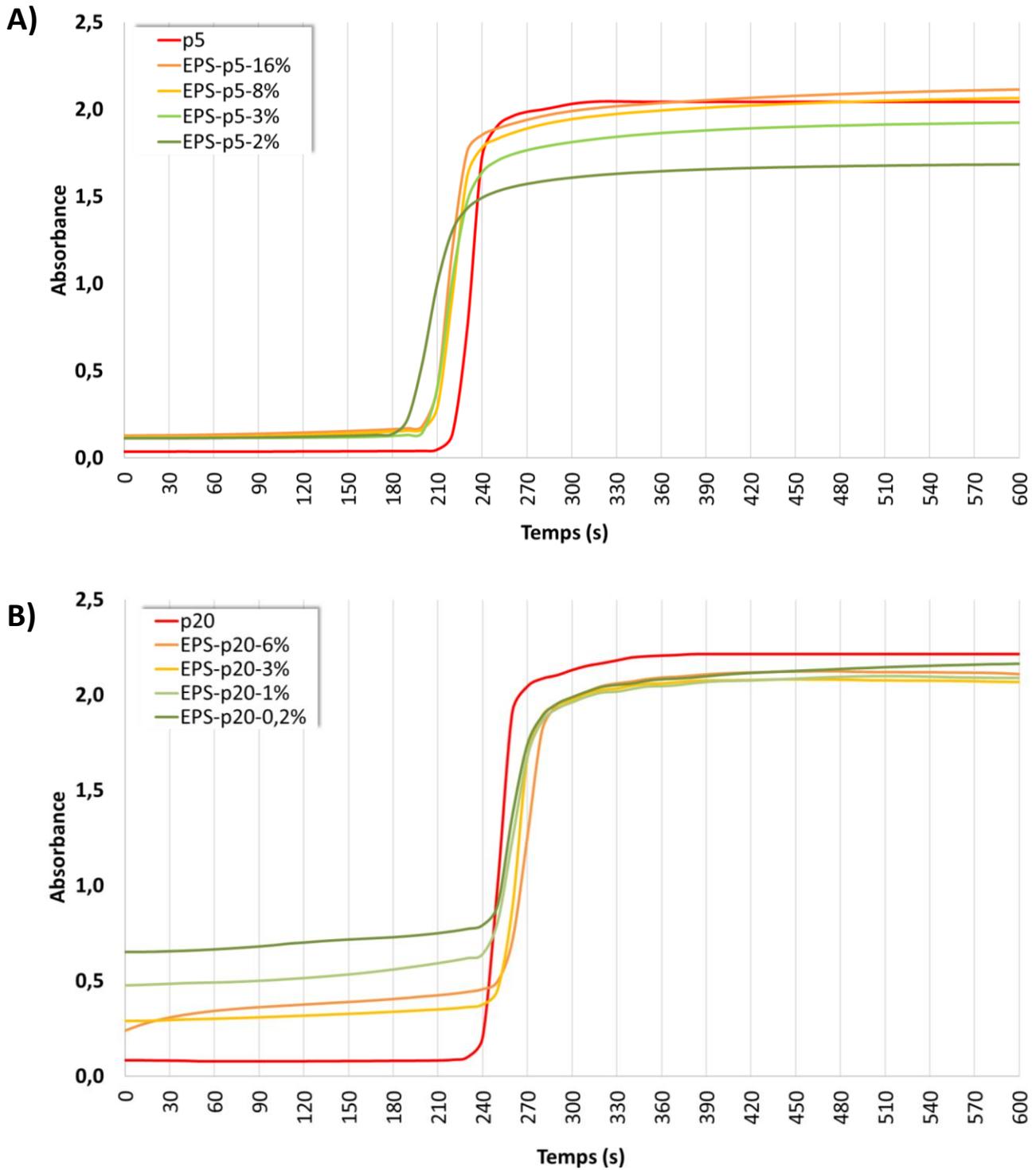


Figure 61. Suivi de l'absorbance des solutions A) de p5/d'EPS-p5 (EPS-p5-16%/8% à 10 % m/v PBS et EPS-p5-3%/2% à 7 % m/v PBS) et B) de p20/d'EPS-p20 (10 % m/v PBS) à 37 °C au cours du temps.

passent à l'état gel lorsque la valeur de l'absorbance a atteint son plateau donc pour un temps inférieur à 2 min, du même ordre que celui mesuré pour les pNIPAM seuls, en accord avec la transition sol-gel rapide du pNIPAM généralement décrite (~ 1 min) (Liu et al., 2004). Le greffage du pNIPAM sur l'infernane n'a donc pas d'impact notable sur la cinétique de transition initiale du pNIPAM, ce qui est également observé par Chen & Cheng (2006) pour un hydrogel chitosane-pNIPAM ou encore Ekerdt et al. (2018) pour un hydrogel hyaluronane-pNIPAM.

### 3.2. Mesure du gonflement des hydrogels d'EPS greffés en condition de test *in vitro*

Le gonflement de l'hydrogel est un processus physique caractérisé par une augmentation de volume en présence d'une solution aqueuse. Le gonflement des hydrogels comprend principalement trois étapes : (1) la diffusion des molécules d'eau dans le réseau de polymère, (2) l'hydratation et la relaxation des chaînes de polymère et (3) l'expansion du réseau de polymère (Peppas et al., 2000). Le comportement général de gonflement des hydrogels est caractérisé par la mesure du taux de gonflement, c'est-à-dire la masse totale de l'hydrogel à un instant  $t$  (correspondant à la masse de l'hydrogel + la masse d'eau absorbée par l'hydrogel dans lequel il est immergé) comparée à la masse initiale de l'hydrogel (équation 7, III.2.3). Les propriétés thermosensibles des polymères EPS-pNIPAM sont réversibles ce qui implique une transition sol/gel lorsque la température augmente et dépasse leur LCST et inversement une transition gel/sol dès que la température diminue en dessous de leur LCST (~ 32 °C). Ainsi, afin de mesurer le taux de gonflement, un protocole spécifique à l'utilisation d'un gel thermosensible a été élaboré (protocole en III.2.3).

L'évolution du taux de gonflement au cours du temps des hydrogels d'EPS-pNIPAM suit une sigmoïde. Pour les EPS-p5-16%/8%, l'équilibre est atteint entre 6 et 22 h, contre approximativement 48 h dans le cas des EPS-p5-3%/2% (Figure 62.A). Après 55 h, la valeur du taux de gonflement varie de 1,6 pour l'EPS-p5-16%, le plus greffé, à 6,7 pour l'EPS-p5-2%, le moins greffé (Figure 62.A et Figure 64). Une tendance similaire est observée pour les EPS-p20 dont le taux de gonflement évolue de 1,5 pour l'EPS-p20-6% à 4,2 pour l'EPS-p20-0,2% (Figure 62.B et Figure 65). Ces résultats montrent clairement que le gonflement est proportionnel au

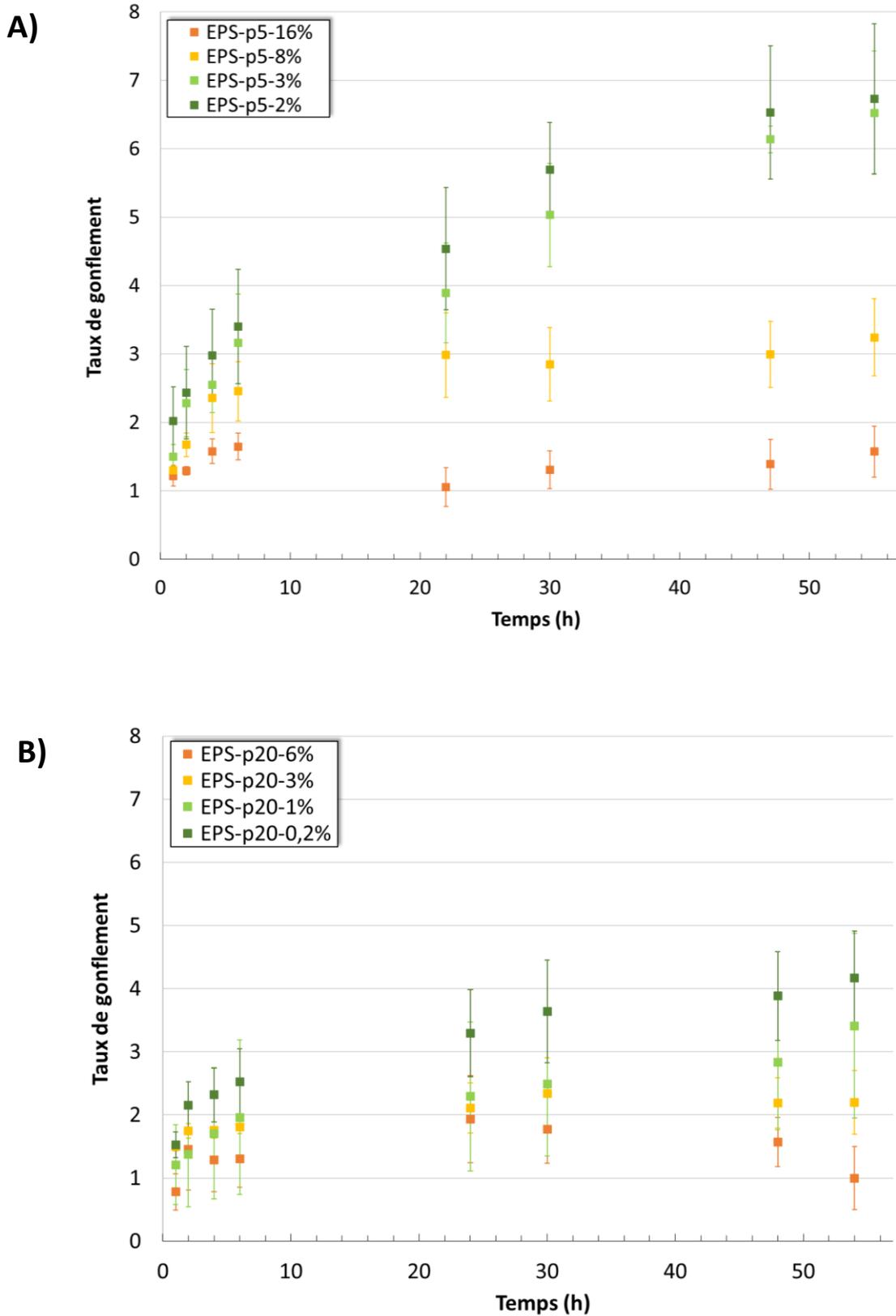
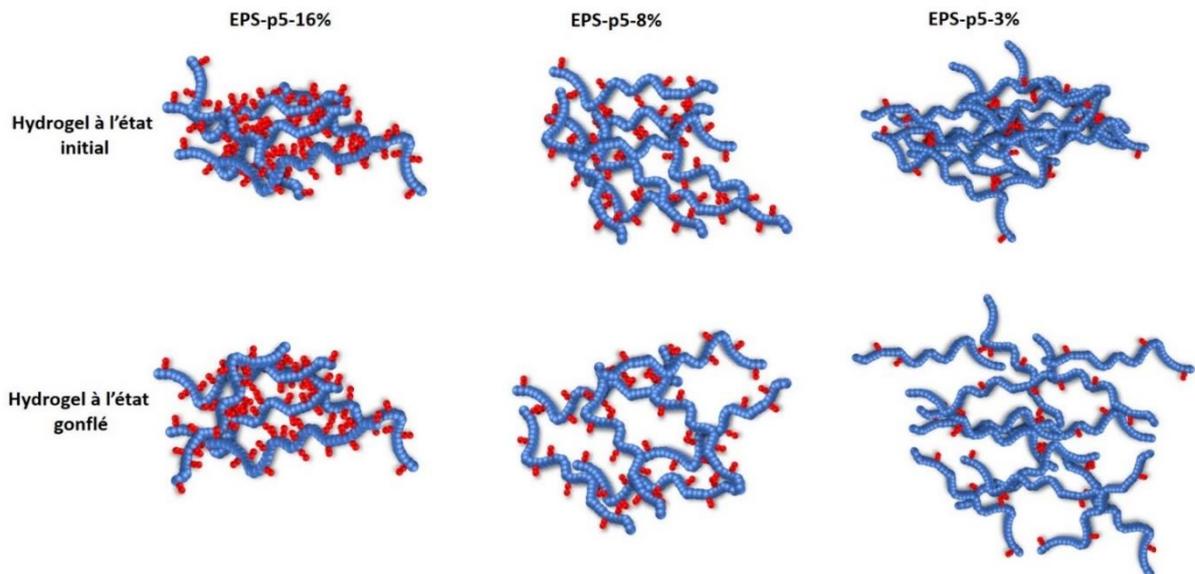


Figure 62. Évolution du taux de gonflement au cours du temps des hydrogels A) d'EPS-p5 (10 % m/v PBS pour les EPS-p5-16%/8% et 7 % m/v PBS pour les EPS-p5-3%/2%) et B) d'EPS-p20 (10 % m/v PBS) en milieu DMEM.

taux d'EPS et inversement proportionnel à la densité de greffage du pNIPAM sur l'EPS (Tableau XI). En effet, le degré de réticulation du réseau de l'hydrogel joue un rôle déterminant dans l'intégrité du réseau polymérique formé et impacte ses propriétés de gonflement (Flory & Rehner, 1943; Brannon-Peppas & Peppas, 1991). Les deux EPS les plus greffés, EPS-p5-16% et EPS-p20-6%, les moins riches en EPS, forment un réseau fortement réticulé avec des nœuds formés par les chaînes de pNIPAM greffées. Ce réseau dense gonfle peu au cours du temps. En revanche, les EPS moins greffés, plus riches en EPS, présentant une distance entre les nœuds de réticulation plus grande, forment un réseau plus lâche également favorisé par la répulsion électrostatique des chaînes d'EPS (Chyzy & Plonska-Brzezinska, 2020) entraînant un réarrangement du réseau de l'hydrogel qui gonfle beaucoup plus avec le temps (Figure 63).

Une diminution progressive du taux de gonflement a été mesurée pour l'EPS-p20-6% (le plus greffé des EPS-p20) entre 24 h (2) et 55 h (1). Dans cet échantillon, la forte densité de greffage ainsi que la longueur des chaînes de pNIPAM p20 et le taux la plus faible en EPS (5 %) pourraient favoriser l'expulsion d'une partie de l'eau absorbée, entraînant ainsi la diminution du volume de l'hydrogel. Cet effet a également été observé par Mortisen et al. (2010) lors de l'augmentation de la masse molaire du pNIPAM (20 000 et 35 000 g/mol vis-à-vis de 10 000 g/mol) utilisé dans la conception d'hydrogels hyaluronane-pNIPAM.



**Figure 63.** Représentation schématique de la structure hypothétique de 3 hydrogels d'EPS-p5 prenant en compte la densité de greffage et le taux d'EPS respectifs. La réticulation du réseau s'établit par les interactions inter-chaînes entre les chaînes de pNIPAM greffées. L'hydrogel le plus greffé (EPS-p5-16%) gonfle peu contrairement aux 2 autres (le gonflement est possible par l'écartement des chaînes menant à la rupture de liaisons physiques, comme discuté dans cette section). Les chaînes d'EPS sont de couleur bleue et les chaînes de pNIPAM sont de couleur rouge.

Le gonflement d'un hydrogel dépend de divers facteurs (degré de réticulation, composition, concentration, température, pH, force ionique...) qui auront une influence sur le gonflement (Brannon-Peppas & Peppas, 1991; Flory & Rehner, 1943; Peppas & Hoffman, 2020). Les valeurs de gonflement obtenues sont donc relatives non seulement aux caractéristiques physico-chimiques des polymères utilisés, mais aussi aux conditions de l'étude réalisée (ex. solvant utilisé). En effet, pour des applications biomédicales, il est important d'étudier le gonflement dans les conditions physiologiques, à minima en présence d'ions. Ainsi, le taux de gonflement a été estimé dans le milieu DMEM. Cependant, la force ionique à l'intérieur (PBS) et à l'extérieur (DMEM) des hydrogels étant proche, la pression osmotique n'aura que très peu d'impact sur le taux de gonflement. En revanche, les multiples changements de milieu réalisés au cours de la mesure du gonflement ont pu diminuer le nombre de nœuds de réticulation, en particulier dans le cas des EPS moins greffés, augmentant ainsi le taux d'hydratation du réseau. En effet, dans le cas d'hydrogels physiques, le gonflement peut mener à la dissociation/rupture des liaisons inter-chaînes ce qui entraîne une diminution de l'intégrité de la structure de l'hydrogel. Ce phénomène de dégradabilité est cependant primordial pour les applications en ingénierie tissulaire avec une dissolution progressive souhaitée de l'hydrogel qui devrait laisser place à la matrice néoformée par les cellules (Tran et al., 2020; Zhang et al., 2019). La mesure du gonflement réalisée dans cette étude avec les changements fréquents de milieu pourrait également simuler le phénomène observé *in vivo* avec le renouvellement du liquide synovial dans l'articulation (Lawry & Bewyer, 2008; Yakut & Tuncer, 2020).

Les expériences de tests de gélification et de gonflement des hydrogels d'EPS-pNIPAM ont cependant montré que les interactions physiques à l'origine du réseau sont suffisamment fortes, au moins pendant les 7 premiers jours, pour maintenir l'intégrité des hydrogels malgré le gonflement et les perturbations éventuelles générées par les prélèvements de surnageants réalisés (Figure 64 et Figure 65).

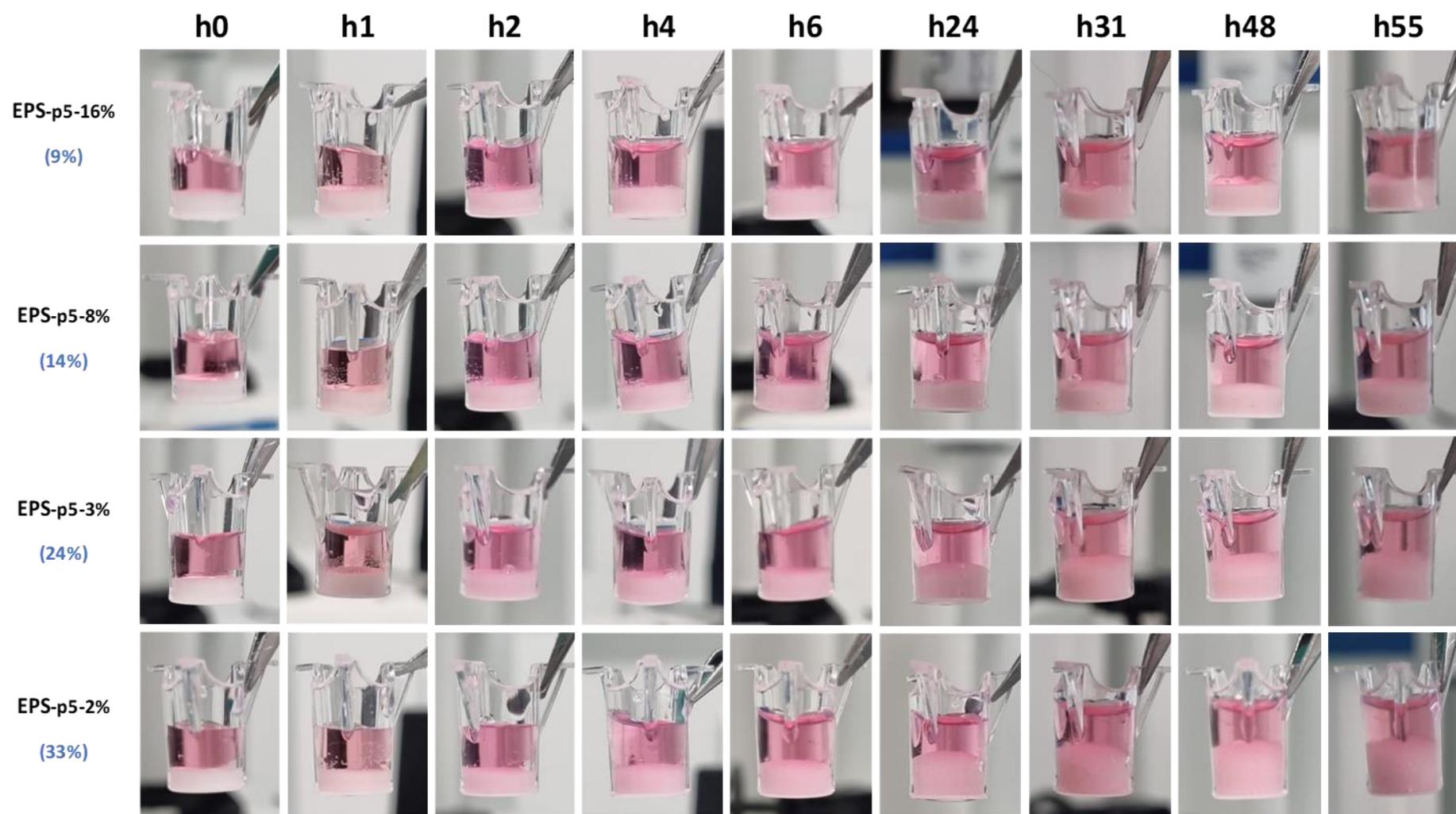


Figure 64. Photographies illustrant le gonflement au cours du temps (approximatif en heure) des hydrogels d'EPS-p5 (100  $\mu$ L, 10 % m/v PBS pour les EPS-p5-16%/8% et 7 % m/v PBS pour les EPS p5-3%/2%) recouverts de milieu DMEM à 37 °C (5 % CO<sub>2</sub>, humidité contrôlée). En bleu est précisé le taux d'EPS au sein de l'hydrogel.

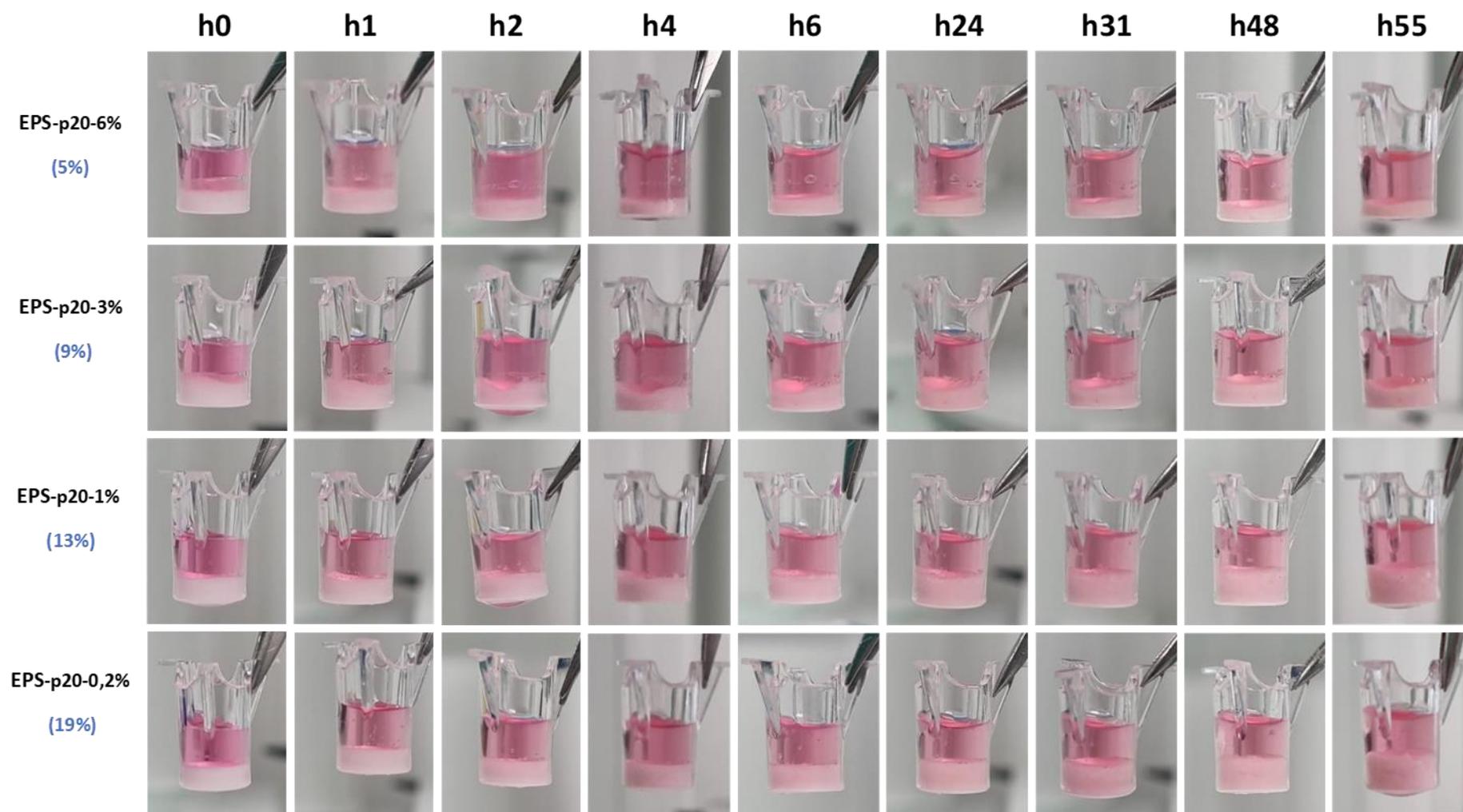


Figure 65. Photographies illustrant le gonflement au cours du temps (approximatif en heure) des hydrogels d'EPS-p20 (100  $\mu$ L, 10 % m/v PBS) recouverts de milieu DMEM à 37 °C (5 % CO<sub>2</sub>, humidité contrôlée). En bleu est précisé le taux d'EPS au sein de l'hydrogel.

### 3.3. Propriétés mécaniques des hydrogels d'EPS greffés par AFM en condition de test *in vitro*

L'objectif de cette partie est de déterminer les propriétés mécaniques des différents hydrogels obtenus en effectuant les mesures dans les conditions les plus proches de celles de l'utilisation des hydrogels, c'est-à-dire en condition de test *in vitro*. Ainsi, 30  $\mu$ L d'hydrogels ont été immergés dans un milieu de culture DMEM afin qu'ils soient dans un état complètement hydraté puis les mesures ont été réalisées à 37 °C. Seule la microscopie de force atomique (AFM) satisfait toutes ces conditions en permettant de travailler en milieu liquide à 37 °C, et l'utilisation de sphères avec des tailles (5  $\mu$ m) comparables aux tailles des cellules permettait également de sonder la réponse mécanique comme perçue par les cellules. Des expériences préliminaires n'ont pas montré de réelles différences dans les réponses des hydrogels au cours du temps sur un suivi de 4 heures après leur préparation. Par conséquent, toutes les mesures AFM ont été effectuées entre 30 minutes à 2 heures après la gélification des hydrogels. Ainsi les propriétés mécaniques des hydrogels correspondraient aux propriétés initiales retrouvées lors de l'application finale, à savoir après l'injection dans le défaut à réparer. Deux approches de mesures par AFM ont été utilisées pour déterminer les propriétés mécaniques, une première consistant à effectuer des expériences de micro-rhéologie dans le domaine temporel et une seconde visant à caractériser la réponse dissipative des hydrogels.

#### 3.3.1. Micro-rhéologie par microscopie de force atomique

Au cours des dernières années, de nombreuses méthodes ont été développées pour mesurer les propriétés mécaniques de matériaux mous par AFM en effectuant des courbes de force, de la modulation de force ou d'indentation, des tests de fluage ou encore des mesures de relaxation de contrainte. Les propriétés viscoélastiques d'hydrogels de taille micrométrique ont également été déterminées par les méthodes de modulation de force/indentation qui présentent l'avantage d'opérer dans le domaine fréquentiel (Nalam et al., 2015; Xu et al., 2012). Cependant, les incertitudes liées aux calibrations et aux leviers utilisés (revêtement magnétique non identique) rendent ces méthodes délicates.

Une alternative à ces mesures dépendantes de la fréquence consiste à effectuer des expériences de relaxation de contrainte (ou de force). La Figure 66 présente une mesure de relaxation de force effectuée sur un hydrogel d'EPS-p5-8% après une indentation de 950 nm.

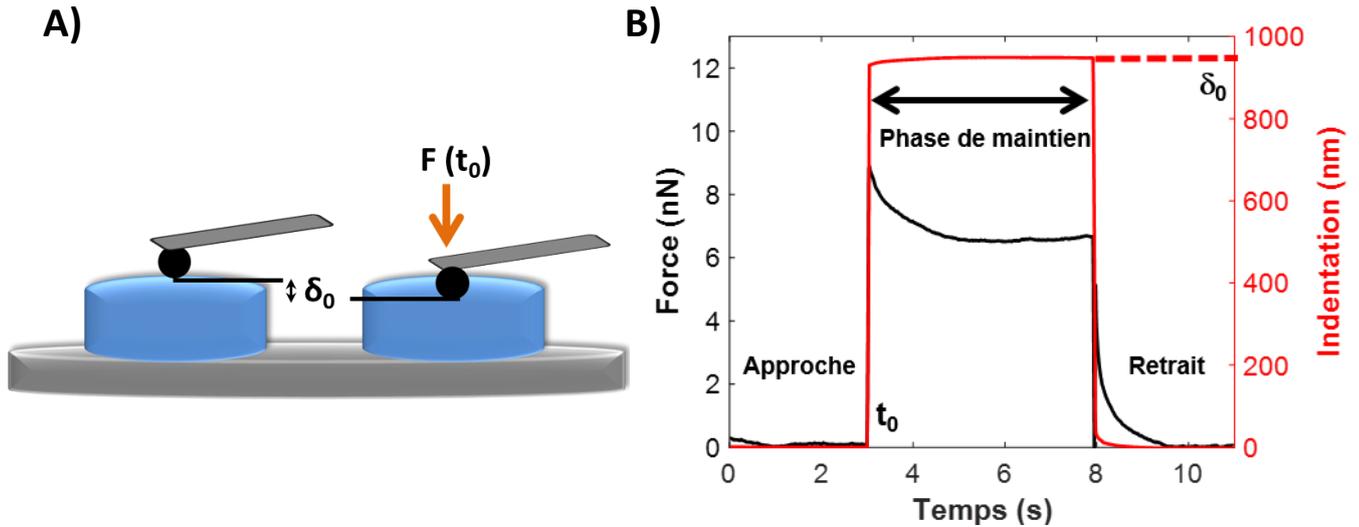


Figure 66. Procédure AFM pour enregistrer une courbe de relaxation de force : A) (1) dans la partie approche, la pointe initialement au-dessus de la surface de l'échantillon indente l'échantillon jusqu'à atteindre une profondeur prédéfinie  $\delta_0$ , B) (2) dans la phase de maintien, la décroissance de la force est mesurée en fonction du temps (ici 5 s) tandis que l'indentation est maintenue constante, (3) la pointe est finalement rétractée de l'échantillon pour revenir à sa position initiale (partie retrait). Illustration A) issue de Cuenot et al. (2022).

Dans ces expériences, le levier AFM est approché rapidement de la surface de l'échantillon jusqu'au contact pointe-surface. Après ce contact, la force appliquée par le levier augmente jusqu'à ce que l'indentation atteigne une valeur prédéfinie,  $\delta_0$ , utilisée pour définir le temps initial  $t_0$  (Figure 66.B). La décroissance de la force est mesurée pendant une période de temps (appelée phase de maintien), alors que l'indentation est maintenue constante à  $\delta_0$  par une boucle de rétroaction. Le levier est finalement retiré de l'échantillon pour revenir à sa position initiale. Pendant la phase de maintien, la force et le rayon de contact pointe-surface diminuent avec le temps, contrairement aux essais de fluage (i.e. mesure de l'indentation au cours du temps sous une charge constante, ang. Creep test) pour lesquels la surface de contact augmente pendant la relaxation (Moreno-Guerra et al., 2019).

À partir de la force mesurée dans la phase de maintien,  $F(t)$ , le module de relaxation de cisaillement de l'hydrogel,  $G(t)$ , peut être directement obtenu en utilisant la relation introduite (équation 8) par Lee et Radok pour un indenteur sphérique (Lee & Radok, 1960):

$$F(t) = \frac{8}{3(1-\nu)} \sqrt{R} \delta_0^{3/2} G(t) \quad (8)$$

où  $\delta_0$  est la profondeur d'indentation constante,  $\nu$  est le coefficient de Poisson de l'hydrogel, et  $R$  est le rayon de la pointe AFM.

La Figure 67.B montre un exemple de module de relaxation de cisaillement obtenu sur un hydrogel d'EPS-p5-8% à partir de la courbe de relaxation de force mesurée (Figure 67.A) en utilisant les paramètres suivants :  $R = 2,5 \mu\text{m}$ ,  $\delta_0 = 950 \text{ nm}$  et  $\nu = 0,4$  comme valeur largement acceptée pour les hydrogels (Moreno-Guerra et al., 2019). Il est intéressant de noter que  $G(t)$  correspond directement à l'évolution de  $F(t)$  car la constante de proportionnalité de l'équation 8 est entièrement déterminée par les conditions expérimentales. L'alternative aux méthodes de modulation de force/indentation consiste alors à effectuer la transformée de Fourier de la dérivée temporelle de  $G(t)$  conduisant au module de cisaillement complexe  $G^*(\omega)$  (Evans et al., 2009). Les composantes réelles  $G'(\omega)$  et imaginaires  $G''(\omega)$  du module de cisaillement complexe décrivent respectivement les caractères élastiques (module de stockage,  $G'$ ) et visqueux (module de perte,  $G''$ ) dépendant de la fréquence de l'échantillon. Cette approche offre l'avantage de contrôler la gamme de fréquences accessibles et continues par la fenêtre temporelle expérimentale. En effet, la fréquence la plus basse est liée à la durée de relaxation (3,3 s sur la Figure 67, et la fréquence la plus élevée est déterminée à partir de l'inverse de la fréquence d'échantillonnage, c'est-à-dire le pas de temps (Zykwinska et al., 2022).

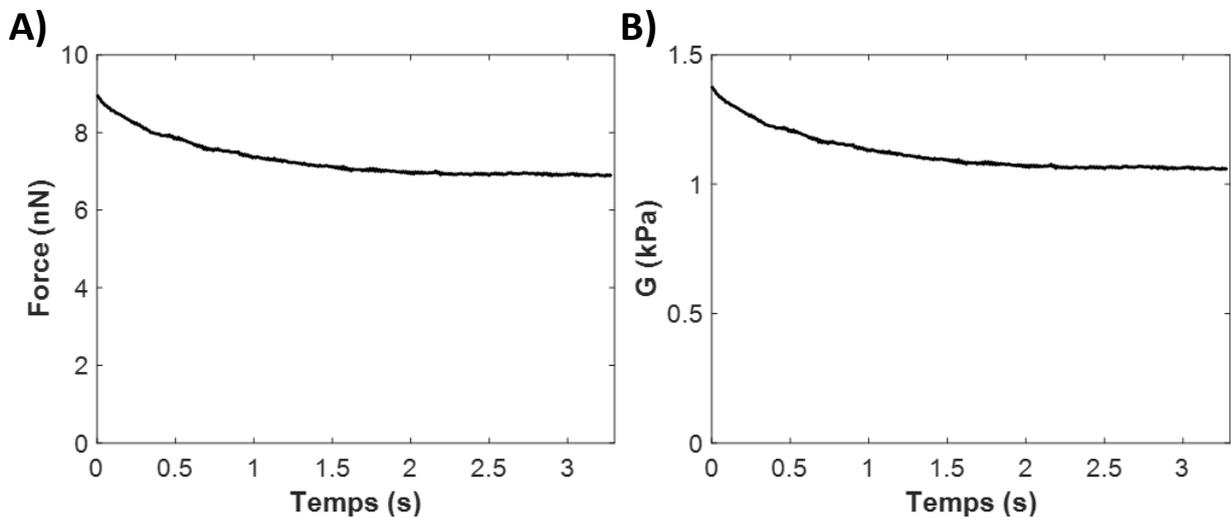


Figure 67. A) Courbe de relaxation de force pour une indentation constante de 950 nm mesurée sur l'EPS-p5-8% (10 % m/v PBS). B) Module de relaxation de cisaillement,  $G(t)$ , mesuré pour l'EPS-p5-8% (10 % m/v PBS).

Nous avons utilisé cette méthode pour déterminer les modules  $G'$  et  $G''$  des différents hydrogels d'EPS-p5 et d'EPS-p20, exceptés pour les échantillons d'EPS-p5-2% et d'EPS-p20-6% pour lesquels ces mesures n'ont pu être réalisées (Tableau XV). Pour une fréquence de 1 Hz, les modules de cisaillement des hydrogels d'EPS-pNIPAM sont similaires à ceux mesurés par des expériences classiques de rhéologie macroscopique (1 Hz,  $\sim$  1-2 kPa) pour d'autres hydrogels polysaccharides-pNIPAM greffés tels que l'alginate (Guo et al., 2018) ou l'acide hyaluronique (Barbier et al., 2023; Ekerdt et al., 2018; Mortisen et al., 2010).

L'ensemble des mesures rhéologiques effectuées pour les différents hydrogels d'EPS-p5, est présenté sur la Figure 68 alors que la Figure 69 montre les résultats obtenus sur les hydrogels d'EPS-p20. Les valeurs indiquées en gras sur les figures correspondent aux modules de stockage mesuré à 0,3 Hz et 200 Hz. Le module de stockage  $G'$  des EPS-p5 est toujours supérieur au module de perte  $G''$  dans la gamme de fréquences appliquée ce qui indique le comportement solide (gélifié) des hydrogels (Figure 68). Le module  $G'$  présente une faible dépendance vis-à-vis de la fréquence, avec les valeurs de module qui diminuent légèrement (diminution inférieure à un facteur 2) en passant de 200 Hz à 0,3 Hz pour les hydrogels d'EPS-p5 (Figure 68). Ceci suggère que les liaisons physiques inter-chaînes formées entre les chaînes d'EPS par les chaînes de pNIPAM greffées ont une durée de vie suffisamment longue pour empêcher la relaxation des chaînes macromoléculaires dans les conditions appliquées. Les hydrogels d'EPS-p20 présentent un comportement similaire aux hydrogels d'EPS-p5 ( $G' > G''$  sur la plage des fréquences mesurées) avec une dépendance légèrement plus grande du module  $G'$  avec la fréquence (Figure 69). Cette évolution est davantage marquée pour les hydrogels d'EPS-p20-1% et d'EPS-p20-3% avec une augmentation d'un facteur  $\sim$  4 et  $\sim$  6, respectivement. La dépendance du module  $G'$  avec la fréquence suggère la formation d'un réseau plus instable, se déformant plus facilement sous la contrainte de cisaillement imposée. L'écart entre les valeurs de  $G'$  et  $G''$  a également tendance à diminuer pour ces derniers hydrogels, confirmant l'instabilité plus grande des réseaux formés.

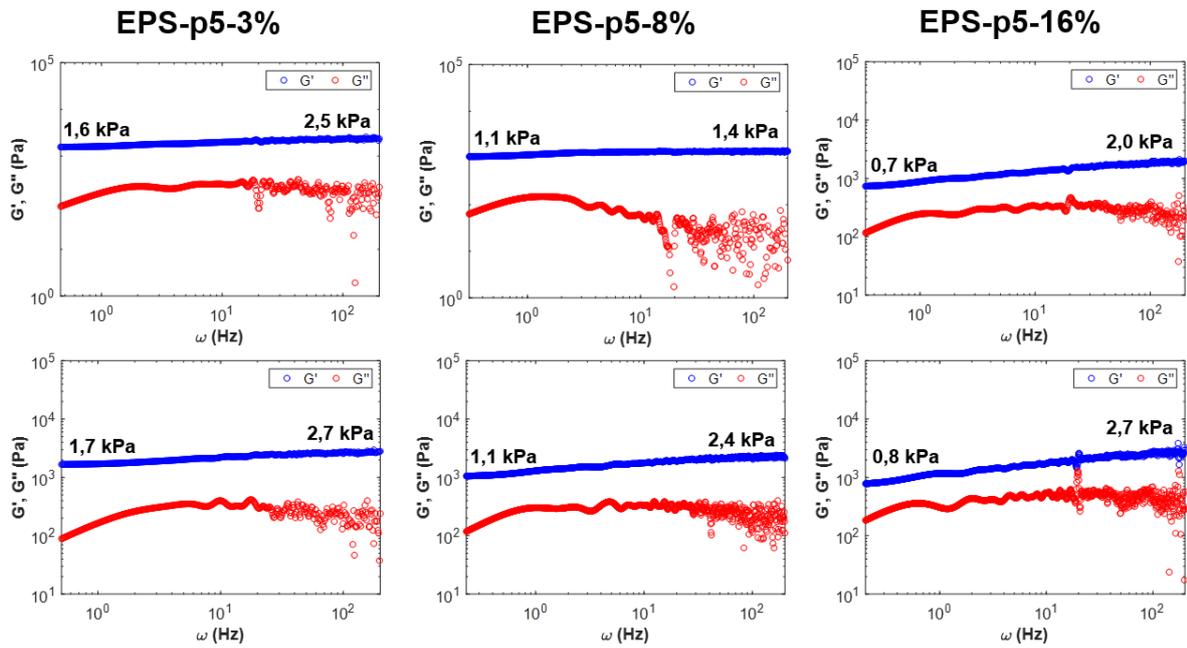


Figure 68. Modules de stockage  $G'(\omega)$  et de perte  $G''(\omega)$  mesurés sur les différents hydrogels d'EPS-p5 (10 % m/v PBS sauf l'EPS-p5-3%, 7 % m/v PBS) en fonction des fréquences angulaires comprises entre 0,3 Hz et 200 Hz.

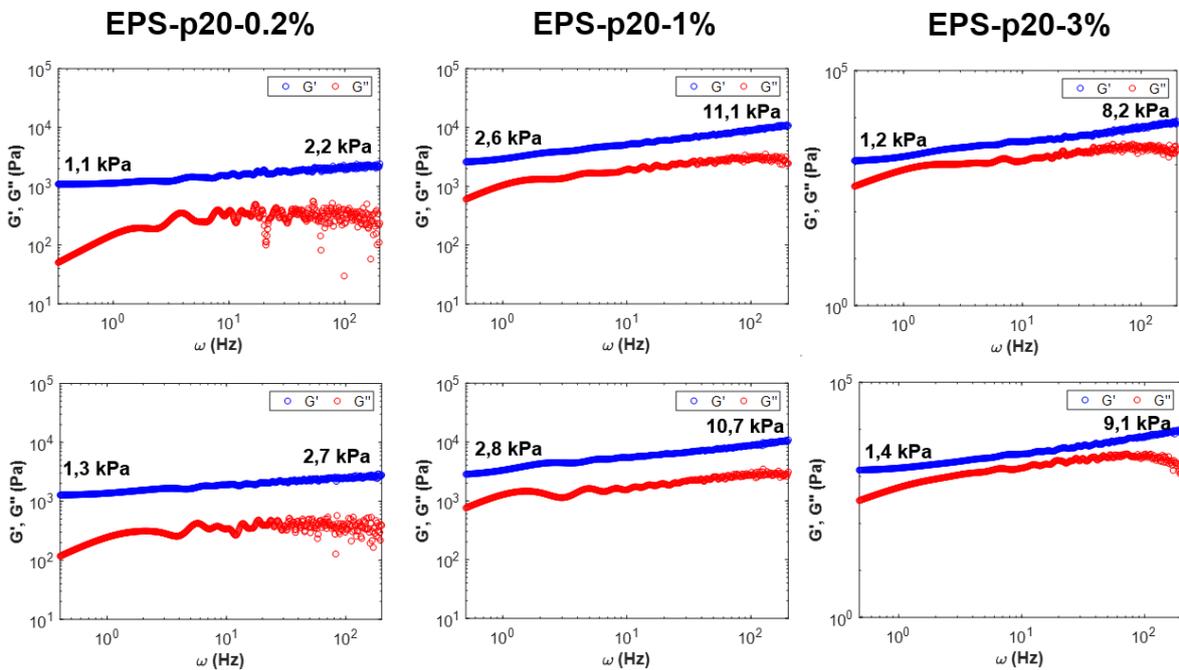


Figure 69. Modules de stockage  $G'(\omega)$  et de perte  $G''(\omega)$  mesurés sur les différents hydrogels d'EPS-p20 (10 % m/v PBS) en fonction des fréquences angulaires comprises entre 0,3 Hz et 200 Hz.

A partir des valeurs du module de stockage à 1 Hz, il est possible d'estimer la taille moyenne du maillage  $\xi$  du réseau de chaque hydrogel en utilisant l'équation de Flory (Flory, 1953; Henry et al., 2017) (équation 9) :

$$\xi = \sqrt[3]{\frac{k_B T}{G'}} \quad (9)$$

où  $k_B$  est la constante de Boltzmann et T la température de la mesure AFM (37 °C). Ces tailles sont de l'ordre de 15 nm avec des différences peu significatives entre les différents hydrogels (Tableau XV).

**Tableau XV. Valeurs du module de stockage  $G'$  à 1 Hz mesuré par micro-rhéologie AFM sur 2 hydrogels indépendants (10 % m/v PBS sauf l'EPS-p5-3%, 7 % m/v PBS) pour chaque condition. Estimation de la taille des pores  $\xi$  par l'équation (9) de Flory.**

Hydrogel	$G'$ (kPa)	$G'$ (kPa)	$\langle G' \rangle$ (kPa)	$\xi$ (nm)
	1 Hz Gel 1	1 Hz Gel 2	1 Hz	
EPS-p5-16%	0,8	0,9	0,85 ± 0,05	~ 17
EPS-p5-8%	1,1	1,2	1,15 ± 0,05	~ 15
EPS-p5-3%	1,6	1,7	1,65 ± 0,05	~ 14
EPS-p20-3%	1,5	1,3	1,40 ± 0,10	~ 14
EPS-p20-1%	2,8	3,0	2,90 ± 0,10	~ 11
EPS-p20-0,2%	1,1	1,4	1,25 ± 0,15	~ 15

### 3.3.2. Réponses poroélastiques ou viscoélastiques des hydrogels

La méthode la plus largement utilisée pour mesurer les propriétés mécaniques d'un matériau est de déterminer la relation contrainte-déformation pour en extraire son module élastique. Cette mesure peut être réalisée par AFM en effectuant une courbe force-indentation où la pointe indente progressivement le matériau avec l'accroissement de la force appliquée (partie approche) suivi du retrait de la pointe du matériau (partie retrait). La Figure 70 montre des courbes force-indentation mesurées sur les hydrogels d'EPS-p5-3%, d'EPS-p5-8% et d'EPS-p5-16%. Ces courbes de force dites « conventionnelles » correspondent à des courbes de relaxation de force sans la phase de maintien à indentation constante (Figure 66). Le modèle de Hertz a ensuite été utilisé pour extraire le module élastique de l'hydrogel sondé à partir de la courbe approche. Ce modèle décrit la relation entre la force ( $F$ ) et la profondeur d'indentation ( $\delta$ ) pour un matériau élastique indenté par une sphère de rayon  $R$  (Hertz, 1881) :

$$F = \frac{4}{3(1-\nu^2)} R^{1/2} \delta^{3/2} E_{HERTZ} \quad (10)$$

Ce modèle a été ajustée sur la courbe approche avec comme seul paramètre ajustable, le module élastique  $E_{HERTZ}$  de l'hydrogel sondé en supposant un coefficient de Poisson de 0,4 pour l'hydrogel. Un bon accord est obtenu entre les différentes courbes approche et le modèle de Hertz permettant ainsi de déterminer le module élastique des hydrogels avec précision.

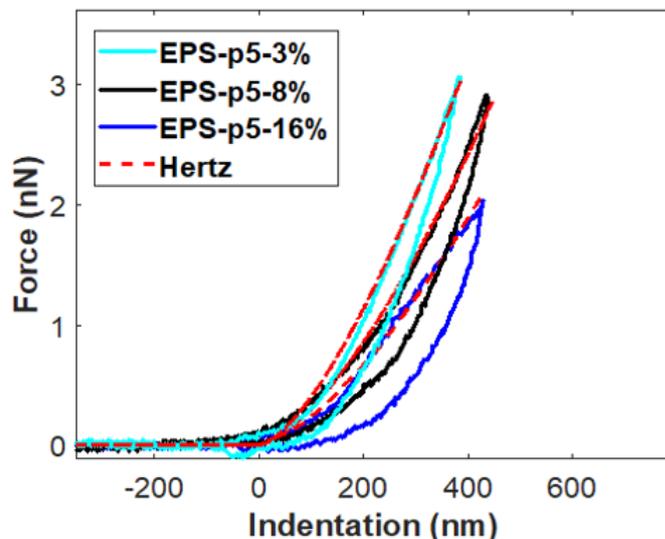


Figure 70. Courbes force-indentation mesurées sur les hydrogels d'EPS-p5-3% (7 % m/v PBS), d'EPS-p5-8% et d'EPS-p5-16% (10 % m/v PBS), avec l'ajustement du modèle de Hertz (en rouge) sur la partie approche.

La Figure 71 montre les valeurs du module élastique obtenu pour les différents hydrogels à l'aide du modèle de Hertz. Les valeurs sont comprises entre 2 kPa et 7 kPa pour l'ensemble des hydrogels et sont assez proches entre les hydrogels d'EPS-p5 et d'EPS-p20. Pour les hydrogels d'EPS-p5, les modules élastiques sont proportionnels au taux d'EPS et inversement proportionnels à la densité de greffage du pNIPAM sur les chaînes EPS, et évoluent de 2,5 kPa pour l'EPS-p5-16%, le plus greffé à 4,8 kPa pour l'EPS-p5-3%, le moins greffé. L'augmentation du taux d'EPS dans la matrice permet de créer davantage de liaisons inter-chaînes (*via* les chaînes de pNIPAM greffées, mais aussi par la contribution de liaisons faibles de type interactions hydrophiles et van der Waals entre les chaînes d'EPS) entre les chaînes polysaccharidiques peu greffées ce qui contribue à augmenter les modules élastiques. Pour les hydrogels p20, les modules de 4,3 kPa, 6,2 kPa et 3,7 kPa sont obtenus pour les hydrogels d'EPS-p20-0,2%, EPS-p20-1% et EPS-p20-3%, respectivement. De nouveau, le module élastique augmente avec le taux d'EPS dans l'EPS-p20-1% vis-à-vis de l'EPS-p20-3% (taux d'EPS à 13 % et 9 % respectivement). En revanche, l'augmentation du taux d'EPS pour une densité de greffage trop faible (19 % pour EPS-p20-0,2%) ne permet pas d'augmenter le module élastique du réseau. Les propriétés mécaniques des hydrogels résultent donc d'un équilibre entre la densité de greffage et le taux d'EPS au sein de la matrice d'hydrogel.

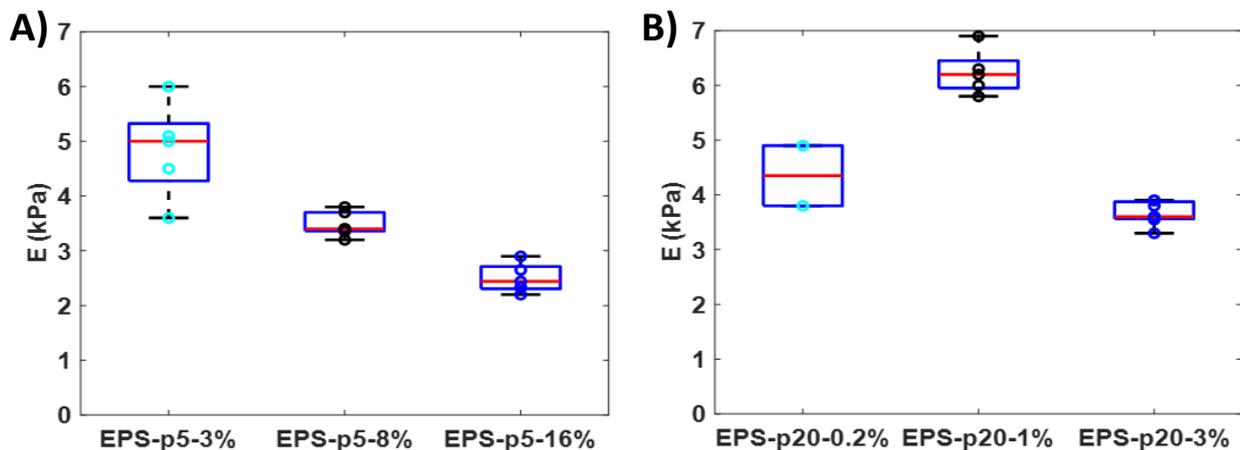


Figure 71. Valeurs du module élastique déterminé par le modèle de Hertz à partir des courbes force-indentation pour les différents hydrogels A) d'EPS-p5 (10 % m/v PBS sauf l'EPS-p5-3%, 7 % m/v PBS) et B) d'EPS-p20 (10 % m/v PBS).

L'hystérésis observée sur la Figure 70 entre les courbes  $F-\delta$  d'approche et de retrait est associée à une dissipation d'énergie ce qui indique que les hydrogels ne se comportent pas comme des matériaux purement élastiques. En effet, les hydrogels possèdent à la fois des caractéristiques solides et liquides indiquant que l'énergie mécanique peut être stockée et dissipée, respectivement. Leur comportement se situe donc quelque part entre un matériau purement élastique et strictement visqueux et ils présentent des propriétés mécaniques dépendantes du temps. Dans la majorité des études et publications, le caractère dissipatif des hydrogels est attribué à une réponse viscoélastique. Cependant, cette attribution est généralement arbitraire et n'est pas supportée par une analyse de l'origine du mécanisme de dissipation. Il en résulte que les propriétés déterminées peuvent provenir de modèles non adaptés aux hydrogels sondés et que les valeurs extraites n'ont aucun sens. Lorsque les hydrogels d'EPS-pNIPAM sont immergés dans le DMEM et soumis à une contrainte mécanique, deux mécanismes différents peuvent être à l'origine de la dissipation observée. Leur réponse mécanique dépendante du temps provient soit de la migration du solvant (ici DMEM) à travers le réseau formé par les chaînes d'EPS-pNIPAM, soit du réarrangement des chaînes d'EPS-pNIPAM. Le premier mécanisme de dissipation correspond à la poroélasticité alors que le second est caractéristique de la viscoélasticité. Ces deux mécanismes distincts peuvent être différenciés car la poroélasticité est dépendante de la taille du contact indenteur-hydrogel alors que la viscoélasticité est indépendante de cette taille (Hu et al., 2010).

Nous avons ainsi effectué des expériences AFM pour caractériser la réponse dissipative des hydrogels. Pour faire varier la taille du contact entre la pointe AFM et l'hydrogel, deux stratégies peuvent être employées, soit en effectuant des mesures de relaxation de force avec des leviers AFM ayant différents rayons de courbure, soit en utilisant le même levier mais en réalisant ces mesures à différentes profondeurs d'indentation (Cuenot et al., 2022). En effet, la théorie de Hertz prédit que le rayon de contact  $a$  d'une sphère de rayon  $R$  est relié à la profondeur d'indentation  $\delta$  par l'équation 11 (Hertz, 1881) :

$$a = \sqrt{R\delta} \quad (11)$$

Nous avons opté pour cette seconde stratégie plus simple à mettre en œuvre et présentant moins d'incertitudes.

La Figure 72 montre des courbes de relaxation de force mesurées sur un hydrogel d'EPS-p5-16% pour des profondeurs d'indentation de 100 nm, 250 nm et 300 nm. Pour comparer ces courbes, les forces sont ensuite normalisées pour que la force instantanée  $F_0$  mesurée à  $t_0$  prenne la valeur de 1 et la force correspondant au nouvel état d'équilibre de l'hydrogel  $F_\infty$  soit égale à 0 (Hu et al., 2010). La Figure 73.A montre les courbes normalisées en force à partir des courbes expérimentales de la Figure 72.

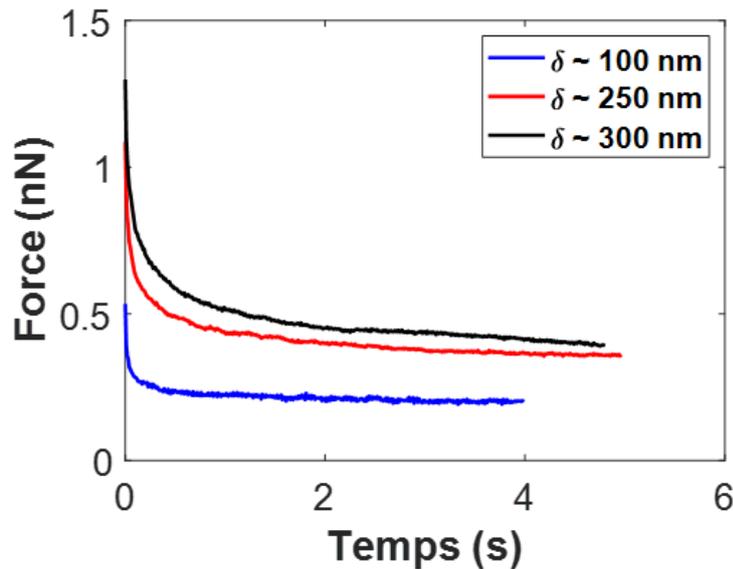


Figure 72. Courbes de relaxation de force mesurées sur un hydrogel d'EPS-p5-16% (10 % m/v PBS) pour différentes indentations.

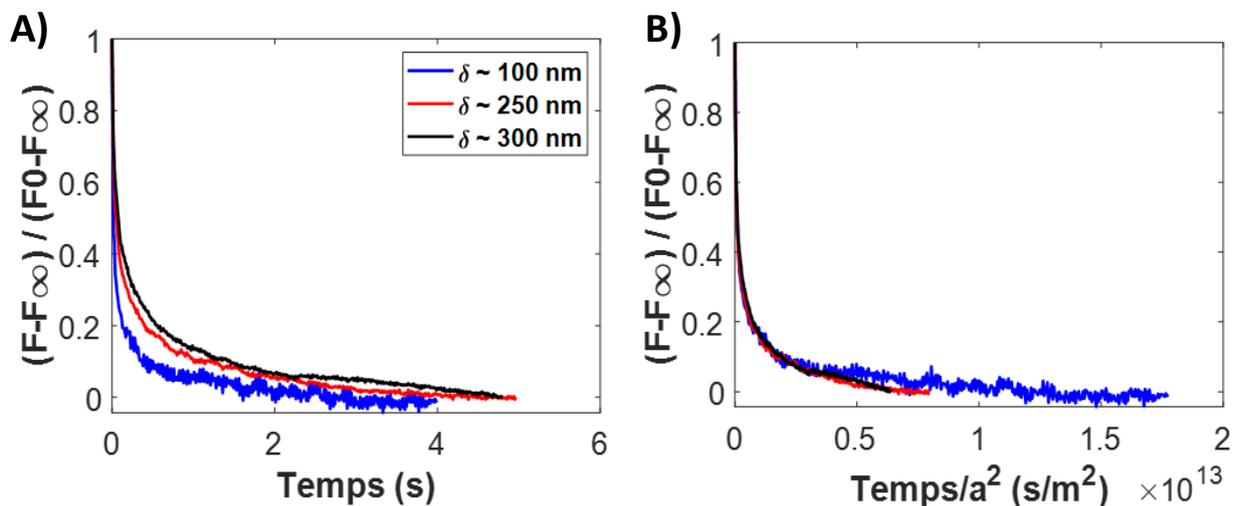
Ces courbes normalisées ne se superposent pas en une seule courbe révélant que le mécanisme de relaxation est dépendant de la taille du contact pointe-surface. En effet, l'évolution des courbes normalisées en fonction de l'indentation montre que le temps de relaxation augmente avec la taille du contact ( $\sim 1 \mu\text{m}$  pour  $\delta$  100 nm et  $\sim 1,7 \mu\text{m}$  pour  $\delta$  300 nm, équation 11) résultant d'une plus grande distance de migration du solvant à travers le réseau de l'hydrogel déformé par la pointe AFM. La dépendance de ces courbes avec la taille de contact révèle donc que l'hydrogel d'EPS-p5-16% sondé est un matériau poroélastique.

Pour confirmer le caractère poroélastique de l'hydrogel d'EPS-p5-16%, le temps a également été normalisé par la surface de contact pointe-surface caractérisant le réseau déformé. En effet, le temps de relaxation poroélastique  $\tau$  défini par (Lin & Hu, 2006) :

$$\tau = \frac{a^2}{D} \quad (12)$$

est bien proportionnel à l'aire de contact, où  $D$  est le coefficient de diffusion du DMEM dans le réseau de l'hydrogel.  $\tau$  correspond donc au temps nécessaire à la migration du DMEM sur une distance correspondant à la taille du réseau déformé.

Après cette normalisation, les trois courbes se superposent en une courbe maîtresse confirmant la migration du solvant hors de la région déformée par l'indentation (Figure 73.B). Il est intéressant de préciser que si l'hydrogel avait été un matériau viscoélastique, les courbes de relaxation après normalisation de la force auraient été superposées en une courbe maîtresse car indépendantes de la taille du contact (Figure 73.A) alors qu'après la normalisation supplémentaire du temps, les courbes auraient été séparées (Figure 73.B) (Cuenot et al., 2022).



**Figure 73. A) Normalisation de la force des courbes de relaxation de force (Figure 72) mesurées dans un hydrogel d'EPS-p5-16% (10 % m/v PBS) à trois profondeurs d'indentation. B) Superposition des courbes de relaxation de force après les normalisations de la force et du temps révélant le comportement poroélastique de l'hydrogel.**

Les mêmes expériences ont ensuite été effectuées sur un autre hydrogel, un EPS-p5-8%, pour vérifier que les hydrogels à base des chaînes d'EPS-pNIPAM sont bien tous poroélastiques. La Figure 74 montre les courbes de relaxation de force enregistrées à trois profondeurs d'indentation, 250 nm, 650 nm et 900 nm.

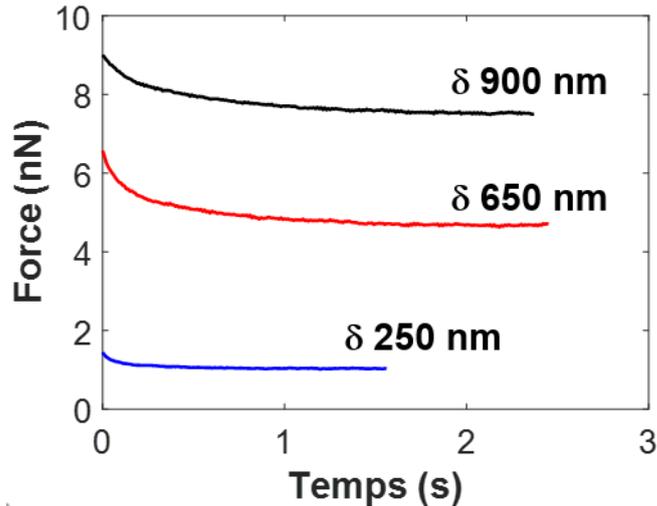


Figure 74. Courbes de relaxation de force mesurées sur un hydrogel d'EPS-p5-8% (10 % m/v PBS) pour différentes indentations.

Après normalisation des forces, les courbes de relaxation ne se superposent pas alors qu'elles se confondent en une courbe maîtresse après la normalisation du temps par l'aire de contact (Figure 75). En faisant varier la taille du contact de  $\sim 1,5 \mu\text{m}$  pour une profondeur d'indentation de 250 nm ( $\sim 2,5 \mu\text{m}$  pour 650 nm) à  $\sim 3 \mu\text{m}$  pour 900 nm, la réponse poroélastique de l'hydrogel d'EPS-p5-8% est révélée (Figure 75).

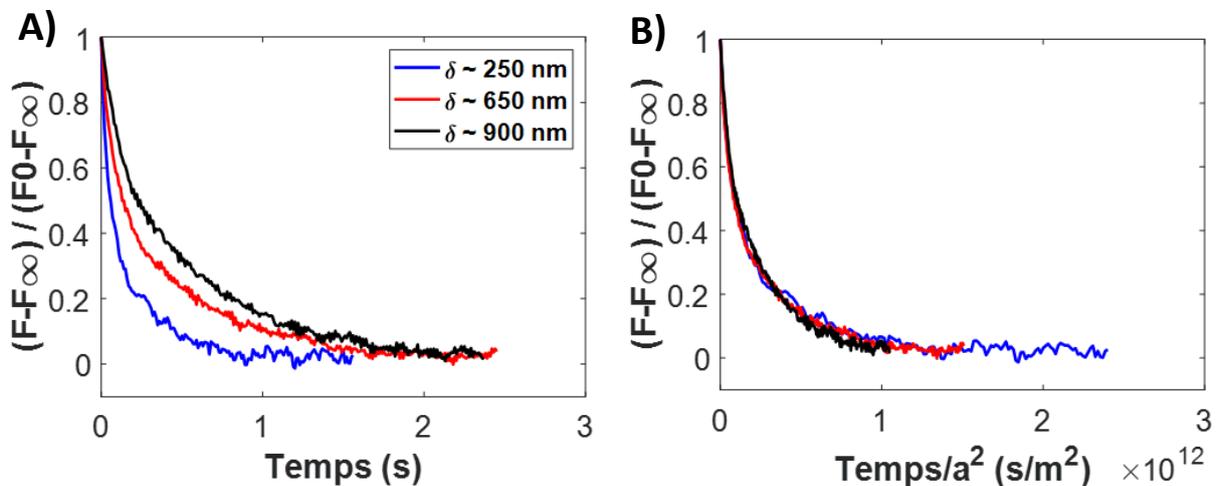


Figure 75. A) Normalisation de la force des courbes de relaxation de force mesurées dans un hydrogel d'EPS-p5-8% (10 % m/v PBS) à trois profondeurs d'indentation. B) Superposition des courbes de relaxation de force après les normalisations de la force et du temps révélant le comportement poroélastique de l'hydrogel.

Ces résultats montrent que les hydrogels obtenus à partir des chaînes d'EPS-pNIPAM sont poroélastiques. Il faut donc utiliser des modèles poroélastiques et non viscoélastiques pour déterminer leurs propriétés mécaniques dépendantes du temps. Il a été récemment montré que des hydrogels chimiques (ex : polyacrylamide) dont les nœuds du réseau sont formés par

des liens covalents étaient également poroélastiques (Cuenot et al., 2022). En revanche, des hydrogels physiques formés par l'EPS infernane de masse molaire moyenne intermédiaire (EPS<sub>265</sub>) et du calcium étaient viscoélastiques, avec des nœuds d'origine électrostatique. La méthode utilisée pour déterminer l'origine des mécanismes de relaxation des hydrogels doit donc être appliquée systématiquement pour déterminer correctement les propriétés mécaniques dépendantes du temps.

D'un point théorique, il n'existe pas de solution analytique permettant de décrire la relaxation de la force pour un matériau poroélastique subissant une indentation par une sphère. En revanche, une solution approximée obtenue par des simulations par éléments finis a été déterminée par Hu et al. (2010) :

$$\frac{F-F_{\infty}}{F_0-F_{\infty}} = 0.491e^{-0.908\sqrt{\theta}} + 0.509e^{-1.679\theta} \quad (13)$$

où  $\theta$  correspond au temps normalisé par le temps de relaxation poroélastique  $\tau$ .

En jouant sur le seul paramètre ajustable de cette équation, le coefficient de diffusion  $D$ , le modèle de Hu est appliqué aux courbes de relaxation normalisées. La Figure 76 montre le bon accord obtenu avec une valeur du coefficient de diffusion de  $2,2 \mu\text{m}^2/\text{s}$  pour l'hydrogel d'EPS-p5-16% et de  $4,6 \mu\text{m}^2/\text{s}$  pour l'hydrogel d'EPS-p5-8%.

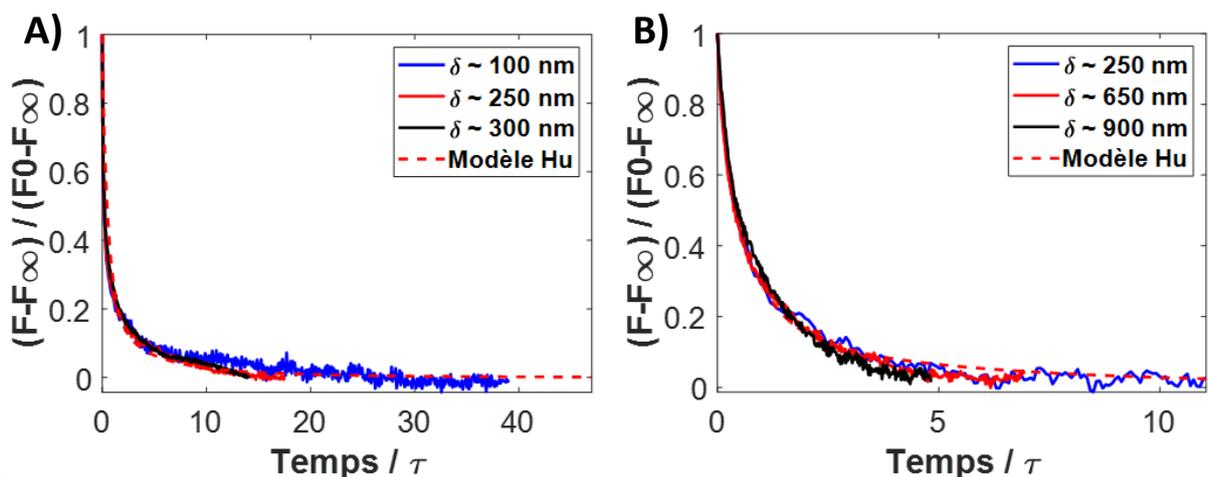
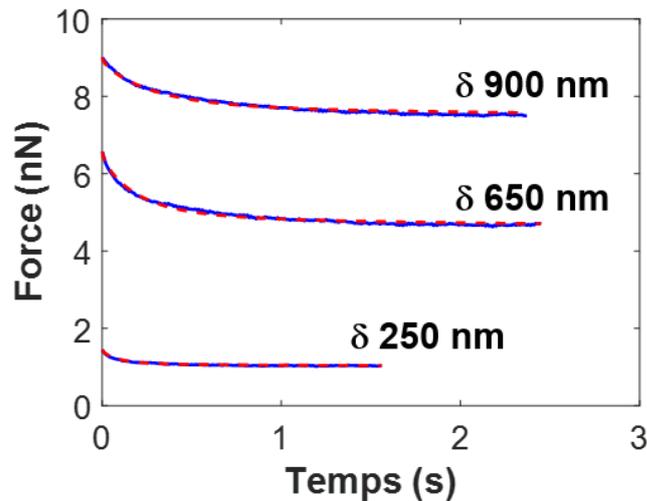


Figure 76. Superposition des courbes de relaxation de force après normalisation des forces et du temps et ajustement du modèle poroélastique de Hu pour A) l'hydrogel d'EPS-p5-16% (10 % m/v PBS) et B) l'hydrogel d'EPS-p5-8% (10 % m/v PBS).

Les courbes de relaxation normalisées sont bien décrites par le modèle poroélastique de Hu apportant une confirmation supplémentaire du comportement poroélastique des hydrogels d'EPS-pNIPAM.

L'équation 13 peut aussi être directement utilisée sur les courbes expérimentales de relaxation pour déterminer le coefficient de diffusion. La Figure 77 montre trois courbes de relaxation mesurées sur un hydrogel d'EPS-p5-8% après des indentations de 250 nm, 650 nm et 900 nm ainsi que les courbes du modèle poroélastique de Hu en ajustant  $D$  à  $4,6 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ,  $4,9 \mu\text{m}^2/\text{s}$  et  $4,8 \mu\text{m}^2/\text{s}$ , respectivement. Les valeurs obtenues sont très proches et indépendantes de la profondeur d'indentation pour des mesures effectuées sur différentes positions sur le même hydrogel d'EPS-p5-8%.



**Figure 77.** Courbes de relaxation de force mesurées à différentes indentations sur un hydrogel d'EPS-p5-8% (10 % m/v PBS) avec superposition du modèle poroélastique de Hu (en pointillé rouge).

Cette procédure a été appliquée sur les courbes de relaxation des différents hydrogels et toutes les valeurs du coefficient de diffusion sont regroupées dans la Figure 78. Ces valeurs sont très proches pour les hydrogels formulés avec le p5, avec des valeurs moyennes de  $3,3 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ,  $3,4 \mu\text{m}^2/\text{s}$  et  $3,5 \mu\text{m}^2/\text{s}$  pour les EPS-p5-8%, EPS-p5-3%, EPS-p5-16% (Figure 78.A). Les coefficients de diffusion sont du même ordre de grandeur pour les hydrogels synthétisés avec le p20 mais les valeurs moyennes sont légèrement plus dispersées avec  $3,9 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ,  $4,8 \mu\text{m}^2/\text{s}$  et  $2,6 \mu\text{m}^2/\text{s}$  pour les EPS-p20-0,2%, EPS-p20-1%, EPS-p20-3%, respectivement (Figure 78.B, Tableau XVI). Ainsi, la diffusion du DMEM dans les hydrogels d'EPS-p20-3% est légèrement plus lente que dans les hydrogels d'EPS-p20-1%. Les valeurs très proches des coefficients de diffusion du solvant dans les hydrogels d'EPS-p5 et d'EPS-p20 restent en accord avec la porosité des réseaux formés qui évolue peu entre les hydrogels (Tableau XVI).

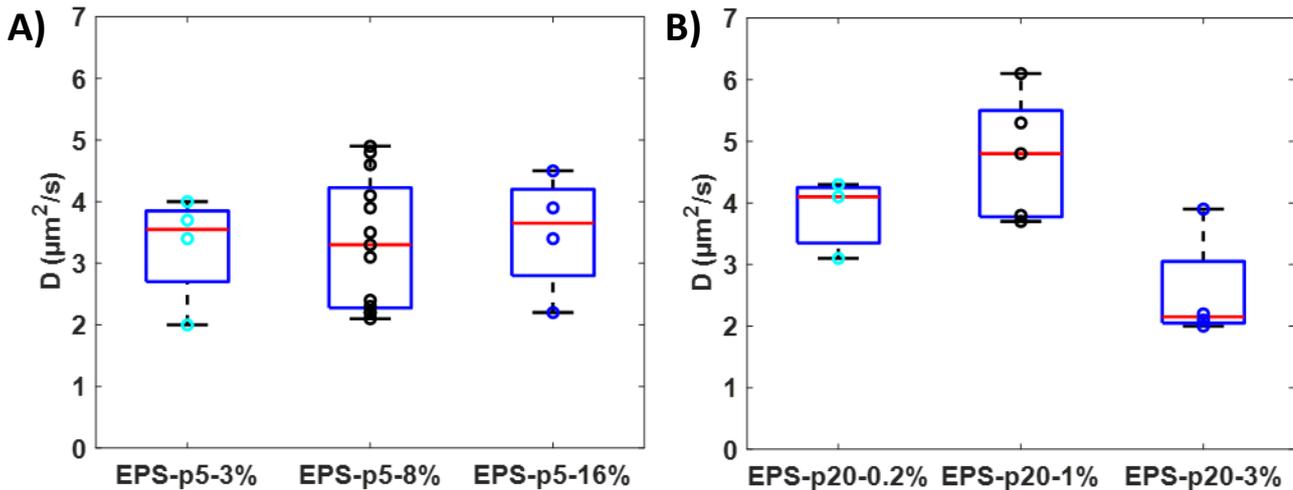


Figure 78. Valeurs du coefficient de diffusion du DMEM dans les différents hydrogels (10 % m/v PBS sauf l'EPS-p5-3%, 7 % m/v PBS).

La théorie de la poroélasticité nous a permis d'extraire le coefficient de diffusion du solvant à travers le réseau des hydrogels à partir des courbes expérimentales de relaxation. A partir de ce coefficient et en utilisant l'équation 12, on peut évaluer le temps de relaxation poroélastique  $\tau$  pour s'assurer que nos mesures étaient suffisamment rapides pour enregistrer la réponse poroélastique. Dans nos expériences, le levier indente l'échantillon avec une grande vitesse ( $20 \mu\text{m}/\text{s}$ ) pour atteindre l'indentation de consigne en moins de 50 ms (en prenant  $t = 0$  au point de contact pointe-surface). Par conséquent, le DMEM n'a pas le temps de s'échapper de la région compressée par la pointe AFM quand la mesure de la courbe de relaxation commence. En effet, avec les valeurs des coefficients de diffusion, le temps de relaxation poroélastique est bien supérieur à 50 ms pour tous les hydrogels. Les valeurs de  $\tau$  calculées dans le Tableau XVI pour une indentation maximale de  $1 \mu\text{m}$  sont légèrement inférieures à 1 s pour les différents hydrogels, et de l'ordre de 0,5 s pour les hydrogels d'EPS-p20-1%.

La théorie de la poroélasticité permet également de déterminer d'autres grandeurs physiques de l'hydrogel sondé, comme le coefficient de Poisson et le module élastique (ou le module de cisaillement) (Biot, 2004). Aux temps courts, l'hydrogel poroélastique se comporte comme un matériau élastique incompressible ( $\nu = 0,5$ ) car l'écoulement du fluide est négligeable et le module élastique  $E$  de l'hydrogel peut être déterminé à partir de la force instantanée (Hu et al., 2010):

$$E = \frac{9}{16} \frac{F_0}{\delta_0^{3/2} R^{1/2}} \quad (14)$$

La Figure 79 montre l'ensemble des valeurs du module élastique déterminé à partir des courbes de relaxation de force en utilisant l'équation 14. Les modules élastiques sont comparables aux valeurs précédemment obtenues par les mesures de courbes force-indentation (Figure 71, Tableau XVI).

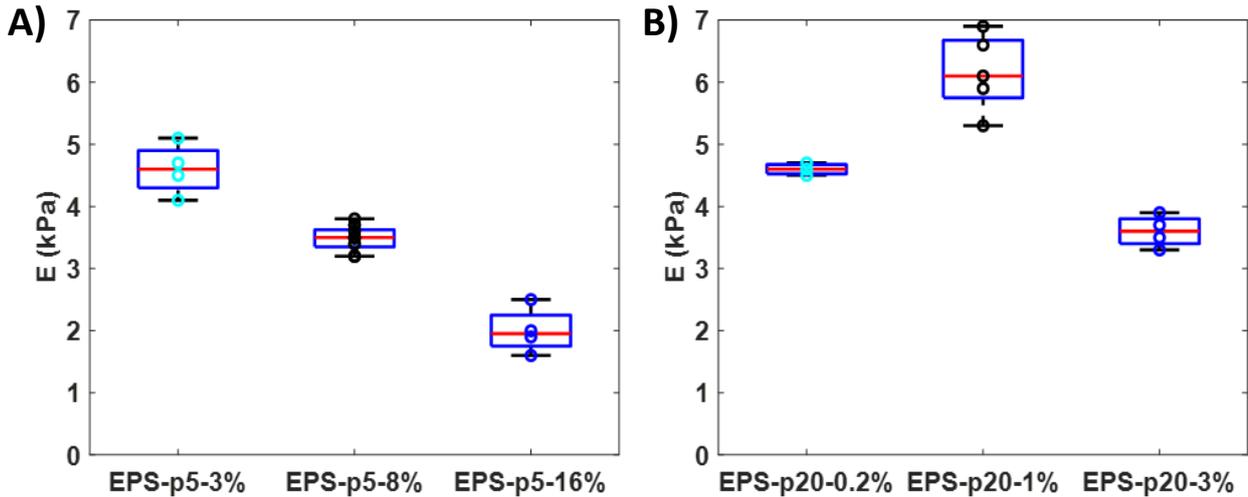


Figure 79. Valeurs du module élastique mesuré à partir des courbes de relaxation pour les différents hydrogels A) d'EPS-p5 (10 % m/v PBS sauf l'EPS-p5-3%, 7 % m/v PBS) et B) d'EPS-p20 (10 % m/v PBS).

Deux méthodes de mesures différentes par AFM (courbes force-indentation et courbes de relaxation de force) traitées par des modèles théoriques distincts (modèle de Hertz et modèle poroélastique) conduisent à des valeurs comparables du module élastique pour les mêmes hydrogels (Tableau XVI). Les faibles écarts-types montrent également la bonne reproductibilité des mesures effectuées sur plusieurs emplacements d'un même hydrogel et sur deux hydrogels par condition. Ces modules élastiques de l'ordre du kPa coïncident avec des valeurs de modules élastique, mesurée par nano-indentation AFM, d'hydrogels physiques destinés à l'ensemencement cellulaire tels que l'alginate (~ 0,1 Pa à ~ 10 kPa) (Candiello et al., 2013; Markert et al., 2013) ou bien de microgels à base du dérivé d'infernane de masse molaire moyenne intermédiaire EPS<sub>265</sub> en présence de calcium (2 à 7 kPa) (Cuenot et al., 2022; Zykwinska et al., 2022).

Aux temps longs, le solvant est redistribué à travers les pores du réseau de l'hydrogel et la contrainte imposée par le levier AFM est équilibrée par la pression élastique du réseau.

Sous ces conditions, la force mesurée à l'équilibre pour une indentation fixée  $\delta_0$  est (Hu et al., 2010) :

$$F_\infty = \frac{4}{3(1-\nu_\infty^2)} E \delta_0^{3/2} R^{1/2} \quad (15)$$

où  $\nu_\infty$  est le coefficient de Poisson à l'équilibre après son évolution au cours du temps en raison de l'écoulement du DMEM à travers le réseau poreux de l'hydrogel. Ce coefficient peut être calculé à partir du rapport entre la force instantanée  $F_0$  et la force à l'équilibre  $F_\infty$  à l'aide des équations 14 et 15 :

$$\frac{F_0}{F_\infty} = 2(1 - \nu_\infty) \quad (16)$$

Les valeurs moyennes de ce coefficient, reportées dans le Tableau XVI pour les différents hydrogels, sont comprises entre 0,35 et 0,4. Dans ces expériences, comme les hydrogels sont considérés initialement comme incompressibles,  $\nu_\infty$  mesure directement la variation de leur compressibilité. Il n'y a pas de différence significative dans la compressibilité entre les hydrogels d'EPS-p5 (Figure 80.A) et d'EPS-p20 (Figure 80.B).

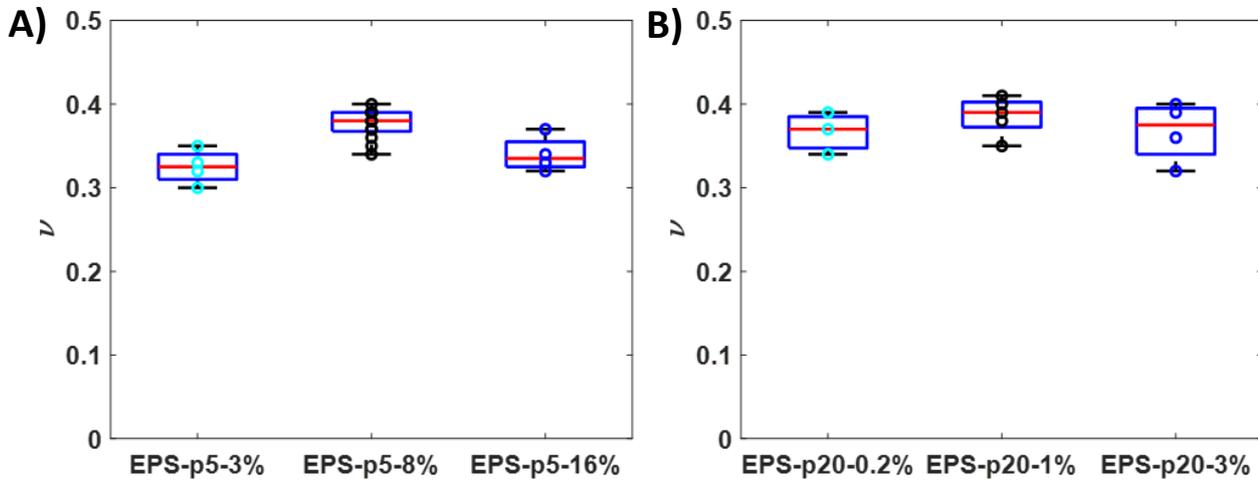


Figure 80. Valeurs du coefficient de Poisson pour les différents hydrogels A) d'EPS-p5 (10 % m/v PBS sauf l'EPS-p5-3%, 7 % m/v PBS) et B) d'EPS-p20 (10 % m/v PBS).

La théorie de la poroélasticité relie également la perméabilité de l'hydrogel  $K$  au coefficient de diffusion  $D$  par l'équation :

$$K = \frac{D\eta}{E} \frac{(1+\nu_\infty)(1-2\nu_\infty)}{(1-\nu_\infty)} \quad (17)$$

où  $\eta$  est la viscosité du solvant dans l'hydrogel. Dans notre cas, la viscosité du DMEM à 37 °C est de l'ordre de 0,73 mPa.s (Poon, 2022). Les valeurs des perméabilités des hydrogels calculées à partir des différentes grandeurs déterminées précédemment sont reportées dans le Tableau XVI. La perméabilité de l'hydrogel est directement reliée à la taille moyenne des pores du réseau formé par l'équation :

$$\xi = 2\sqrt{K} \quad (18)$$

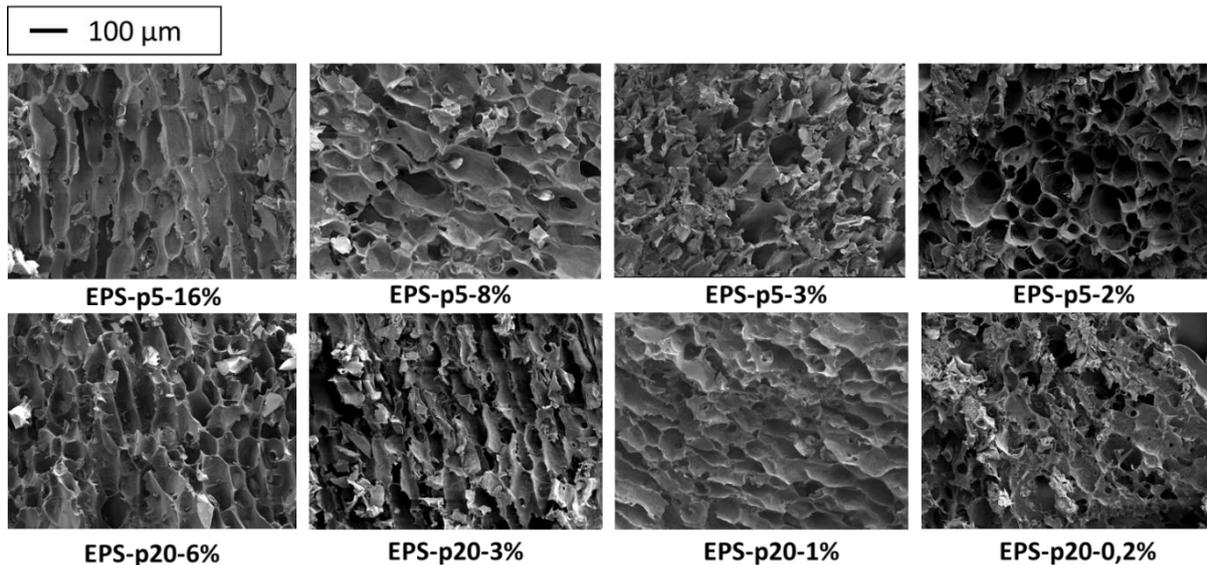
Il est donc possible d'estimer facilement la taille moyenne des pores des différents hydrogels en utilisant l'équation 19 (Chan et al., 2012) :

$$\xi = 2\sqrt{\frac{D\eta}{E} \frac{(1+\nu_{\infty})(1-2\nu_{\infty})}{(1-\nu_{\infty})}} \quad (19)$$

Les valeurs sont reportées dans le Tableau XVI et les tailles moyennes des pores calculées pour les différents hydrogels poroélastiques sont comprises entre 1 nm et 2 nm. Ces valeurs de porosité sont inférieures à celles estimées préalablement à l'aide de l'équation de Flory, qui étaient comprises entre 11 nm et 17 nm (équation 9, Tableau XV).

Contrairement à l'approche thermodynamique de la théorie de Flory (et plus généralement de Flory-Huggins), la description globale des différents hydrogels d'EPS-pNIPAM par la théorie de la poroélasticité, en décrivant notamment les courbes de relaxation mesurées, valide les valeurs obtenues. Cependant, même si un ordre de grandeur sépare les valeurs des tailles des pores déterminées par les deux théories, il est intéressant de relever que la porosité des hydrogels est nanométrique et qu'il n'y a pas de différences significatives entre les différents hydrogels. Pour des concentrations en polysaccharide proches des EPS-pNIPAM (de l'ordre de 2 % m/v), Akbarzadeh Solbu et al. (2022) ont également mesuré par topographie AFM des tailles de pores de l'ordre de 30 nm pour des hydrogels d'alginate (20 mM CaCO<sub>3</sub>), de même que Jayawardena et al. (2023) pour des hydrogels d'agarose (~ 100 nm). D'une manière générale, il est délicat de déterminer expérimentalement la taille des pores des hydrogels. Une méthode couramment utilisée est l'imagerie par microscopie électronique à balayage (MEB) mais des artéfacts liés à la cristallisation des molécules d'eau piégées dans l'hydrogel tendent à une grande surestimation de la taille des pores (~ 100 µm) imagés malgré

une congélation rapide (Figure 81, protocole en III.2.4) (Aston et al., 2016; Kaberova et al., 2020).



**Figure 81.** Images MEB de la structure des hydrogels lyophilisés d'EPS-p5 et d'EPS-p20 préparés à 10 % m/v PBS hormis les EPS-p5-3%/2% (7 % m/v PBS).

Les mesures AFM des hydrogels d'EPS-pNIPAM réalisées de 30 min à 2 h après gélification renseignent sur les propriétés mécaniques du microenvironnement cellulaire initial lors de l'application finale (test *in vitro* ou *in vivo* après injection dans le défaut à réparer). Au cours du temps, ces propriétés mécaniques et la porosité du réseau seront amenées à évoluer, notamment sous l'effet du gonflement des hydrogels (Subramani et al., 2020), et ce de manière différente en fonction de l'hydrogel considéré. En effet, tandis que les hydrogels les plus greffés seront relativement stables dû à leur réseau dense, les modules élastiques des hydrogels les moins greffés, qui présentent un taux de gonflement plus important, vont baisser car la porosité de leur réseau va augmenter. Dans un contexte *in vivo/in vitro*, d'autres phénomènes que le gonflement impacteront simultanément les propriétés mécaniques des hydrogels comme la réorganisation de l'hydrogel par les cellulesensemencées sécrétant la matrice néo-formée (Krishnamoorthy et al., 2019; Tian & Chen, 2014), amplifiée au cours du temps.

**Tableau XVI. Mesures par AFM en DMEM 30 min à 2 h après gélification. Les hydrogels sont préparés à 10 % m/v PBS hormis l'EPS-p5-3% (7 % m/v PBS). Valeurs du module élastique déterminé par les courbes de force ( $E_{HERTZ}$ ) et de relaxation ( $E$ ). Propriétés des hydrogels poroélastiques : coefficient de diffusion ( $D$ ), temps de relaxation ( $\tau$ ), coefficient de Poisson ( $\nu_{\infty}$ ), perméabilité ( $K$ ) et taille des pores ( $\xi$ ). Les valeurs avec des incertitudes proviennent des ajustements expérimentaux alors que les valeurs sans incertitudes sont issues de calculs à partir des valeurs moyennes.**

Hydrogel	$\langle E_{HERTZ} \rangle$ (kPa)	$\langle D \rangle$ ( $\mu\text{m}^2/\text{s}$ )	$\tau$ (s)	$\langle E \rangle$ (kPa)	$\nu_{\infty}$	$\kappa$ ( $\text{nm}^2$ )	$\xi$ (nm)
EPS-p5-16%	2,5 ± 0,3	3,5 ± 1,0	0,72	2,0 ± 0,4	0,35 ± 0,03	0,80	~ 1,8
EPS-p5-8%	3,5 ± 0,3	3,3 ± 1,0	0,74	3,5 ± 0,2	0,38 ± 0,02	0,38	~ 1,3
EPS-p5-3%	4,8 ± 0,9	3,4 ± 0,9	0,76	4,6 ± 0,4	0,33 ± 0,02	0,35	~ 1,2
EPS-p20-3%	3,7 ± 0,2	2,6 ± 0,9	0,96	3,6 ± 0,3	0,37 ± 0,04	0,30	~ 1,1
EPS-p20-1%	6,2 ± 0,4	4,8 ± 1,0	0,52	6,2 ± 0,6	0,39 ± 0,03	0,28	~ 1,0
EPS-p20-0,2%	4,3 ± 0,8	3,9 ± 0,7	0,64	4,6 ± 0,1	0,37 ± 0,03	0,35	~ 1,2

### 3.4. Evaluation de la cytotocompatibilité des hydrogels d'EPS greffés

L'objectif de cette partie consiste à évaluer la cytotocompatibilité des hydrogels d'EPS-pNIPAM obtenus en déterminant la viabilité des cellulesensemencées. Les résultats ont été corrélés à la composition ainsi qu'aux propriétés mécaniques des hydrogels (mesurées en AFM dans des conditions similaires) définies précédemment.

#### 3.4.1. Tests de désinfection/stérilisation des hydrogels d'EPS greffés

La stérilité est une exigence pour tout biomatériau destiné à être implanté ou à être en contact étroit avec des tissus vivants. En fonction des applications des hydrogels dans les domaines médicaux et pharmaceutiques, les exigences de l'Agence Européenne des Médicaments (EMA) doivent être prises en compte (EMA, 2018), ainsi que les instructions de la Pharmacopée Européenne (Pharmacopée européenne, 2017). Il existe plusieurs méthodes de stérilisation terminale bien établies pour les biomatériaux et les dispositifs médicaux. Les méthodes de stérilisation courantes comprennent le traitement thermique (à la vapeur (121 °C, 15 min) ou en chaleur sèche (160 °C, 2 h)), les rayonnements ionisants (dose 25 kGy), la stérilisation au gaz (plasma à haute fréquence tel que les vapeurs de peroxyde d'hydrogène) et la filtration stérilisante (0,22 µm), qui sont décrites dans la Pharmacopée Européenne (Pharmacopée européenne, 2017). À des fins réglementaires, la sécurité de la méthode de stérilisation est donnée par la probabilité statistique qu'un microorganisme survive au processus de stérilisation (niveau d'assurance de la stérilité, SAL). Une valeur de SAL  $\leq 10^{-6}$

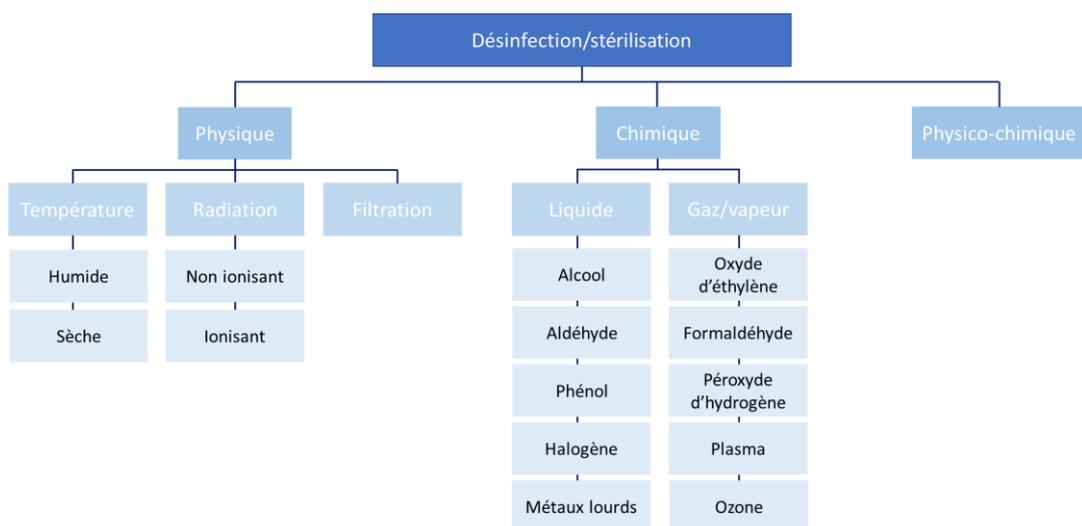


Figure 82. Exemples de méthodes de désinfection ou de stérilisation couramment utilisées dans le domaine médical (Galante et al., 2018).

doit être obtenue. Il est important de distinguer le terme désinfection de la stérilisation. La désinfection, contrairement à la stérilisation, permet d'éliminer/inactiver la plupart des microorganismes pathogènes, à l'exception des spores bactériennes (Galante et al., 2018). Cependant, bien que non reconnues par l'EMA, les méthodes de désinfection peuvent être employées en première approche sur les biomatériaux en développement pour la réalisation de tests préliminaires *in vitro* nécessaires à la démonstration d'un résultat ou la preuve de concept.

Dans le cas des hydrogels d'EPS greffés (en PBS) deux approches peuvent être envisagées : le traitement aseptique ou la désinfection/stérilisation terminale (S. A. Bento et al., 2023). Le traitement aseptique nécessite le traitement de l'EPS greffé lyophilisé en amont de sa solubilisation puis une solubilisation en condition aseptique avec du PBS stérile. En désinfection/stérilisation terminale, la solution d'EPS greffés (en PBS) est traitée dans sa formulation finale (concentration, contenant). Cette dernière stratégie est à prioriser afin d'éviter toutes manipulations supplémentaires. Parmi les techniques de désinfection/stérilisation possibles (Figure 82), 3 techniques accessibles au laboratoire ont été testées (Rogers, 2012; S. A. Bento et al., 2023).

- *La température* : la stérilisation thermique, notamment par chaleur humide, est la méthode de stérilisation la plus utilisée et recommandée (EMA, 2018; Pharmacopée européenne, 2017). Elle se déroule dans un autoclave, combinant des températures et une humidité élevée qui détruisent les composants métaboliques et structurels essentiels des cellules, tuant ainsi les microorganismes. Ce processus se produit généralement à une température de 121 °C pendant de courtes périodes, de 15 à 20 minutes. Ces conditions drastiques de température peuvent entraîner une altération des polymères en particulier des polysaccharides comme l'infernane (S. A. Bento et al., 2023). Des températures inférieures ont donc également été testées de (70 °C à 90 °C) pendant une durée de 15 à 60 minutes selon un processus assimilable à de la pasteurisation (non reconnu par l'EMA) (Rutala & Weber, 2016).
- *Le traitement par UV-C* : les longueurs d'onde comprises entre 200 et 280 nm sont considérées comme bactériostatiques voire bactéricides. L'ARN et l'ADN cellulaires absorbent les hauts niveaux d'énergie associés aux ondes courtes, principalement à

254 nm, de la lumière UV. Cette absorption d'énergie UV forme de nouvelles liaisons entre nucléotides adjacents, créant des doubles liaisons ou dimères. La formation de nombreux dimères bloque le processus de réplication (Kielbassa et al., 1997; Lindenauer & Darby, 1994). Cependant, les rayonnements UV sont peu pénétrants et certaines bactéries possèdent la capacité de réparer leur ADN après dommages (Gharbi et al., 2020). C'est pourquoi l'UV n'est pas reconnu par l'EMA en tant que techniques de stérilisation mais recommandé pour la désinfection de surface notamment en milieu hospitalier. Il peut néanmoins être testé quelques fois pour la décontamination de polymères ou d'hydrogels en première approche pour des tests *in vitro* (Hodder et al., 2019; Tan et al., 2012; Yap & Yang, 2020).

- *La filtration stérilisante (0,22  $\mu\text{m}$ )* : approuvée par l'EMA, elle permet d'exclure les bactéries et spores de tailles supérieures aux dimensions des pores de la membrane de filtration.

La sélection de la technique de désinfection/stérilisation des EPS greffés a été réalisée selon 2 critères. D'une part, aucun développement bactérien ne doit être observé après étalement sur boîte des solutions traitées : le milieu PCA a été utilisé pour le dénombrement de la flore mésophile aérobie totale, tandis que le milieu Zobell (milieu salin sélectif) a été utilisé pour évaluer l'absence de flore marine (*Alteromonas infernus*, dont est issu *infernane*, étant une bactérie marine). D'autre part, la technique employée ne doit pas altérer la composition et la structure des EPS greffés qui doivent par conséquent être étudiées après traitement. En effet, lors de précédents travaux, une modification de la masse molaire de la chaîne de l'*infernane* natif avait été démontrée par HPSEC-MALS-dRI après application de différentes techniques de stérilisation : rayonnement gamma ou beta (dose 15 kGy ou 25 kGy), plasma froid (CP, mélange de gaz composé d'O<sub>2</sub> (20 %) et de N<sub>2</sub> (80 %) pour 1 h) et oxyde d'éthylène (EtO, 700 mg/L, 250 min, 50 mbar, 45 °C à 45 % d'humidité) (Rederstorff et al., 2011a) (Figure 83). La stérilisation par EtO s'est avérée la moins dégradante pour l'EPS. Cependant, contrairement à l'EPS, il s'avère que la colonne d'HPSEC (Aquagel-OH) et/ou les conditions d'élution classiquement utilisées au laboratoire pour la caractérisation physico-chimique des EPS ne sont pas adaptées aux EPS greffés. En effet, leur faible recouvrement, inférieur à 10 %, semble être le signe d'une interaction entre les EPS greffés et la phase

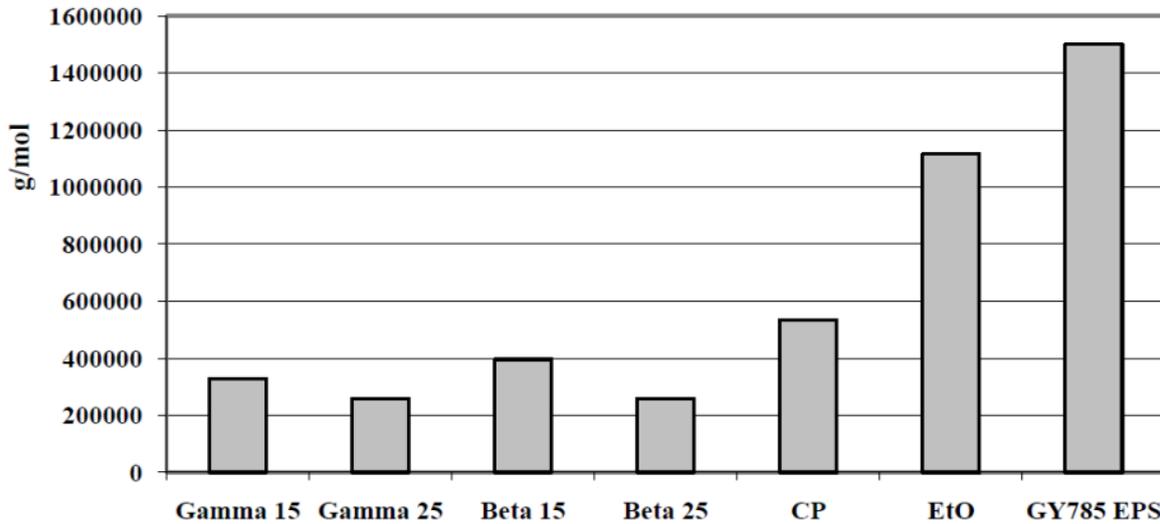


Figure 83. Masse molaire moyenne en poids ( $M_w$ ) (HPSEC-MALS-dRI) de l'EPS *infernane* (GY785) natif avant et après stérilisation, par rayonnement gamma ou beta (dose 15 kGy ou 25 kGy), par plasma froid (CP, mélange de gaz composé d'O<sub>2</sub> (20 %) et de N<sub>2</sub> (80 %) pour 1 h) et par oxyde d'éthylène (EtO, 700 mg/L, 250 min, 50 mbar, 45 °C à 45 % d'humidité) (Rederstorff et al., 2011a).

stationnaire de la colonne (justifiant leur analyse en FI-AF4 (II.3.2.1), plateforme TFFFC, Toulouse).

Ainsi, l'impact des techniques de désinfection/stérilisation sur les caractéristiques physico-chimiques (masse molaire moyenne en poids, rayon de giration, conformation) par HSPEC-MALS-dRI a été étudié sur l'EPS à une concentration similaire à celui de l'hydrogel d'EPS-p5-2% (7 % m/v), pour qui la concentration en EPS est la plus importante, soit ~ 2 % m/v. Les résultats ont été extrapolés aux EPS greffés.

Après 48 h à 30 °C sur milieu PCA (70 µL), les solutions d'EPS natif à 2 % m/v (eau) non stérilisées présentent un développement bactérien (Figure 84.A). L'objectif a donc été d'éliminer cette biocharge. L'efficacité des techniques de décontamination (désinfection ou stérilisation) sur les solutions d'EPS a été évaluée par l'absence de ces colonies après étalement sur boîte. Pour la décontamination par la température, une température minimale de 80 °C est nécessaire à l'élimination de la biocharge (Figure 84.B). À cette température, à minima 30 min de chauffage est requis, un temps de 15 min étant insuffisant (Figure 84.C). Les températures supérieures à 80 °C n'ont donné lieu à aucun développement bactérien pour les temps testés, même inférieurs à 30 min (Tableau XVII).

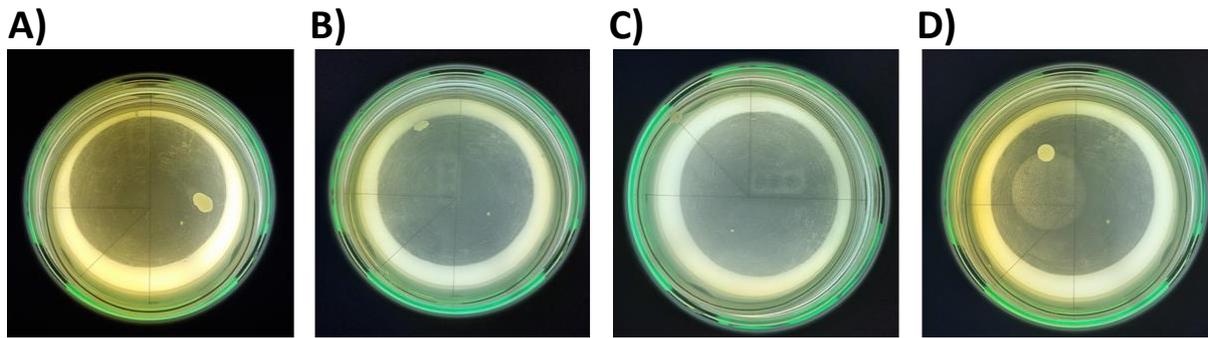


Figure 84. Évaluation de la biocharge sur milieu PCA (70 µL, 48 h, 30 °C) de l'EPS (2 % m/v eau) A) non stérilisé, B) après chauffage 70°C-60 min, C) après chauffage 80°C-15 min et D) après 14 cm UV-15 min.

Tableau XVII. Efficacité de la décontamination de l'EPS (2 % m/v eau) par chauffage et traitement UV-C. La croix rouge indique qu'un développement bactérien a été observé sur milieu PCA (70 µL, 48 h, 30 °C) présenté Figure 84, à l'inverse des conditions présentant un rond vert.

	Bain marie			Autoclave		UV-C	
	70 °C	80 °C	90 °C	105 °C	121 °C	5 cm	14 cm
5 min	-	-	-	-	○	-	-
15 min	-	✗	○	-	○	-	✗
18 min	-	-	-	○	-	-	-
30 min	-	○	○	-	-	○	○
60 min	✗	○	○	-	-	○	○

Pour la désinfection par UV-C, à chaque couple temps d'exposition (15 à 60 min)/distance de la lampe (5 ou 14 cm) correspond une dose d'UV reçu (équations 6 en III.2.6.1.1). Toutes les conditions de doses d'UV testées (8 550 à 266 400 J/m<sup>2</sup>) ont permis la désinfection de la solution d'EPS (Tableau XVII) hormis la dose 8 550 J/m<sup>2</sup> (condition 14 cm UV-C-15 min) (Figure 84.D). La dose d'UV et par conséquent le temps d'exposition (15 min) à 14 cm semble être insuffisant. La dose d'UV nécessaire pour réduire d'1 log (90 %) la biocharge est différente en fonction des bactéries. Elle est par exemple de 743 J/m<sup>2</sup> pour les spores de *Bacillus antracis* contre 55 J/m<sup>2</sup> pour *Escherichia coli* ("UV-C Dose Required to Kill Microorganisms," 2021). Bien que la dose appliquée en condition 14 cm UV-C-15 min (8 550 J/m<sup>2</sup>) soit bien supérieure, les valeurs décrites dans la littérature sont généralement définies pour une désinfection de surface (ou de l'air, hors décontamination de l'eau). Or, l'EPS est présent en solution et contenu dans un Eppendorf qui, bien qu'il soit en polypropylène (pas

d'absorbance dans le domaine UV), participe à la diminution de la dose réelle reçue par l'EPS. Lorsque la dose d'UV est insuffisante, des mécanismes de réparation de l'ADN peuvent également survenir à la lumière (photo-réparation) ou dans l'obscurité, par ailleurs favorisés à une température de 30 °C (celle de l'incubateur) (Gharbi et al., 2020). Malgré cela, les doses supérieures testées ( $> 17\ 100\ \text{J/m}^2$ ) permettent la désinfection de la solution dans le contenant provisoire, ce qui est un avantage.

Pour la filtration à 0,22  $\mu\text{m}$  de l'EPS, le filtrat obtenu a été lyophilisé. 93 % de la masse d'EPS initialement filtrée ont été récupérés puis l'EPS stérilisé obtenu a été préparé en condition aseptique à 2 % m/v (eau). Aucune colonie n'a alors été observée après étalement. A l'inverse des deux techniques précédentes, l'EPS natif de haute masse molaire doit être filtré de manière séquentielle (0,7  $\mu\text{m}$  puis 0,45  $\mu\text{m}$  puis 0,22  $\mu\text{m}$ ) en régime dilué ( $< 0,1\ \%$  m/v). Ceci requiert une étape de lyophilisation supplémentaire puis de préparation de la solution finale.

Afin d'évaluer l'impact de ces techniques sur les chaînes d'EPS, les solutions décontaminées (○ et filtration à 0,22  $\mu\text{m}$ , Tableau XVII) ont été diluées à 0,2 % m/v (eau) et étudiées en HPSEC-MALS-dRI en comparaison de l'EPS non stérilisé (Mw 954 000 g/mol, Rg 96 nm) (Figure 85). On remarque qu'à 80°C-30 min, la masse molaire moyenne de la chaîne d'EPS est relativement conservée (Mw 922 000 g/mol, Rg 92 nm) puis diminue à partir de 60 min (849 000 g/mol, Rg 85 nm). A 90 °C, cette diminution est observée dès 30 min (Mw 859 000 g/mol, Rg 86 nm). Ceci est d'autant plus marqué avec l'augmentation de la température, à 105°C-18 min (Mw 726 000 g/mol, Rg 73 nm) et encore davantage à 121 °C, que ce soit pour 5 ou 15 min ( $\sim$  Mw 400 000 g/mol) de traitement. Le rayon de giration est alors fortement réduit (45 nm). Ainsi, un temps de chauffage ( $> 30$  min) mais surtout une température trop importante ( $> 90\ \text{°C}$ ) conduisent à une dégradation notable de la chaîne d'EPS. Des résultats similaires ont été observés pour l'autoclave de polysaccharide tel que la pectine (Munarin et al., 2013). Seules les conditions en température 80°C-30 min et 90°C-15 min semblent relativement conserver l'intégrité de la chaîne d'EPS (Mw et Rg).

Pour le traitement UV, on remarque une diminution de la masse molaire moyenne de la chaîne d'EPS avec la dose d'UV reçue (de 17 100 à 266 400  $\text{J/m}^2$ ) liée à l'augmentation du temps d'exposition (60 min vis-à-vis de 30 min) et/ou de l'irradiance (5 cm vis-à-vis de 14 cm) à l'origine de la photo-dégradation du polysaccharide (Kasaai, 2004). La condition 14 cm UV-

30 min (dose UV ~ 17 100 J/m<sup>2</sup>) est ainsi la moins dénaturante pour la chaîne d'EPS (Mw 880 000 g/mol, Rg 88 nm).

Enfin, la filtration à 0,22 µm n'entraîne pas de modification de la masse molaire moyenne de l'EPS (Mw 945 000 g/mol, Rg 96 nm). En revanche le coefficient hydrodynamique  $\nu$  calculé à partir de la pente du tracé log-log du Rg en fonction de la masse molaire moyenne Mw indique une modification de la conformation moléculaire de la pelote statistique certainement induite par la pression exercée lors de la filtration ( $\nu = 0,46$  contre ~ 0,64 pour l'EPS non stérilisé et les autres conditions) (Figure 87).

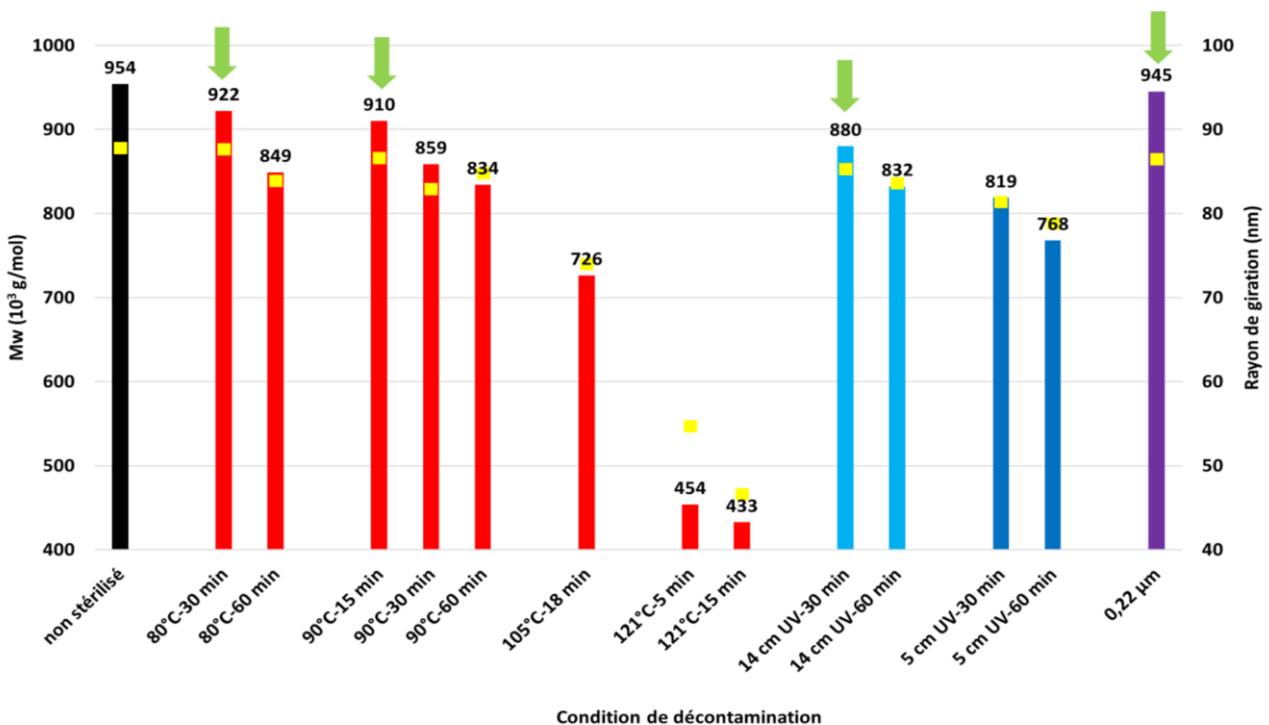


Figure 85. Masse molaire moyenne en poids (Mw) et rayon de giration (Rg) de l'EPS natif (0,2 % m/v) avant (en noir) ou après application des conditions de décontamination par chauffage (en rouge), par UV-C (en bleu) et par filtration à 0,22 µm (en violet). Les flèches vertes indiquent les conditions sélectionnées et testées par la suite sur l'EPS-p5-8%.

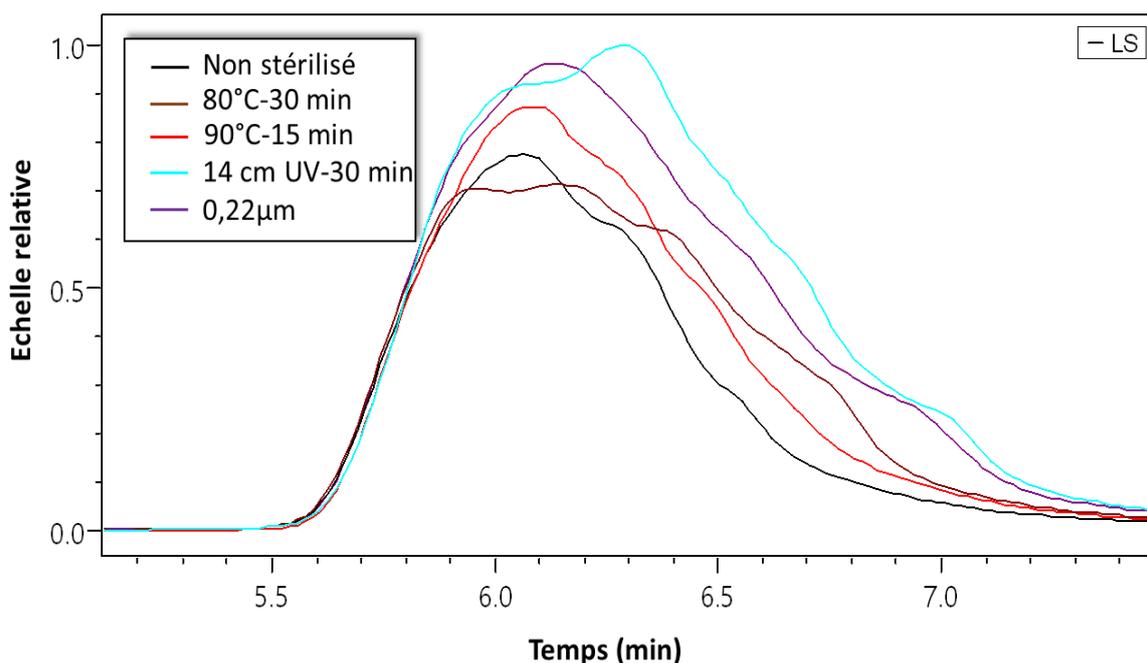


Figure 86. Chromatogrammes HPSEC-MALS de l'EPS natif (0,2 % m/v) après décontamination par les 4 conditions les moins dénaturantes en termes de Mw et Rg.

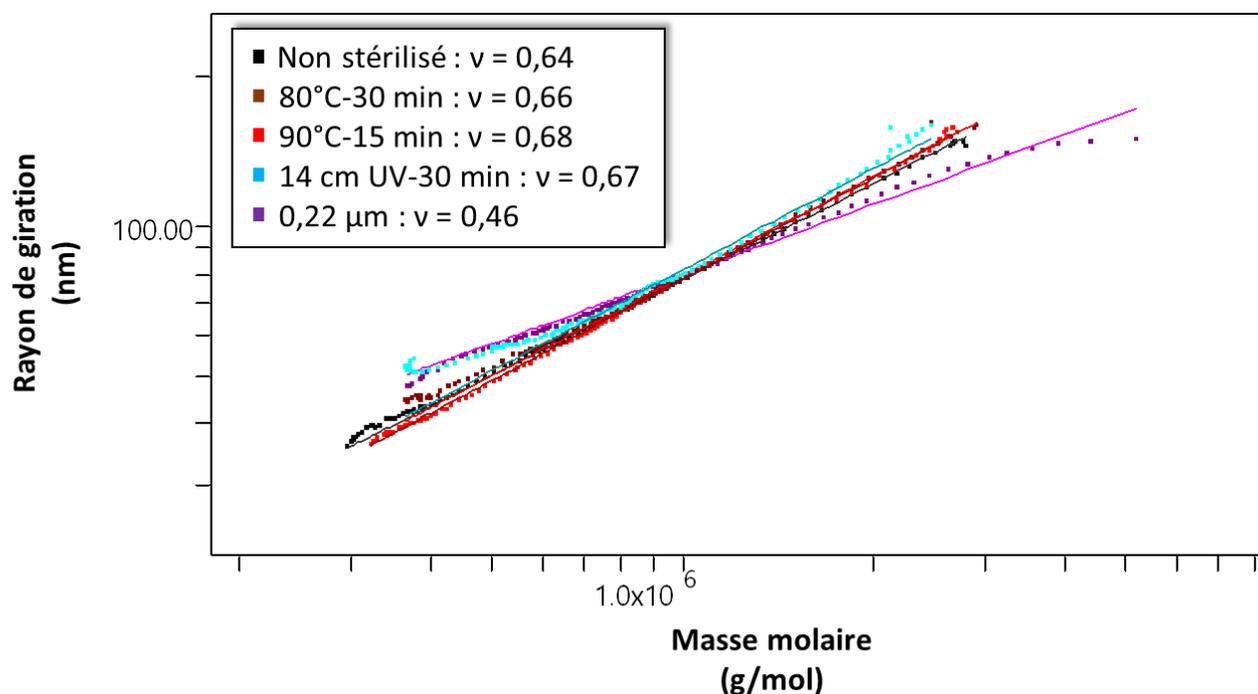
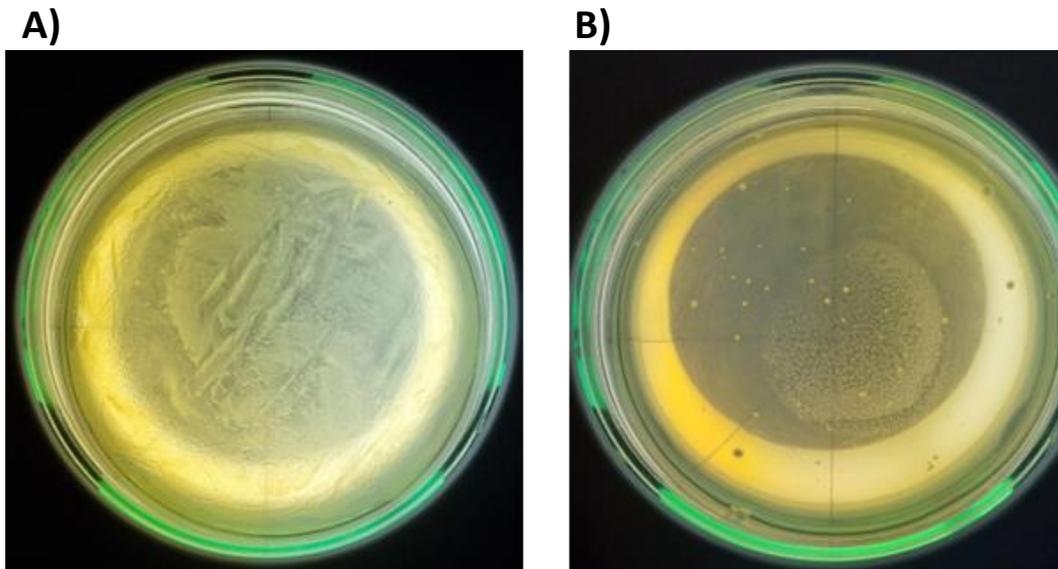


Figure 87. Coefficients hydrodynamiques  $v$  calculés à partir de la pente du tracé log-log du rayon de giration ( $R_g$ ) en fonction de la masse molaire moyenne en poids ( $M_w$ ) obtenus en HPSEC-MALS-dRI pour l'EPS natif (0,2 % m/v) après décontamination par les 4 conditions les moins dénaturantes en termes de Mw et Rg.

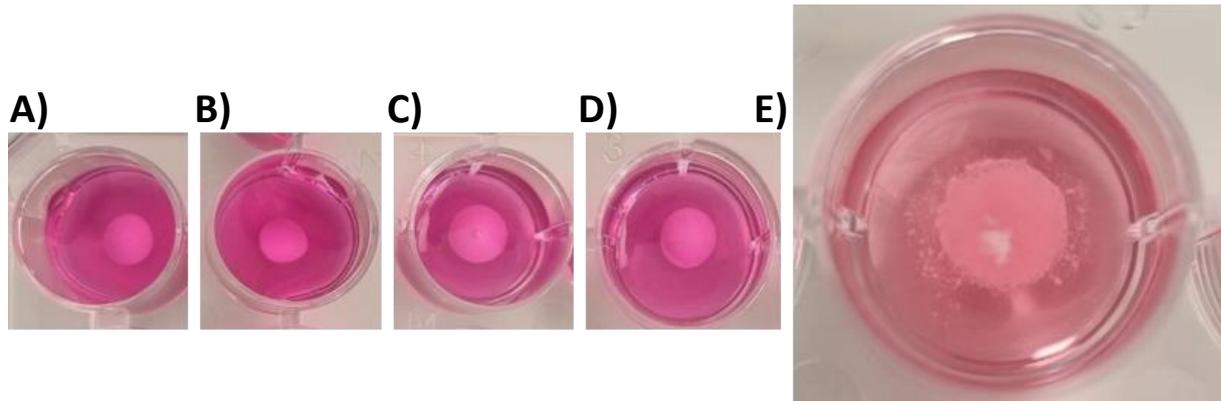
À l'issue de cette approche portant sur l'EPS, 4 conditions (↓, Figure 85 et Figure 86) permettant la décontamination et la préservation des caractéristiques physico-chimiques de la chaîne polysaccharidique native ont été testées sur l'EPS-p5-8% : 80°C-30 min, 90°C-15 min, 14 cm UV-30 min et filtration à 0,22  $\mu\text{m}$ . L'objectif étant de valider l'efficacité de la décontamination sur un EPS greffé à sa concentration finale en tampon PBS pour 7 jours et évaluer l'impact des techniques de décontamination sur la gélification de l'EPS-greffé.

À l'image de l'EPS seul (2 % m/v eau) non stérilisé, l'EPS-p5-8% (10 % m/v PBS, soit 1,4 % m/v en EPS) non stérilisé présente une charge bactérienne (Figure 88.A). Après chauffage 80°C-30 min et 90°C-15 min ou filtration à 0,22  $\mu\text{m}$ , aucune colonie n'a été observée 48 h et après 7 jours (30 °C, PCA), indiquant une décontamination réussie. Pour la condition 14 cm UV-30 min, quelques colonies ont été observées dès 48 h (Figure 88.B). L'arrêt de la lampe à 15 min (exceptionnellement pour la réalisation d'un test intermédiaire) a pu impacter l'efficacité de la désinfection.



**Figure 88.** Évaluation de la biocharge sur milieu PCA (70  $\mu\text{L}$ , 48 h, 30 °C) de l'EPS-p5-8% (10 % m/v PBS) A) non stérilisé et B) après traitement 14 cm UV-30 min.

Testées selon le protocole défini en III.2.1, les conditions de décontamination n'ont pas impacté la gélification de l'hydrogel d'EPS-p5-8% et sa stabilité pendant 7 jours hormis la filtration à 0,22  $\mu\text{m}$  (Figure 89). En effet, l'hydrogel issu de la filtration de l'EPS greffé à 0,22  $\mu\text{m}$ , se désintègre très rapidement après ajout du milieu DMEM. Une différence notable entre la filtration de l'EPS natif ou greffé peut expliquer ce résultat. La filtration à 0,22  $\mu\text{m}$  de l'EPS



**Figure 89.** Aspect de l'hydrogel d'EPS-p5-8% (30 µL, 10 % m/v PBS, 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, humidité contrôlée), A) non stérilisé B) après chauffage 80°C-30 min C) après chauffage 90°C-15 min, D) après traitement 14 cm UV-C-30 min et E) après filtration à 0,22 µm.

greffé présentait un recouvrement (masse de filtrat lyophilisé récupérée) de 60 % contrairement à l'EPS natif (93 %). De plus, la filtration était extrêmement ralentie en comparaison de l'EPS natif et a nécessité de multiples changements de filtres. Après lyophilisation du filtrat, la solution préparée à 10 % m/v était beaucoup plus liquide que celles issues des autres techniques de décontamination. Or, les EPS greffés sont caractérisés par l'établissement d'interactions inter-chaînes entraînant la formation d'agrégats de masse molaire moyenne bien supérieure à celle de l'EPS natif (10<sup>9</sup> g/mol, Rg 0,5 µm, résultats FI-AF4-MALS-dRI, II.3.2.1). Leur passage à travers la membrane semble fortement limité au vu de la diminution du recouvrement, pouvant entraîner une filtration sélective des plus petites chaînes d'EPS greffés participant à la diminution de la viscosité de la solution. De plus, la pression engendrée a pu dénaturer les agrégats des chaînes d'EPS greffés pouvant également justifier cette observation. La non-gélification des EPS greffés est également observée suite à une filtration à 0,45 µm. A l'inverse, une filtration à 0,7 µm permet certes une filtration aisée et sans altération de la gélification de l'EPS-p5-8% (taille de pores supérieure à son Rg), mais la décontamination n'est pas efficace à cette porosité.

Ainsi, parmi les techniques testées sur l'EPS greffé EPS-p5-8%, seules les conditions de chauffage 80°C-30 min et 90°C-15 min ont permis à la fois la décontamination de l'hydrogel d'EPS-p5-8% et le maintien de sa gélification. La condition 80°C-30 min étant la moins dénaturante pour l'EPS natif (Mw 922 000 g/mol, Rg 92 nm, Figure 85), elle a donc été sélectionnée et testée sur l'ensemble des hydrogels d'EPS-p5 et d'EPS-p20. La température de désinfection (80°C) étant supérieure à la LCST des hydrogels des EPS greffés, une gélification

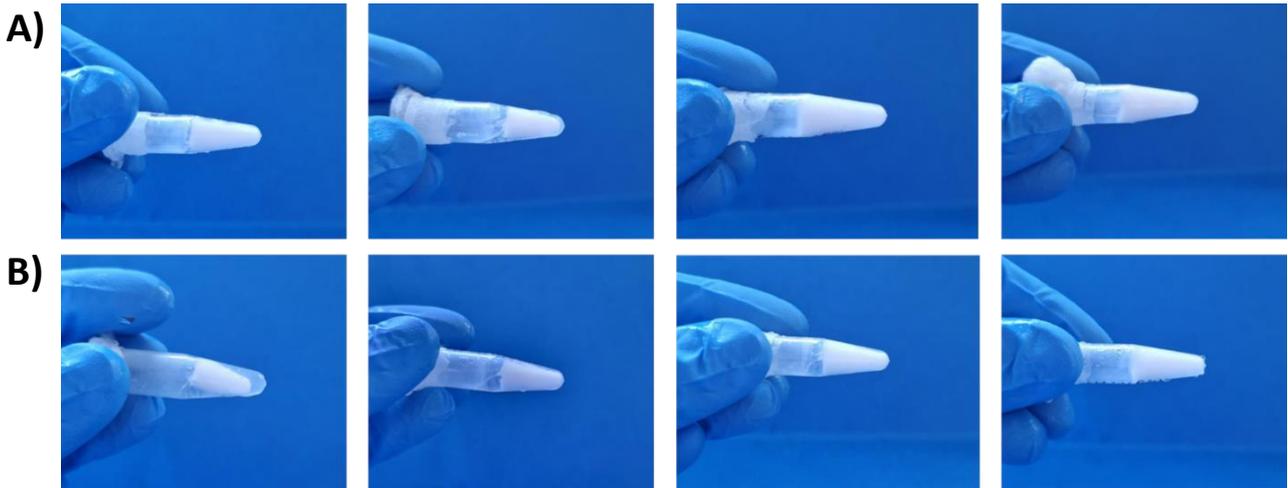


Figure 90. Aspect des solutions d'EPS greffés après chauffage 80°C-30 min. A) De gauche à droite : EPS-p5-16 %, EPS-p5-8% (10 % m/v PBS), EPS-p5-3% et EPS-p5-2% (7 % m/v PBS), B) de gauche à droite : EPS-p20-6%, EPS-p20-3%, EPS-p20-1% et EPS-p20-0,2% (10 % m/v PBS).

des solutions est observée au terme du chauffage (Figure 90). Elles retrouvent néanmoins leur aspect initial (Figure 59) après refroidissement, la transition sol-gel étant réversible. Évaluées sur 7 jours sur milieu PCA et Zobell (70  $\mu$ L, 30°C), aucune colonie ne s'est développée. De plus, le test de gélification des solutions d'EPS greffés désinfectées s'est avéré positif (Figure 91). La technique de désinfection par chauffage 80°C-30 min a donc été sélectionnée afin de décontaminer les hydrogels d'EPS greffés avant les tests *in vitro*.

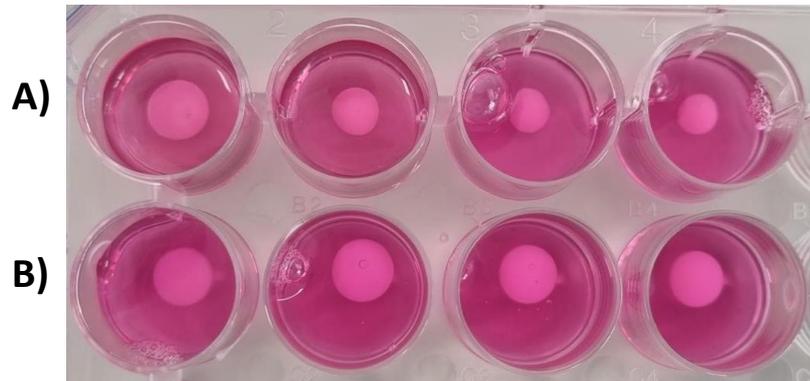


Figure 91. Aspect des hydrogels d'EPS greffés (30  $\mu$ L, 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, humidité contrôlée) après désinfection 80°C-30 min observés après 7 jours d'incubation. A) De gauche à droite : EPS-p5-16 %, EPS-p5-8% (10 % m/v PBS), EPS-p5-3% et EPS-p5-2% (7 % m/v PBS). B) De gauche à droite : EPS-p20-6%, EPS-p20-3%, EPS-p20-1% et EPS-p20-0,2% (10 % m/v PBS).

### 3.4.2. Ensemencement de cellules HEK293 dans un hydrogel de Cultrex et mise en place du test de viabilité *in vitro*

Une étape préliminaire à l'évaluation de la cytocompatibilité des hydrogels d'EPS-pNIPAM a été la sélection des cellules à ensemercer et la mise en place du protocole de viabilité sur un hydrogel de référence pour la culture cellulaire *in vitro*.

#### *Sélection des cellules*

Les cellules de rein embryonnaire humain (HEK293) sont à l'origine d'une lignée cellulaire (Graham et al., 1977), couramment utilisée pour la recherche biopharmaceutique et médicale fondamentale. Les cellules HEK293 présentent une morphologie épithéliale et sont de nature adhérente (Figure 92.A), mais elles peuvent également être adaptées pour une croissance en suspension (Figure 92.B).

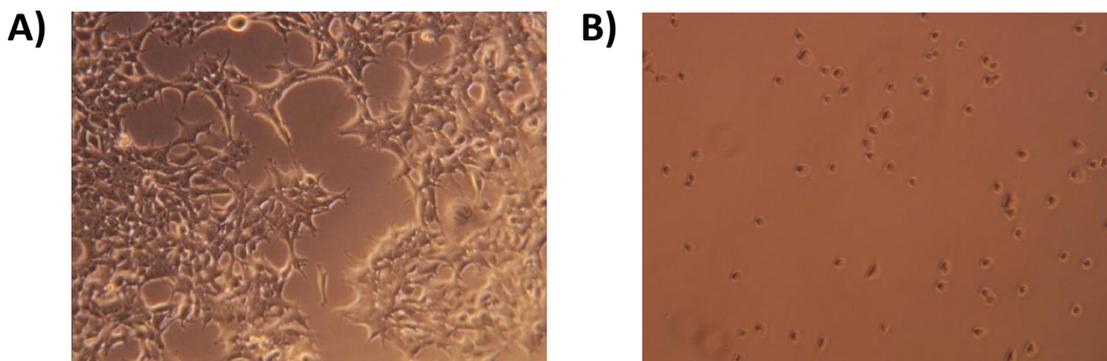


Figure 92. Observation au microscope optique de l'aspect des cellules HEK293 FT adhérente ou en suspension (Gx10).

À ce jour, différentes lignées des cellules HEK293 ont été établies (HEK293 T/HEK293 FT/HEK293 S...) (Abaandou et al., 2021). Les cellules HEK293 T sont dérivées de cellules HEK293 exprimant l'antigène T du virus simien 40 (Iuchi et al., 2020). HEK293 FT est une variante à croissance rapide du HEK293 T et adaptée aux milieux commerciaux. L'efficacité élevée de la transfection des cellules HEK293 permet la production de protéines ou de virus exogènes à des fins de recherches pharmaceutiques et biomédicales (Yuan et al., 2018).

Les cellules HEK293 sont intéressantes pour la réalisation de tests de viabilité pour différentes raisons : 1) D'une part, elles sont d'origine humaine contrairement aux cellules CHO (lignée issue d'ovaires de hamster de chine) très utilisées en biotechnologie. 2) D'autres part, elles sont robustes, très faciles à cultiver et à entretenir de manière reproductible

contrairement aux cellules primaires telles que les chondrocytes (Yuan et al., 2018). La variation de la viabilité cellulaire mesurée sera aisément corrélée à l'impact du paramètre testé contrairement à des cellules qui par elles-mêmes présenteraient des difficultés à proliférer. 3) Enfin, le nombre de cellules HEK293 double assez rapidement, toutes les 30 heures environ (Abaandou et al., 2021). Une durée de test *in vitro* de 7 jours suffira à évaluer la viabilité de ces cellules de manière significative.

De nombreuses études ont eu recours aux cellules HEK293 pour l'évaluation de la viabilité/cytotoxicité 2D ou après ensemencement dans des hydrogels de pNIPAM (Capella et al., 2019; Hu et al., 2022; Li et al., 2021; Su et al., 2020). Ainsi pour notre étude, des cellules HEK293 FT disponibles au laboratoire ont été utilisées. Pour la suite du mémoire, elles seront simplement nommées HEK293.

#### Sélection du test de viabilité

La viabilité cellulaire peut être évaluée selon différents critères. L'intégrité de la membrane plasmique, la synthèse d'ADN, l'activité enzymatique et la présence d'ATP sont des indicateurs connus de la viabilité des cellules. L'AlamarBlue est un réactif qui détecte les cellules métaboliquement actives, utilisé pour l'analyse quantitative de la viabilité et dans une certaine mesure de la prolifération cellulaire. Lorsqu'il est ajouté aux cellules, le réactif est modifié par l'environnement réducteur (mitochondrie, cytochrome principalement) des cellules viables (Rampersad, 2012). Le colorant sous sa forme oxydée (résazurine) est de couleur bleue et faiblement fluorescent. Les cellules en croissance provoquent une réduction chimique du colorant AlamarBlue du bleu non fluorescent en rose fluorescent (résorufine) (Figure 93).

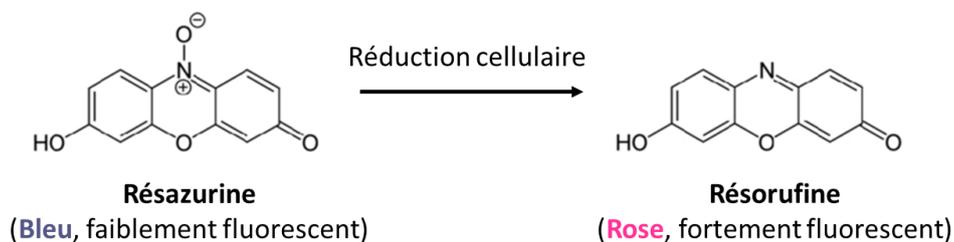


Figure 93. Principe du test AlamarBlue permettant l'évaluation de la viabilité cellulaire.

Le test AlamarBlue présente de nombreux avantages par rapport à d'autres tests de viabilité cellulaire basés sur l'activité métabolique tels que le MTT (Longhin et al., 2022).

1) Soluble dans l'eau, la résorufine est libérée dans le milieu de culture contrairement aux cristaux de formazan issu du test MTT. 2) Les cellules utilisées pour le MTT seront ainsi détruites lors de l'étape de solubilisation, tandis que les cellules utilisées pour le test AlamarBlue pourront être réutilisées. 3) Le test AlamarBlue est non toxique, tandis que le MTT serait lui-même cytotoxique (Ghasemi et al., 2021). 4) Enfin, le test AlamarBlue semble plus sensible à la détection de la cytotoxicité que le test MTT (Hamid et al., 2004).

Ainsi, le test AlamarBlue a été utilisé pour le suivi de la viabilité cellulaire de cellules HEK293 ensemencées.

#### *Sélection d'un hydrogel de référence*

Afin de mettre en place le protocole d'ensemencement et la mesure de la viabilité des cellules HEK293, un hydrogel de référence pour la culture cellulaire *in vitro* a été utilisé. L'extrait de membrane basale (BME) Cultrex, similaire au Matrigel plus connu, est une forme soluble de membrane basale purifiée à partir d'une tumeur d'Engelbreth-Holm-Swarm. Les principaux composants du Cultrex sont la laminine, le collagène IV, l'entactine (nidogène) et les protéoglycanes à héparane sulfate (perlécane). Thermosensible, cet extrait de BME gélifie à des températures comprises entre 22 et 37 °C (Aisenbrey & Murphy, 2020). Le collagène de type IV et la laminine majoritairement entraînent la formation d'un hydrogel dont l'architecture en double réseau est stabilisée par des ponts non-covalents d'entactine (Cheng et al., 1997). Les composants du Cultrex sont biologiquement actifs en favorisant l'adhésion, la croissance, la migration, l'invasion et la différenciation cellulaire (Arnaoutova et al., 2012). La plupart des composants majeurs du Cultrex interagissent *via* de multiples classes de récepteurs à la surface cellulaire notamment les récepteurs des intégrines dont sont pourvus les cellules HEK293 (Yarwood & Woodgett, 2001). La présence de différentes familles de facteurs de croissance (IGF-1, TFG- $\beta$ , EGF, VEGF...), dont la biodisponibilité est régulée par les perlécane et le collagène IV, complète la formulation du Cultrex (Arnaoutova et al., 2012).

Ainsi, cette composition complexe fournit un environnement favorable au développement cellulaire, pertinent pour l'utilisation du Cultrex en tant que témoin positif pour l'ensemencement de cellules HEK293 et la mise en place des conditions du test *in vitro*. L'objectif était de définir la concentration cellulaire initiale de travail, valider les conditions du test AlamarBlue ainsi que le nombre de jours de mesure de la viabilité.

#### 3.4.2.1. Mise en place du protocole de viabilité cellulaire

Le volume de Cultrex utilisé a été fixé à 30  $\mu$ L. Quatre concentrations cellulaires initiales (de  $0,1 \times 10^6$  cell/mL à  $3 \times 10^6$  cell/mL) ont été testées et préparées à partir de cellules issues de passage cellulaire numéro 10 et numéro 14 à deux semaines d'intervalle (voir III.2.6.2). L'ensemencement des cellules dans le Cultrex a été réalisé selon le protocole défini en III.2.6.3.1. L'évaluation de la viabilité cellulaire a été réalisée par le test AlamarBlue, 2 jours (J2), 3 jours (J3), 4 jours (J4) et 7 jours (J7) après ensemencement (J0). La concentration en AlamarBlue et la durée du test de viabilité ont été fixées à 20 % v/v DMEM (500  $\mu$ L) et 5 h respectivement.

La viabilité cellulaire peut être corrélée au changement de couleur du réactif (bleu à rose, Figure 57.B) réduit par le métabolisme cellulaire mais le suivi de la fluorescence, plus sensible, a été privilégié (excitation à 560 nm et émission à 590 nm) (Figure 94). On remarque que pour toutes les concentrations cellulaires initiales testées (hormis  $0,1 \times 10^6$  cell/mL), la fluorescence augmente au cours des jours démontrant, d'une part un ensemencement réussi des cellules HEK293 au sein du Cultrex et d'autre part que les conditions du test AlamarBlue (20% v/v DMEM, durée du test de 5 h) permettent une évaluation de la réponse dès les premiers jours de mesure. La fluorescence est d'autant plus importante que la concentration initiale en cellule est grande. Les cellules qui se multiplient forment des sphéroïdes dont le nombre et la taille augmentent au cours des jours (Figure 95).

La condition  $0,1 \times 10^6$  cell/mL se développe difficilement. La réponse à J2 (plus faible que les autres conditions, le nombre initial de cellules étant moins important) n'augmente pas jusqu'à J4, puis très légèrement à J7. La concentration cellulaire initiale de  $0,1 \times 10^6$  cell/mL semble être insuffisante (du moins pour une étude *in vitro* significative sur 7 jours), la communication intercellulaire jouant un rôle important sur la croissance cellulaire, une densité cellulaire minimale est nécessaire pour une vitesse de croissance optimale.

Pour la condition  $3 \times 10^6$  cell/mL, la fluorescence semble se stabiliser dès J4 contrairement aux conditions  $0,3 \times 10^6$  cell/mL et  $1 \times 10^6$  cell/mL, pour lesquelles elle est multipliée par au moins 2 entre J4 et J7. La fluorescence à J7 de la condition  $1 \times 10^6$  cell/mL est ainsi relativement proche de celle de la condition  $3 \times 10^6$  cell/mL. Il est possible d'envisager que l'entièreté de l'AlamarBlue soit réduite par le nombre de cellules atteintes à J7 pour cette

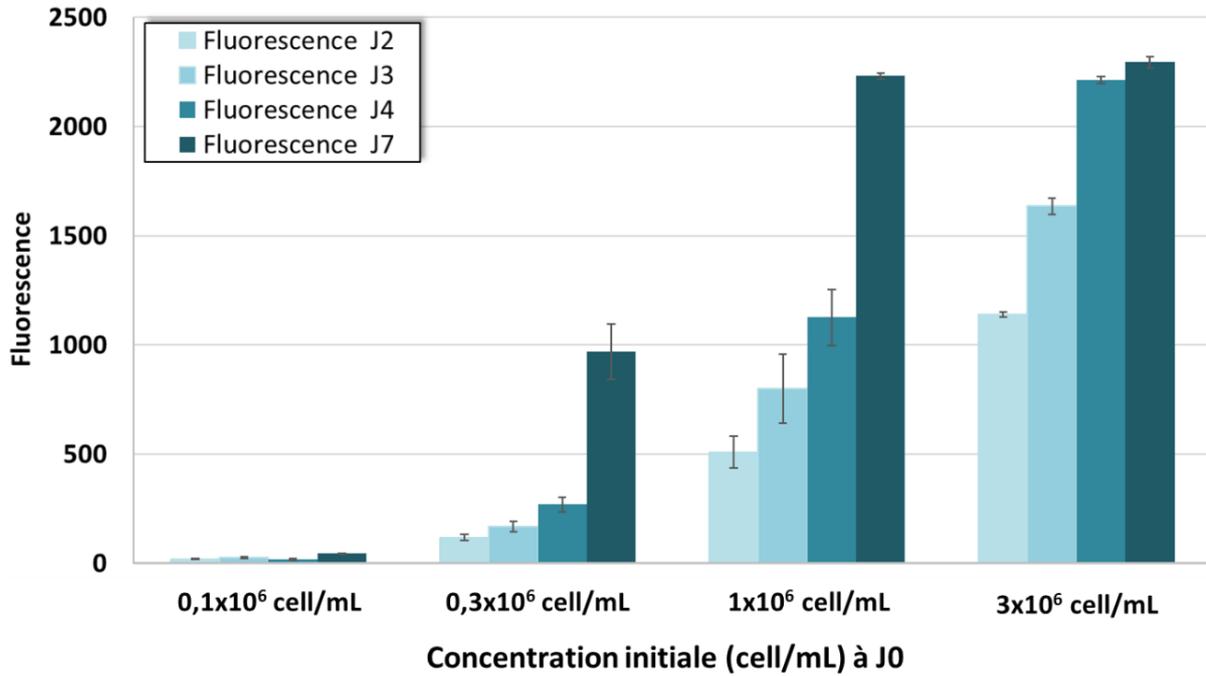


Figure 94. Evolution de la fluorescence (test AlamarBlue, 20 % v/v DMEM, 5h, 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, humidité contrôlée, ex : 560 nm/em : 590 nm) de différentes concentrations initiales de cellules HEK293 ensemencées dans le Cultrex (30 µL) au cours des jours.

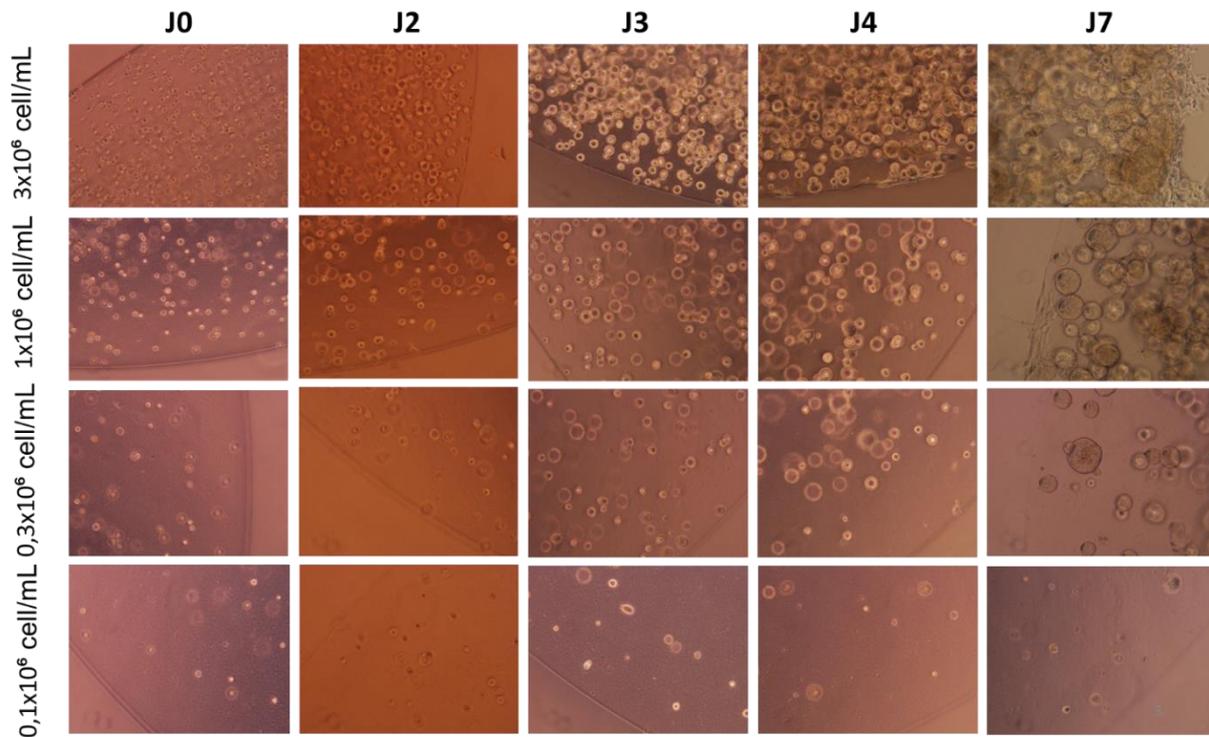


Figure 95. Observation au microscope optique à température ambiante des cellules HEK293 ensemencées à différentes concentrations initiales dans le Cultrex (30 µL) de J0 à J7 (Gx10).

condition (saturation du test métabolique). À l'image des sphéroïdes tumorales, les sphéroïdes HEK293 peuvent être composées de cellules à différents stades (proliférantes, quiescentes, et nécrotiques) de la surface au cœur du sphéroïde, corrélés aux gradients (décroissant) en oxygène/nutriments et (croissant) en lactate (Debruyne et al., 2023). Il est donc également possible d'envisager qu'une taille critique des sphéroïdes soit atteinte dans lesquelles une proportion plus grande en cellules quiescentes/nécrotiques vis-à-vis des cellules prolifératives entraînerait une stagnation de la réponse de la viabilité pour la condition  $3 \times 10^6$  cell/mL (saturation de la culture). Quoiqu'il en soit, cette concentration initiale en cellules ne permet pas un suivi sur 7 jours.

Ainsi, une concentration cellulaire initiale comprise entre  $0,3 \times 10^6$  cell/mL et  $1 \times 10^6$  cell/mL semble être optimale, dans les conditions de notre test, l'augmentation de la fluorescence étant continue de J2 à J7. Le Cultrex est un hydrogel témoin formulé pour la culture cellulaire *in vitro*. On peut donc s'attendre à ce que la viabilité cellulaire soit moindre dans les hydrogels d'EPS greffés. La condition initiale de  $1 \times 10^6$  cell/mL a donc été favorisée présentant une réponse plus importante, notamment aux premiers jours de mesure. La fluorescence étant significativement différente entre J3 et J7, la mesure de la viabilité cellulaire des cellules HEK293ensemencées dans les hydrogels d'EPS greffés a été réalisée uniquement à ces 2 jours.

#### 3.4.2.2. Optimisations du protocole de viabilité cellulaire

La concentration cellulaire initiale et les conditions du test de viabilité (concentration en réactif, durée du test et le nombre de jours de mesure) ont été validées sur les cellules HEK293 ensemencées au sein du Cultrex. Quelques optimisations de la procédure ont également été appliquées pour l'évaluation de la viabilité des cellules au sein des hydrogels d'EPS greffés (III.2.6.3.2).

La mesure de viabilité cellulaire par le test AlamarBlue repose sur la réduction de la résazurine en résorufine par le métabolisme cellulaire. Les cellules étant ensemencées dans un hydrogel, la résazurine doit dans un premier temps diffuser à l'intérieur de l'hydrogel puis inversement en ce qui concerne la résorufine. Les hydrogels d'EPS greffés présentant une composition différente, le pourcentage ou bien la cinétique de diffusion de la résazurine/résorufine pourraient être impactés et donc influencer sur les résultats du test de viabilité. Afin d'éviter ce biais, les hydrogels d'EPS greffés ont été ramenés à la température ambiante (transition gel-sol) et les cellules qu'ils contiennent ont été ensuite mises en suspension en présence d'AlamarBlue. Ceci a permis également de s'affranchir des rinçages des hydrogels nécessaires à l'élimination de l'AlamarBlue résiduel séquestré au sein de l'hydrogel (observé dans le cas du Cultrex Figure 57.C) qui pourrait être responsable d'une surestimation de la fluorescence au jour suivant la première mesure.

#### 3.4.3. Ensemencement de cellules HEK293 dans les gels d'EPS-pNIPAM et mesure de la viabilité cellulaire

L'ensemencement des cellules HEK293 dans les hydrogels d'EPS greffés (préalablement désinfectés à 80 °C, 30 min) a été réalisé suivant le protocole établi à partir du Cultrex, utilisé en tant que témoin positif. Après gélification 1 h à 37 °C (Figure 96. J0-A), les hydrogels ont été recouverts par 1 mL de milieu de culture. La mesure de la viabilité a été réalisée à J3 et J7 (Figure 96. J3-B et J7-D). Pour ce faire le milieu de culture a dans un premier temps été prélevé (Figure 96. J3-B' et J7-D') puis le réactif AlamarBlue a été déposé (400 µL, 20 % v/v DMEM) à température ambiante. Après 5h, un changement de couleur (Figure 96. J3-B'' et J7-D'') a été observé.

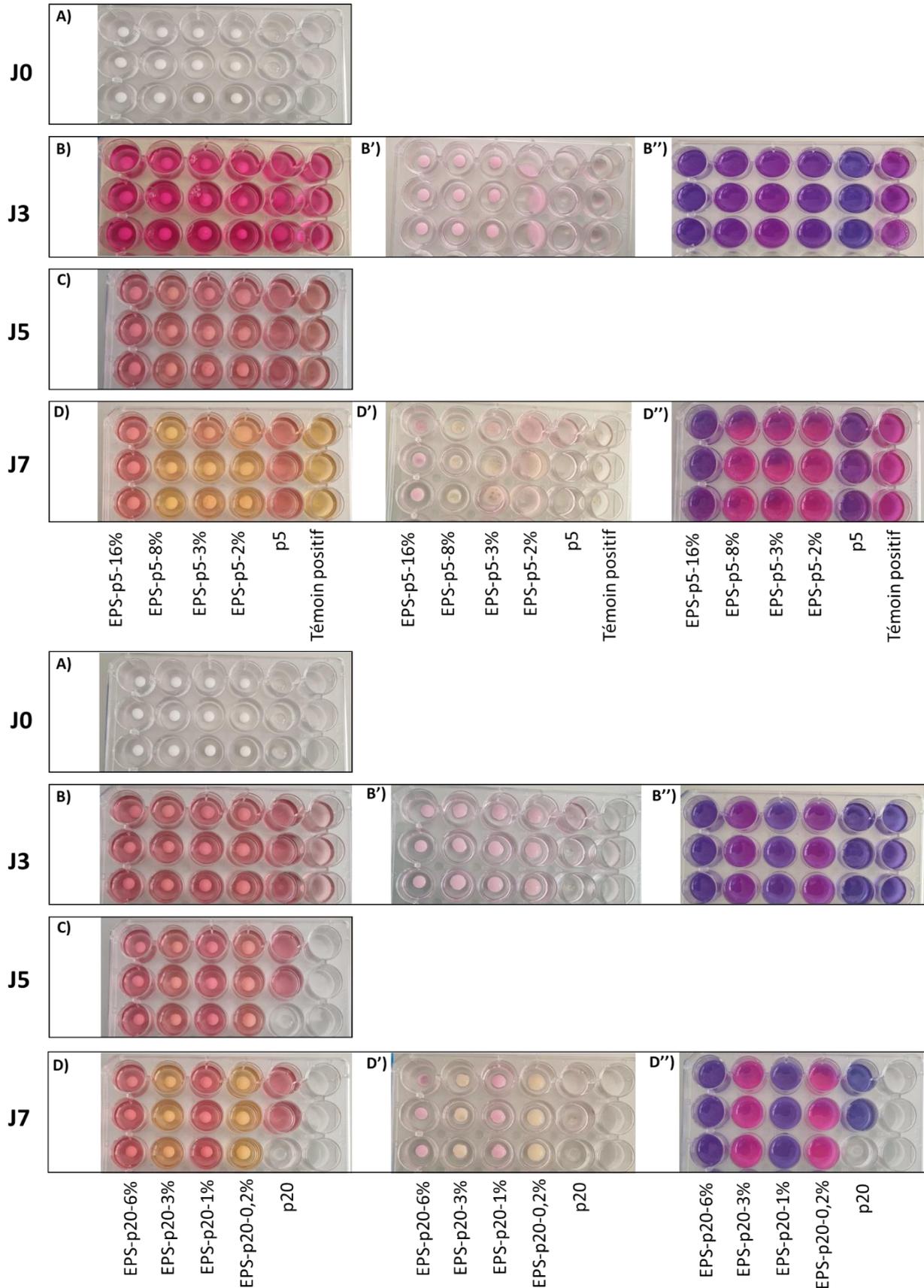


Figure 96. Les hydrogels de p5, de p20, d'EPS-p5 et d'EPS-p20 ont été préparés à 10 % m/v PBS hormis les EPS-p5-3%/2% (7 % m/v PBS). Les cellules HEK293 ont étéensemencées à  $1 \times 10^6$  cell/mL (30  $\mu$ L) à J0. A) Gélification des hydrogels contenant les cellules HEK293ensemencées ( $1 \times 10^6$  cell/mL) 1 h à 37 °C (5 % CO<sub>2</sub>, humidité contrôlée). B) Aspect des puits à J3. B') Aspect des hydrogels après prélèvement du milieu de culture à J3. B'') Aspect des puits après test AlamarBlue (400  $\mu$ L, 20 % v/v DMEM, 5h, 37 °C) à J3. C) Aspect des puits à J5. D) Aspect des puits à J7. D') Aspect des hydrogels après prélèvement du milieu de culture à J7. D'') Aspect des puits après test AlamarBlue (400  $\mu$ L, 20 % v/v DMEM, 5h, 37 °C) à J7. Le Cultrex a été utilisé en tant que témoin positif.

La fluorescence mesurée a été normalisée par rapport à la réponse du témoin positif Cultrex et présentée en Figure 97.

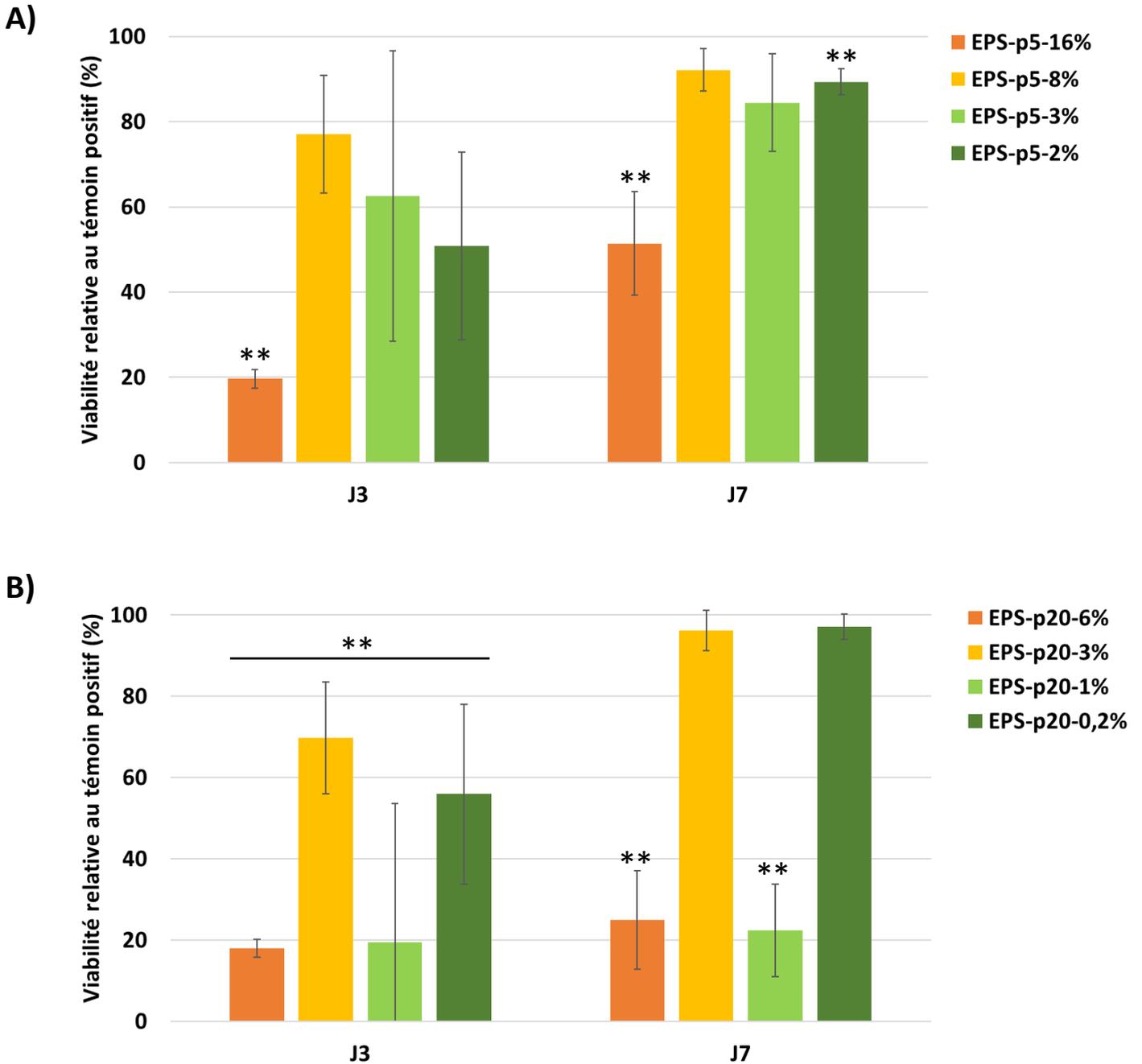
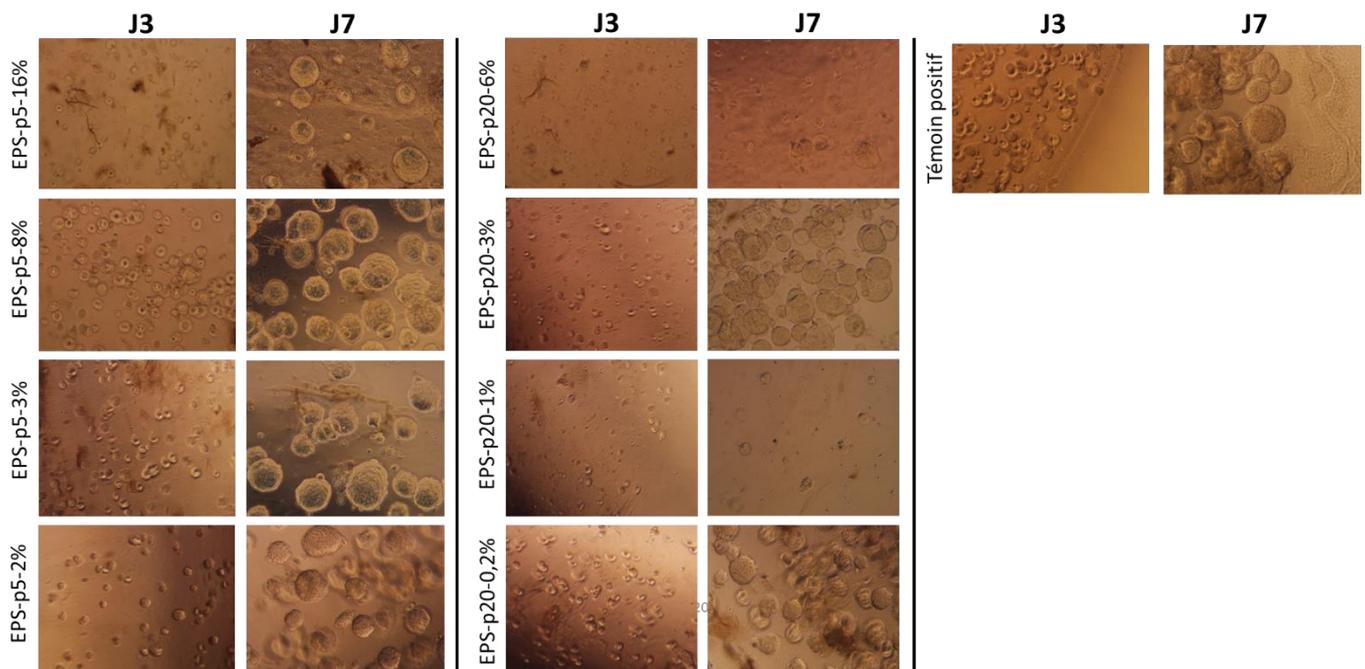


Figure 97. Viabilité relative au témoin positif Cultrex par le test AlamarBlue (20 % v/v DMEM, 5h, 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, humidité contrôlée, ex : 560 nm/em : 590 nm) des cellules HEK293ensemencées (à 1 x 10<sup>6</sup> cell/mL) dans les hydrogels d'EPS greffés (10 % m/v PBS sauf EPS-p5-3%/2%, 7 % m/v PBS). \*\* indique que les valeurs sont significativement différentes du témoin positif (Cultrex) (Test t de Student à  $\alpha = 5$  %).

A J3, la viabilité relative de l'EPS-p5-16%, le plus greffé, est plus faible (20 %) que celle des autres hydrogels d'EPS-p5 (51 à 77 %) (Figure 97.A). A J7, la fluorescence de l'ensemble des conditions EPS-p5 a augmenté de manière significative vis-à-vis de J3. Les EPS-p5-8%, EPS-p5-3% et EPS-p5-2% présentent une viabilité relative moyenne supérieure à 84 %. Les cellules s'organisent sous forme de sphéroïdes comme pour le témoin positif Cultrex (Figure 98). L'EPS-p5-16% présente une viabilité relative augmentée vis-à-vis de J3 (51 %) mais reste plus faible que les autres conditions EPS-p5.

Pour les EPS-p20, à J3, toutes les réponses sont significativement inférieures à celle du témoin positif (< à 70 %), en particulier les hydrogels d'EPS-p20-6% et d'EPS-p20-1% (< à 20 %) (Figure 97.B). A J7, les conditions EPS-p20-3% et EPS-p20-0,2% présentent une viabilité relative supérieure à 95 %. Les sphéroïdes présentent un aspect relativement similaire aux conditions EPS-p5-8%, EPS-p5-3% et EPS-p5-2% (Figure 98). La variation de viabilité des hydrogels d'EPS-p20-6% et EPS-p20-1% entre J3 et J7 n'est pas significative et reste faible (~ 20 %).



**Figure 98.** Observation au microscope optique à température ambiante des cellules HEK293 ensemencées dans les hydrogels d'EPS greffés (10 % m/v PBS sauf EPS-p5-3%/2%, 7 % m/v PBS) (Gx10). Le Cultrex a été utilisé en tant que témoin positif.

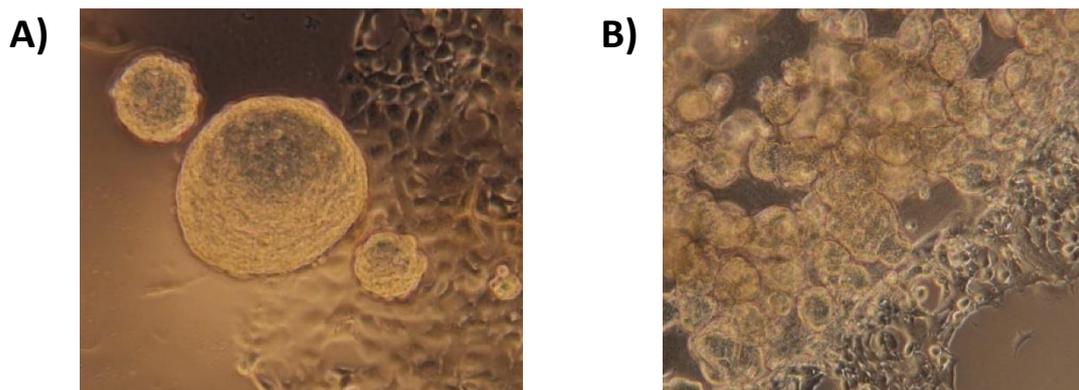


Figure 99. Observation au microscope optique (Gx10) à température ambiante à J7 des cellules HEK293 présentes sous forme sphéroïde et adhérente dans A) l'hydrogel d'EPS-p5-2% (7 % m/v PBS) et B) le Cultrex.

A J7, à l'image du Cultrex, quelques cellules HEK293 sous forme adhérente peuvent également être observées pour les hydrogels d'EPS greffés, notamment pour les moins greffés (EPS-p5-3%/2% et EPS-p20-0,2%) (Figure 99).

La mesure de la viabilité des cellules ensemencées dans les hydrogels à base de pNIPAM p5 et p20 seul (10 % m/v) n'a pu être réalisée. Ces hydrogels se sont désagrégés lors de l'ajout du DMEM (Figure 96. J3-B). La majorité des cellules a donc été aspirée lors du prélèvement du milieu de culture avant le test AlamarBlue faussant par conséquent la réponse mesurée.

#### *Impact des propriétés mécaniques des hydrogels sur la viabilité cellulaire*

Les propriétés mécaniques des hydrogels jouent un rôle clé sur les processus cellulaires (prolifération, migration, différenciation...) (Ahearne, 2014; Chaudhuri et al., 2016; Vining & Mooney, 2017). Les modules élastiques mesurés par AFM à partir des courbes de relaxation (Figure 79) diffèrent peu entre les différents hydrogels d'EPS-pNIPAM (entre 2 kPa et 4,6 kPa pour les EPS-p5 et 3,6 à 6,2 kPa pour les EPS-p20) (Tableau XVIII). Le temps de relaxation poroélastique des hydrogels d'EPS-pNIPAM de l'ordre d'1 s, traduit une capacité de dissipation des contraintes mécaniques rapides, qui coïncide avec l'échelle de temps de réponses des cellules (Chaudhuri et al., 2016), ce qui serait favorable au développement cellulaire dans une structure nanoporeuse. Il est important de souligner que les propriétés mécaniques des hydrogels ont été mesurées entre 30 minutes et 2 heures après la gélification reflétant ainsi les propriétés mécaniques de l'environnement cellulaire établies aux premiers temps après injection de l'hydrogel. Dans ces conditions, les taux de gonflement étaient similaires pour les

différents hydrogels (Figure 62). Cependant, des différences dans le gonflement des hydrogels apparaissent au cours du temps, dépendant de la densité de greffage du pNIPAM et de la concentration en EPS (Figure 62). En effet, l'hydratation des hydrogels formés par les EPS les plus greffés (EPS-p5-16% et EPS-p20-6%) n'évolue que très peu au cours du temps, traduisant des réseaux denses dans lesquels les interactions inter-chaînes forment un maillage serré et ce d'autant plus que la chaîne de pNIPAM greffée serait longue. Ces réseaux denses semblent peu favorables aux processus cellulaires (viabilité relative de 51 % et 25 % pour des taux de gonflement de 1,6 et 1,0 respectivement). A l'inverse, les hydrogels obtenus à partir des EPS moins greffés gonflent davantage avec le temps, révélant des réseaux plus lâches schématisés sur la Figure 63. L'expansion du réseau sera favorable non seulement à la diffusion des nutriments et l'évacuation des déchets cellulaires hors matrice mais aussi aux différents processus cellulaires, dont la prolifération et la migration en raison d'une déformabilité aisée. Ce dernier point peut notamment être illustré par la capacité des cellules HEK293 à migrer hors des hydrogels d'EPS les moins greffés au 7<sup>e</sup> jour de culture cellulaire (lorsque le réseau des hydrogels est le plus lâche), comme observé pour le Cultrex (Figure 99).

Dans la littérature, il a été également reporté que la viabilité des cellules du noyau pulpeux du disque intervertébral était fortement affectée par la densité du réseau des hydrogels HA-pNIPAM (Mortisen et al., 2010; Peroglio et al., 2012). En effet, la viabilité de ces cellulesensemencées dans l'hydrogel HA-pNIPAM avec un réseau lâche (HA-pNIPAM avec HA de masse molaire Mn 1 700 000 g/mol et pNIPAM de masse molaire Mn 20 000 g/mol) est supérieure (90 %) à celle obtenue dans un réseau dense (HA-pNIPAM avec du pNIPAM de masse molaire plus élevée, Mn 35 000 g/mol) (69 % à J3 et 50 % à J7) (Peroglio et al., 2012). Ce résultat a été corrélé à la diminution de volume d'hydrogel HA-pNIPAM 35 000 g/mol de 30 % en augmentant la taille de la chaîne de pNIPAM.

#### *Impact de la composition des hydrogels sur la viabilité cellulaire*

La concentration en EPS dans les hydrogels d'EPS-pNIPAM peut également impacter la viabilité cellulaire (Figure 43, Tableau XVIII). L'hydrogel à base d'EPS-p5-16%, le plus greffé, présente un taux d'EPS inférieur (37 % de l'EPS-pNIPAM) aux autres hydrogels formés à partir d'EPS-p5 ( $\geq 55$  % de l'EPS-pNIPAM). C'est également le cas pour l'hydrogel à base d'EPS-p20-6% (31 % de l'EPS-

pNIPAM) vis-à-vis des autres hydrogels d'EPS-p20 ( $\geq 48$  % de l'EPS-pNIPAM). Ainsi, les hydrogels d'EPS greffés pour lesquels le taux d'EPS est supérieur à 48 % (de l'EPS-pNIPAM, Tableau XVIII), présentent une viabilité cellulaire proche du Cultrex dont la composition (laminine, collagène IV, perlécane) est favorable à l'adhésion cellulaire *via* leurs intégrines (Yarwood & Woodgett, 2001). Une part importante en EPS au sein de l'hydrogel est donc une condition nécessaire pour favoriser la viabilité cellulaire. L'effet bénéfique en ingénierie tissulaire de l'EPS infernane incorporé dans un hydrogel injectable pH sensible, élaboré à partir d'un dérivé de cellulose silanisé (Si-HPMC à 2 % m/v), a déjà été montré dans de précédents travaux. Par rapport à l'hydrogel seul, son enrichissement en EPS infernane (0,67 % m/v) favorise la viabilité des cellules de chondrocytes articulaires de lapin en culture 3D avec une nette augmentation de la production de collagène de type II et d'agrécan par les cellules, indiquant le maintien de leur phénotype. Cet effet a été aussi observé dans un modèle *in vivo*, l'implantation dans des souris immunodéficientes de cet hydrogel enrichi en EPS infernane et contenant des chondrocytes articulaires de lapin stimule la production de tissus cartilagineux avec une matrice extracellulaire riche en collagène de type II et en agrécane, indiquant encore dans ce modèle le maintien du phénotype chondrocytaire (Rederstorff et al., 2011b, 2017).

De plus, la viabilité cellulaire ne semble pas affectée par la présence du pNIPAM libre (dont des taux proches ont été mesurés quel que soit l'hydrogel (Tableau XVIII)), en accord avec d'autres publications traitant du caractère biocompatible du pNIPAM (Cheng et al., 1997; Guo et al., 2017) ou de polymères greffés polysaccharide-pNIPAM (Chen & Cheng, 2006, 2009; Lai & Luo, 2017; Mortisen et al., 2010; Tan et al., 2012).

La viabilité réduite observée pour l'hydrogel d'EPS-p20-1% (22 %) pourrait s'expliquer par une contamination bactérienne initiale plus forte par rapport aux autres polymères greffés. Même si la désinfection par chauffage à 80°C, 30 min avait conduit à l'absence de développement microbien sur boîte (III.3.4.1), il est possible d'envisager que des débris bactériens résiduels ont impacté négativement la viabilité des cellulesensemencées dans cet hydrogel.

**Tableau XVIII.** Résumé des données présentées dans ce mémoire sur les hydrogels d'EPS-p5 et d'EPS-p20. Les hydrogels étant préparés à 10 % m/v PBS, les proportions massiques (% m) des différents constituants sont égales à 10 fois leur concentration (en % m/v) au sein des hydrogels hormis pour les hydrogels d'EPS-p5-3% et d'EPS-p5-2% préparés à 7 % m/v. La concentration en % m/v ( $\times 10$ ) est également précisée entre parenthèse en plus du pourcentage massique pour ces hydrogels (composition d'après FI-AF4-MALS-dRI). Les valeurs à l'équilibre (55 h) du gonflement sont relatives aux conditions de mesure. Les mesures de propriétés mécaniques par AFM ont été réalisées environ 30 min à 2 h après gélification dans des conditions de test *in vitro* : module élastique de relaxation ( $\langle E \rangle$ ), temps de relaxation poroélastique ( $\tau$ ) et taille des pores ( $\xi$ ). La viabilité de cellules HEK293 ensemencées dans le hydrogels d'EPS-pNIPAM est indiquée en pourcentage vis-à-vis de la viabilité dans le témoin positif Cultrex.

Hydrogel	Composition des hydrogels d'EPS-pNIPAM (FI-AF4-MALS-dRI)					Gonflement relatif à 55 h	Propriétés mécaniques (courbes de relaxation AFM)			Viabilité relative J7 (Test AlamarBlue)
	EPS (% m)	pNIPAM greffé (% m)	EPS-pNIPAM (% m)	pNIPAM libre (% m)	EPS dans EPS-pNIPAM (% m)		Ratio	$\langle E \rangle$ (kPa)	$\tau$ (s)	
EPS-p5-16%	9	15	24	76	37	1,6	2,0 ± 0,4	0,72	~ 1,8	51
EPS-p5-8%	14	11	25	75	55	3,2	3,5 ± 0,2	0,74	~ 1,3	92
EPS-p5-3%	24 (17)	7 (5)	32 (22)	68 (48)	76	6,5	4,6 ± 0,4	0,76	~ 1,2	84
EPS-p5-2%	33 (24)	7 (5)	40 (28)	60 (42)	83	6,7	-	-	-	89
EPS-p20-6%	5	10	15	85	31	1,0	-	-	-	25
EPS-p20-3%	9	9	18	82	48	2,2	3,6 ± 0,3	0,96	~ 1,1	96
EPS-p20-1%	13	5	18	82	69	3,5	6,2 ± 0,6	0,52	~ 1,0	22
EPS-p20-0,2%	19	2	21	79	93	4,2	4,6 ± 0,1	0,64	~ 1,2	97



## 4. Conclusion

Ce chapitre visait à caractériser les hydrogels d'EPS-pNIPAM afin d'évaluer leur potentiel pour une utilisation future en ingénierie tissulaire. L'objectif était donc (1) de tester la capacité de gélification des EPS-pNIPAM à 37 °C, (2) de mesurer le gonflement ainsi que les propriétés mécaniques des hydrogels dans leur état complètement hydraté et enfin (3) de déterminer leur cytocompatibilité en présence de cellulesensemencées.

Dans le chapitre II, la capacité des EPS à former un réseau infini, condition nécessaire pour établir un hydrogel, a été montrée par des simulations Monte Carlo. Dans ce chapitre III, des tests de gélification ont confirmé l'aptitude du polymère EPS-pNIPAM à gélifier à 37 °C. En présence du milieu DMEM utilisé pour la culture cellulaire, les hydrogels obtenus étaient stables sur toute la durée de l'étude fixée à 7 jours. Le pNIPAM libre présent au sein des EPS greffés n'est pas responsable de leur gélification. En effet, l'association EPS/pNIPAM non covalente (EPS-p5-0%) se dissociant en quelques minutes après l'ajout de DMEM confirme que seules les chaînes de pNIPAM greffées sur l'EPS permettent l'établissement de jonctions entraînant la formation d'un réseau gélifié à 37 °C.

Les propriétés mécaniques des différents hydrogels ont ensuite été caractérisées par AFM. Souhaitant se rapprocher des conditions d'application, ces propriétés ont été mesurées aux premiers instants après gélification (de 30 min à 2 h) pour correspondre aux propriétés après l'injection de l'hydrogel dans le défaut à réparer. Ces mesures ont été effectuées dans des conditions proches des conditions *in vivo* en opérant dans l'état complètement hydraté de l'hydrogel, qui baignait dans le milieu de culture DMEM. L'utilisation de pointes AFM (sphères de 5 µm de diamètre) avec des tailles comparables à celles des cellules permettait également de sonder la réponse mécanique perçue par les cellules. Des expériences de micro-rhéologie par AFM, à travers des mesures de relaxation de contrainte, ont montré que le module de stockage  $G'$  des EPS-pNIPAM est toujours supérieur au module de perte  $G''$  dans la gamme des fréquences appliquées ce qui indique le caractère gélifié des hydrogels d'EPS-pNIPAM. Afin de décrire les propriétés mécaniques des hydrogels dépendantes du temps, il est de rigueur de définir le modèle à l'origine de la dissipation d'énergie, bien que cette vérification ne soit que rarement effectuée dans les travaux publiés. Pour caractériser la réponse dissipative des hydrogels, des mesures de relaxation de force ont été réalisées en

variant la profondeur d'indentation (100 nm, 250 nm et 300 nm) pour une même pointe AFM. La dépendance des courbes de relaxation de force avec la taille du contact a révélé que les hydrogels d'EPS-pNIPAM sont des matériaux poroélastiques dans lesquels l'énergie est dissipée par le mouvement du DMEM au sein du réseau gélifié. Les temps de relaxation poroélastiques sont de l'ordre de la seconde pour l'ensemble des hydrogels d'EPS-pNIPAM. En appliquant la théorie de la poroélasticité sur les courbes mesurées, des modules élastiques compris entre 2 kPa et 7 kPa ont été obtenus pour les différents hydrogels. Ces valeurs sont comparables à celles préalablement mesurées en effectuant des courbes force-indentation puis en appliquant le modèle de Hertz.

Mesurées entre 30 min et 2 h après gélification, ces propriétés mécaniques post-gélification sont destinées à évoluer, notamment sous l'effet du gonflement de l'hydrogel. La transition sol-gel des hydrogels thermosensibles EPS-pNIPAM étant réversible autour de la LCST ( $\sim 32$  °C), une adaptation des protocoles standards de mesure du taux de gonflement des hydrogels a été réalisée, en suivant non pas la masse de l'hydrogel au cours du temps mais celle du surnageant absorbée par l'hydrogel. Tandis que les hydrogels les plus greffés (EPS-p5-16% et EPS-p20-6%) gonflent peu au cours du temps, les hydrogels moins greffés présentent un taux de gonflement plus important (EPS-p5-3%/2%). Cette différence de gonflement est reliée à la densité des réseaux formés par ces deux types d'EPS greffés, peu et très greffés, à l'origine des réseaux lâches et denses, respectivement. Les expériences de gonflement réalisées ont montré que les interactions inter-chaînes établies entre les chaînes de pNIPAM greffés sur l'EPS sont suffisamment fortes, pour maintenir l'intégrité des hydrogels.

Afin de démontrer la cytocompatibilité des hydrogels d'EPS-pNIPAM (préalablement désinfectés), la mise au point d'un protocole permettant, d'une part, l'ensemencement de cellules HEK293 dans ces hydrogels, et d'autre part, la mesure de leur viabilité par un test AlamarBlue a été réalisée avec succès. Les propriétés mécaniques des hydrogels mais aussi leur composition ont un impact sur la viabilité cellulaire. Les hydrogels d'EPS peu greffés aux réseaux lâches qui gonflent davantage sont favorables au développement cellulaire. En effet, une viabilité cellulaire supérieure à 90 %, similaire à celle dans l'hydrogel témoin Cultrex, a été mesurée dans ces hydrogels. A l'inverse, une nette diminution de la viabilité ( $< 50\%$ ) a été observée dans les hydrogels d'EPS les plus greffés aux réseaux denses. Dans ce réseau moins déformable, les cellules sont davantage contraintes mécaniquement ce qui empêche leur

développement, entraînant la mort cellulaire. De plus, le taux d'EPS au sein des polymères EPS-pNIPAM qui varient de 31 % à 93 % coïncide avec les résultats de la viabilité. Un taux d'EPS supérieur à 48 % donne des résultats de viabilité rivalisant avec ceux du témoin positif Cultrex pourtant biologiquement actif du fait de sa composition chimique (collagène, laminine, facteurs de croissance) favorisant l'adhésion, la croissance et la migration cellulaire.



# Conclusion générale & Perspectives

---



**A** fin de répondre aux besoins spécifiques de l'ingénierie tissulaire du cartilage, le développement d'une matrice administrable de manière mini-invasive et mimant l'environnement biologique natif du cartilage, et tout particulièrement les propriétés biologiques des GAG, reste un défi à relever. Dans ce contexte, l'objectif de la thèse visait à développer des hydrogels, d'une part thermosensibles et par conséquent injectables et adaptables à la forme de la lésion, et d'autre part, bioactifs, constitués d'un exopolysaccharide (EPS) bactérien, l'infernane, possédant naturellement des propriétés biologiques mimétiques des GAG. Comme l'infernane ne possède naturellement ni propriété de gélification, ni caractère thermosensible, une étape incontournable pour concevoir de tels hydrogels a été de fonctionnaliser cet EPS avec un polymère thermo-répondant, le poly(N-isopropylacrylamide) (pNIPAM).

**Le greffage covalent de l'extrémité amine (R'-NH<sub>2</sub>) de pNIPAM commerciaux sur les acides uroniques (R-COOH) de l'EPS *via* la chimie des carbodiimides (EDC/NHS) a été réalisé avec succès.** La variation du ratio molaire COOH:NH<sub>2</sub> a permis l'obtention de 8 produits finaux qui se distinguent par leur composition massique en EPS/pNIPAM, leur densité de greffage des acides uroniques de l'EPS et la taille de la chaîne de pNIPAM greffée (5 500 g/mol ou 20 000 g/mol). Les EPS-pNIPAM présentent des densités de greffage de 0,2 % à 16 %, indépendamment de la masse molaire du pNIPAM, et des taux d'EPS qui varient de 37 à 93 %. La réaction de greffage du pNIPAM est partielle, moins de 10 % du pNIPAM initialement utilisé sont greffés au terme de la réaction, bien que des simulations de dynamique moléculaire (DM) aient montré que l'ensemble des 3 acides uroniques de l'unité répétitive octasaccharidique de l'infernane étaient disponibles. Les chaînes de pNIPAM greffées sont par ailleurs réparties sur les 3 positions d'acides uroniques, comme le confirme l'analyse par RMN. Le reste du pNIPAM présent au sein des produits finaux est non greffé et est majoritairement sous forme d'agrégats (Mw ~ 100 000 g/mol, FI-AF4-MALS-dRI) limitant ainsi son élimination par dialyse même en utilisant une membrane avec un seuil de coupure de 50 000 g/mol. La distinction entre le pNIPAM greffé et le pNIPAM libre pour aboutir à une caractérisation fiable et précise de la densité de greffage des acides uroniques de l'EPS est délicate dans le cas d'un greffage établi par la formation d'un pont amide, déjà présent au sein du pNIPAM. Ce verrou a néanmoins été levé par la technique de fractionnement FI-AF4-MALS-dRI et le greffage a été confirmé par l'analyse RMN.

**Les EPS greffés présentent à température ambiante des caractéristiques physico-chimique particulières.** Le greffage de pNIPAM sur le polysaccharide entraîne une modification du comportement en solution des chaînes d'EPS-pNIPAM par rapport à celles de l'EPS natif seules ou simplement associées de manière non covalente au pNIPAM (préparé dans les conditions de réaction mais sans l'ajout d'EDC/NHS (EPS-p5-0%). A température ambiante, les chaînes d'EPS greffées s'organisent sous la forme d'agrégats, de très haute masse molaire ( $> 10^9$  g/mol) et de conformation sphérique dense (FI-AF4-MALS-dRI et DLS), établis par des interactions inter-chaînes entre les chaînes de pNIPAM greffées (imagerie par AFM). Ces interactions inter-chaînes dépendent du taux d'EPS et de la densité de greffage (car peu observées pour l'EPS très peu greffé, EPS-p20-0,2%).

**Les EPS greffés sont thermosensibles.** Leur température de transition (LCST) de 32 °C est similaire à celle du pNIPAM seul et par conséquent indépendante de la composition et de la densité de greffage des polymères EPS-pNIPAM (spectroscopie UV-visible). Au-dessus de la LCST, les chaînes d'EPS greffées s'associent par des interactions inter/intra-chaînes pour former des structures compactes, à l'inverse du pNIPAM seul ou de l'EPS non greffé, EPS-p5-0% (DLS). Dans un régime très dilué, une densité de greffage suffisante ( $\geq 16$  %) permet l'observation du repliement des chaînes d'EPS-pNIPAM au-dessus de la LCST (imagerie AFM). Pour ce polymère (EPS-p5-16%), des interactions intra-chaînes entraînent une flexion locale favorisant le rapprochement des régions éloignées de l'EPS et *in fine* le repliement global de la chaîne polysaccharidique. Ce repliement témoigne de la flexibilité de la chaîne de polysaccharide, permise par le greffage de pNIPAM, discutée en simulations de DM et accentuée au-dessus de la LCST. Pour les EPS moins greffés, qui comportent un taux d'EPS plus important, les interactions inter-chaînes sont dominantes.

**Les EPS greffés gélifient à température corporelle humaine (37 °C).** En accord avec les simulations de Monte Carlo ayant montré que les interactions inter-chaînes des EPS greffés pouvaient générer la formation d'un réseau continu, des tests de gélification menés en conditions totalement hydratées ont confirmé que les EPS greffés gélifient en régime concentré (7 à 10 % m/v PBS) à 37 °C. Ces chaînes d'EPS greffées ont la capacité de former des zones de jonctions par les chaînes de pNIPAM greffées, entraînant la formation d'un réseau gélifié qui se distingue de l'association non covalente EPS/pNIPAM solubilisée après l'ajout du milieu de culture thermostaté. Des densités de greffage peu élevées (de 0,2 % à 16 %) de la

chaîne d'EPS suffisent pour observer cette différence majeure vis-à-vis de l'EPS-p5-0%, non greffé. La cinétique de la transition sol/gel du pNIPAM (1 à 2 min) n'est pas impactée par la densité de greffage de l'EPS et le caractère réversible de la gélification est conservé.

**Les propriétés mécaniques des hydrogels d'EPS-pNIPAM dépendent du taux d'EPS et de la densité de greffage.** Une caractérisation des propriétés mécaniques des hydrogels totalement hydratés à 37 °C a été réalisée par AFM à l'aide d'une sphère de taille comparable à celle des cellules (5 µm), ce qui permettait d'approcher la réponse mécanique perçue par les cellules. Les mécanismes à l'origine de la dissipation mécanique de ces hydrogels sont de nature poroélastique comme dans le cas des hydrogels chimiques, et non viscoélastique. Deux méthodes de mesures par AFM (courbes force-indentation et courbes de relaxation de force) traitées par des modèles théoriques distincts, modèle de Hertz et modèle poroélastique, conduisent à des valeurs comparables de modules élastiques. Ces modules qui varient de 2 à 7 kPa, sont proportionnels au taux d'EPS pour une densité de greffage minimum (> 0,2 % pour les EPS-p20). Les hydrogels d'EPS-pNIPAM sont nanoporeux, caractérisés par des temps de relaxation poroélastique de l'ordre de la seconde.

**Les hydrogels d'EPS-pNIPAM sont stables en condition totalement hydratée pour une durée minimale de 7 jours.** Avec le temps, les hydrogels d'EPS-pNIPAM gonflent différemment en fonction de leur taux d'EPS et de leur densité de greffage. Les EPS moins greffés gonflent davantage en raison d'un réseau formé plus lâche, favorisé également par un taux d'EPS plus important. A l'inverse les EPS plus greffés (EPS-p5-16% et EPS-p20-6%) présentent un réseau plus dense et ce d'autant plus que la chaîne de pNIPAM est longue. Les interactions physiques à l'origine du réseau des hydrogels d'EPS-pNIPAM sont suffisamment fortes pour maintenir l'intégrité des hydrogels au moins dans les premiers jours en condition de test *in vitro*.

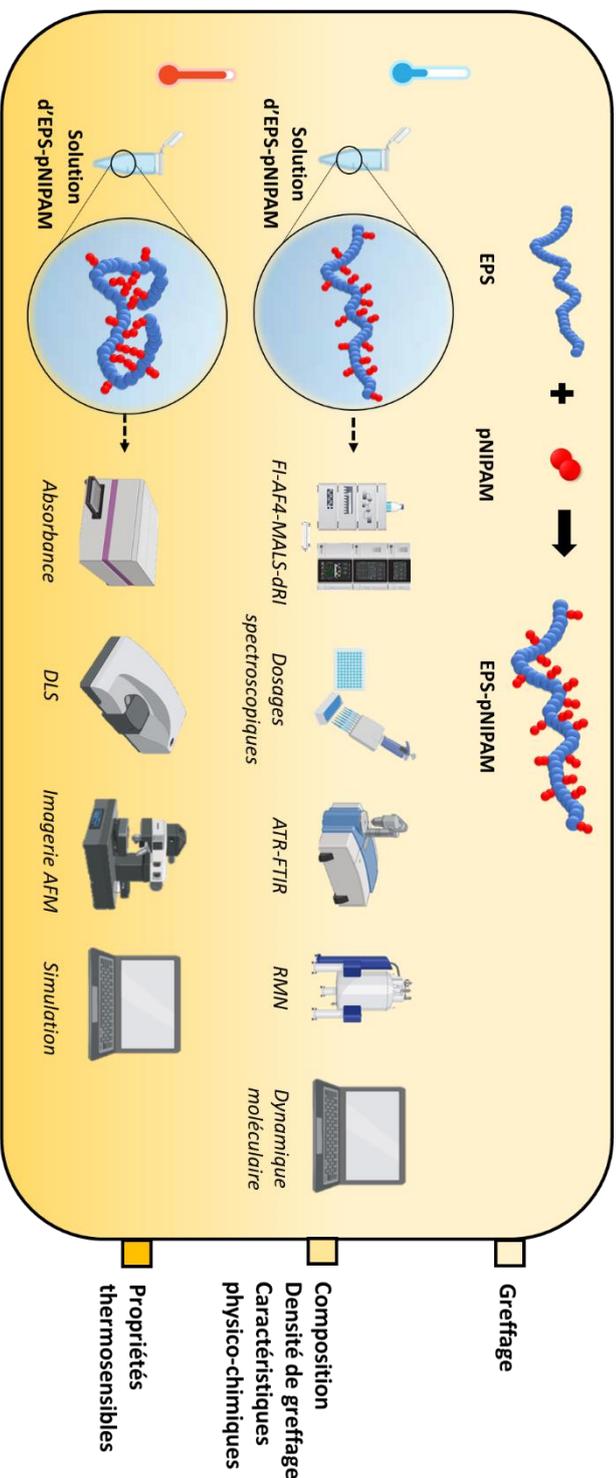
**Les hydrogels d'EPS-pNIPAM sont cytocompatibles.** L'ensemencement de cellules modèles HEK293 au sein des hydrogels d'EPS greffés, préalablement désinfectés (80 °C, 30 min), a été réalisé avec succès. Les résultats du test de viabilité ont montré que le pNIPAM, de même que l'EPS ne sont pas cytotoxiques. Bien au contraire, les hydrogels d'EPS-p5-8%/3%/2% et d'EPS-p20-3%/0,2%, aux réseaux moins denses et plus riches en EPS qui gonflent davantage avec le temps, sont cytocompatibles, favorables au développement cellulaire pour

une durée de 7 jours minimum en condition *in vitro*, et de viabilité comparable à celle du témoin Cultrex bioactif. En revanche, les environnements plus denses et moins riches en EPS caractéristiques des hydrogels d'EPS plus greffés (EPS-p5-16% et EPS-p20-6%) sont défavorables au développement cellulaire démontrant ainsi qu'il n'est pas nécessaire de fonctionnaliser davantage l'EPS.

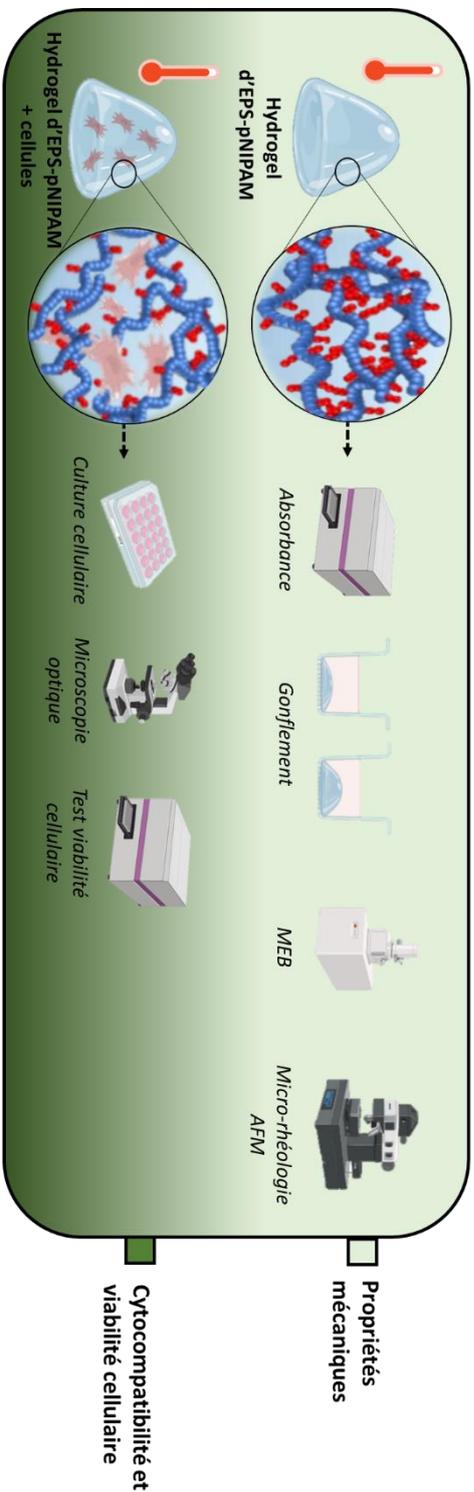
**L'ensemble de ce travail de thèse a donc permis une meilleure compréhension de la relation entre la structure de l'infernane greffé par un polymère thermosensible et les propriétés fonctionnelles, mécaniques et biologiques, des hydrogels d'EPS résultants. Ces connaissances s'avèrent essentielles pour une utilisation future de ces hydrogels thermosensibles à base d'infernane en ingénierie tissulaire du cartilage.**

## ÉLABORATION D'HYDROGELS THERMOSENSIBLES INJECTABLES À BASE D'EXOPOLYSACCHARIDES MARINS POUR L'INGÉNIERIE TISSULAIRE

### Chapitre II : Conception & Caractérisation d'un EPS thermosensible



### Chapitre III : Caractérisation & Cytocompatibilité des hydrogels d'EPS-pNIPAM



Relation composition/propriétés thermosensibles/propriétés mécaniques/propriétés biologiques

Figure 100. Résumé graphique des principales expériences et caractérisations menées au cours de la thèse.

## Perspectives

Quelques perspectives découlent de ces travaux de thèse, avec notamment des optimisations possibles concernant le greffage EPS/pNIPAM, la caractérisation des hydrogels d'EPS-pNIPAM et leurs propriétés biologiques *in vitro*.

Dans le cas des cellules HEK293, les hydrogels d'EPS les plus greffés ne sont pas favorables au développement cellulaire. Ainsi, il ne serait pas souhaitable d'augmenter la densité de greffage de l'EPS. En revanche, dans l'optique d'une production en quantité plus importante d'EPS greffés, améliorer le rendement de la réaction de greffage reste un point à développer. Pour le moment, moins de 10 % du pNIPAM initialement ajouté sont effectivement greffés. Des modifications du ratio molaire COOH:EDC:NHS et du pH de la réaction sont des voies à envisager pour accroître le rendement et un plan d'expérience pourrait être proposé en ce sens. Une diminution du ratio molaire COOH:EDC et EDC:NHS pourrait respectivement favoriser la formation de l'O-acylisourée puis celle de l'ester succinimidyle (Figure 25/26). De même augmenter le pH de la réaction (entre 6 et 8) pourrait améliorer la réactivité de l'amine (pNIPAM) nécessaire à la formation de la liaison amide.

Afin d'éliminer le pNIPAM non greffé, séquestré dans les produits finaux pour une raison stérique, l'utilisation de membrane de dialyse au seuil de coupure plus important (100 000 g/mol ou 300 000 g/mol) pourrait être envisagée, de même que le recours à des techniques de purification plus « actives » telles que l'ultrafiltration. La modification de la composition des produits finaux imposera néanmoins de caractériser les propriétés thermosensibles et mécaniques des polymères et hydrogels d'EPS-pNIPAM nouvellement obtenus.

Ce travail de thèse visait à développer des hydrogels thermosensibles afin d'envisager l'administration aisée et mini-invasive par injection de ces matrices. L'injectabilité des solutions d'EPS-pNIPAM, autrement dit leur capacité à passer à travers une aiguille de seringue couramment utilisée dans les approches mini-invasives lors d'essais précliniques sur l'animal et cliniques sur l'homme (ex : aiguille 23 G), devra être évaluée (Alonso et al., 2021; Flégeau et al., 2020).

Les hydrogels d'EPS-pNIPAM n'ont pas pour vocation de se substituer à la matrice extracellulaire du cartilage. En tant qu'échafaudages favorisant les processus cellulaires, leur

durabilité doit néanmoins être suffisante pour permettre aux cellulesensemencées de sécréter la matrice néoformée avant leur désagrégation. La biodégradabilité de l'hydrogel est donc un critère important qui pourra être évaluée selon le protocole de mesure du gonflement mais pour un temps plus long.

La micro-structure des hydrogels pourrait être observée par des techniques plus adaptées à ces matrices que la microscopie électronique à balayage (MEB) utilisée au cours de ces travaux. La microscopie électronique à balayage environnemental (MEBE) ou encore l'imagerie AFM en milieu liquide pourraient permettre l'observation de l'hydrogel dans son état hydraté (Alonso et al., 2021; Jayawardena et al., 2023; Martinez-Garcia et al., 2022).

Pour des applications biomédicales, la stérilisation des hydrogels est une priorité. La technique employée dans le cadre de ce travail (chauffage à 80 °C, 30 min), bien qu'efficace pour l'élimination de la biocharge des EPS greffés, n'aboutit pas à une stérilisation telle que définie par l'Agence Européenne des Médicaments (EMA) et n'est, par conséquent, pas reconnue. La recherche d'une méthode permettant de conserver l'intégrité de la chaîne d'EPS greffée est importante. Parmi les différentes techniques utilisées lors de précédents travaux pour la stérilisation de l'EPS infernane, l'oxyde d'éthylène avait entraîné la plus faible dégradation de la chaîne d'EPS (Rederstorff et al., 2011a) et pourrait donc être testé sur les EPS greffés. L'impact de cette technique sera ensuite évalué par l'étude de la variation de la masse molaire moyenne des EPS greffés par FI-AF4-MALS-DRI et les propriétés mécaniques des hydrogels par AFM.

La cytocompatibilité des hydrogels d'EPS-pNIPAM ayant été démontrée sur les cellules modèles HEK293, la cytocompatibilité des hydrogels envers des chondrocytes ou des cellules souches, adaptées à l'application visée, devrait être vérifiée et ce pour des temps plus longs. Lors d'une précédente étude, la sécrétion des composants matriciels (GAG, collagène II) par des chondrocytes était améliorée, en culture 3D *in vitro* et *in vivo* dans un modèle de souris, par un hydrogel Si-HPMC supplémenté en infernane (0,67 % m/v) (Rederstorff et al., 2011b; Rederstorff et al., 2017). Le caractère bioactif des hydrogels d'EPS greffés pourra donc être démontré par la quantification de ces composants matriciels tels que les agrécans et le collagène de type II *via* des tests appropriés ou par l'expression des gènes impliqués dans leur synthèse, par réaction en chaîne par polymérase après transcription inverse (RT-PCR)

(Peroglio et al., 2012). Le caractère biocompatible des hydrogels d'EPS pNIPAM pourra ensuite être vérifié *in vivo*.

L'infernane (0,67 % m/v), supplémenté à un hydrogel Si-HPMC, favorisait l'adhésion cellulaire des chondrocytes cultivés en 2D (Rederstorff et al., 2011b). L'adhésion du biomatériau est également relative au caractère cohésif de l'hydrogel vis-à-vis du défaut à traiter, indispensable pour sa bonne intégration aux tissus environnants. Ces deux points pourront être évalués par AFM (Joshi et al., 2022).

Enfin, ces hydrogels thermo-répondants à base d'infernane pourront être le socle des hydrogels développés dans le cadre des travaux envisagés dans le projet de l'Agence nationale de la recherche (ANR) PRC 2022 SMARTIES. L'objectif de ce projet est d'explorer une stratégie acellulaire par la conception d'un hydrogel bioactif, injectable et thermosensible destiné à la réparation d'une lésion ostéochondrale. L'efficacité de cet hydrogel sera évaluée *in vitro* et *in vivo* dans un modèle ovin. Ce projet constitue une étape importante dans le traitement des lésions cartilagineuses et ouvrira une nouvelle voie pour des essais cliniques futurs.

# Annexes

---



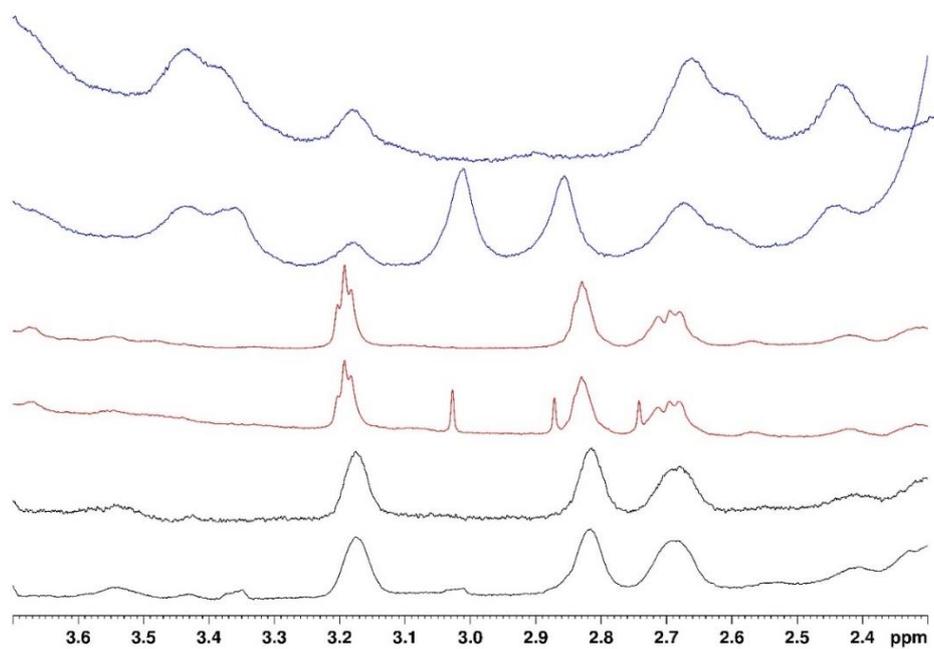


Figure S1. Spectres RMN-<sup>1</sup>H (en bas) et DOSY (en haut) (D<sub>2</sub>O, 600 MHz, 40 °C) de p5 (noir), d'EPS-p5-0% (rouge) et d'EPS-p5-2% (bleu).

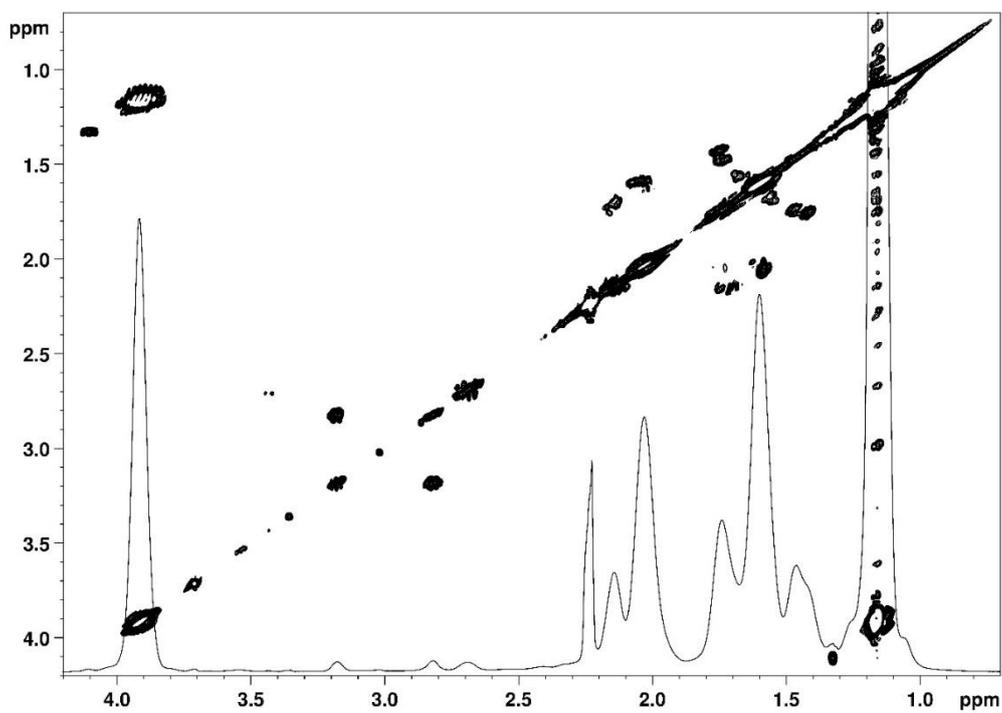


Figure S2. Spectres RMN-<sup>1</sup>H et COSY (D<sub>2</sub>O, 600 MHz, 40 °C) du p5.

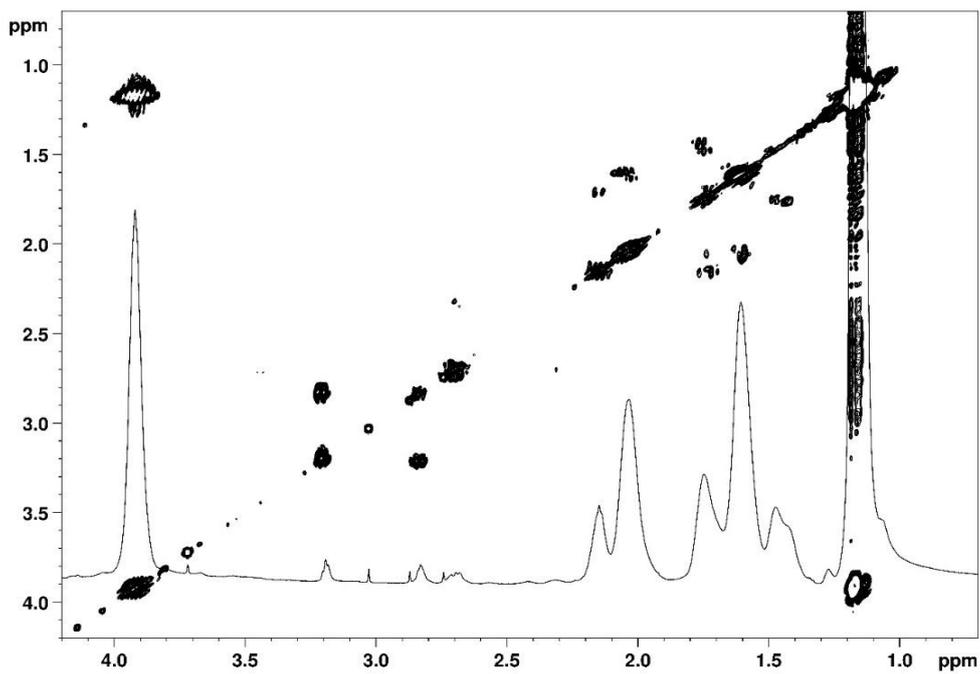


Figure S3. Spectres RMN- $^1\text{H}$  et COSY ( $\text{D}_2\text{O}$ , 600 MHz, 40 °C) de l'EPS-p5-0%.

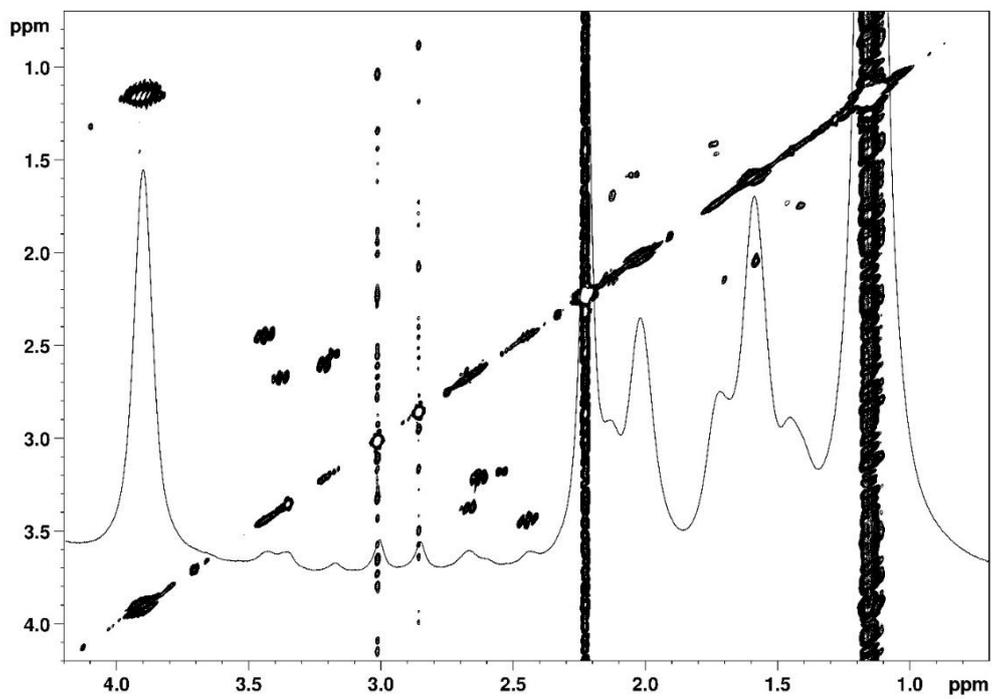


Figure S4. Spectres RMN- $^1\text{H}$  et COSY ( $\text{D}_2\text{O}$ , 600 MHz, 40 °C) de l'EPS-p5-2%.

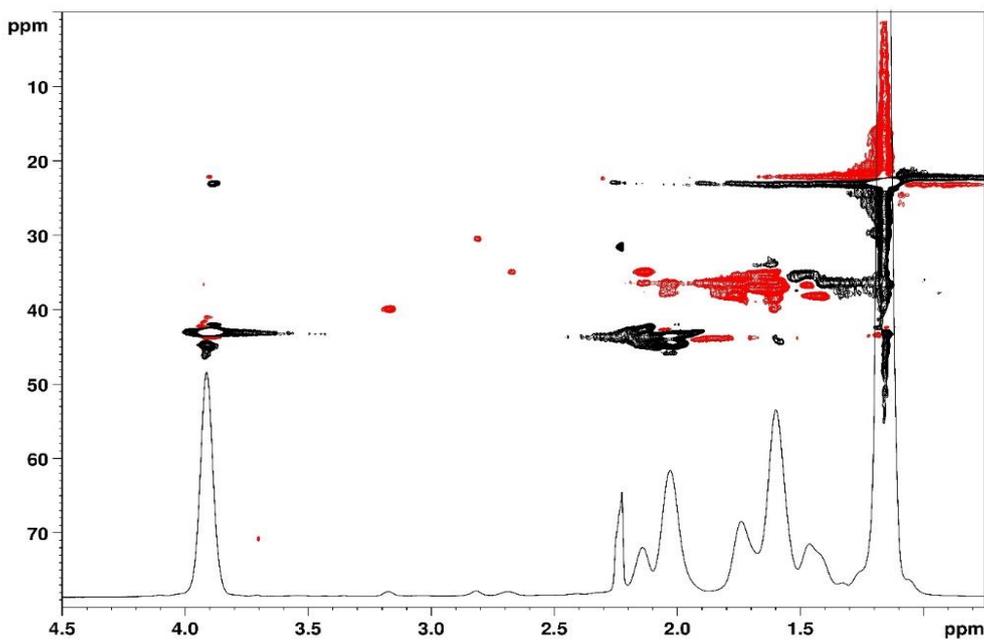


Figure S5. Spectres RMN- $^1\text{H}$  et  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -DEPT-HSQC ( $\text{D}_2\text{O}$ , 600 MHz, 40 °C, groupements  $\text{CH}_2$  en rouge, CH et  $\text{CH}_3$  en noir) du p5.

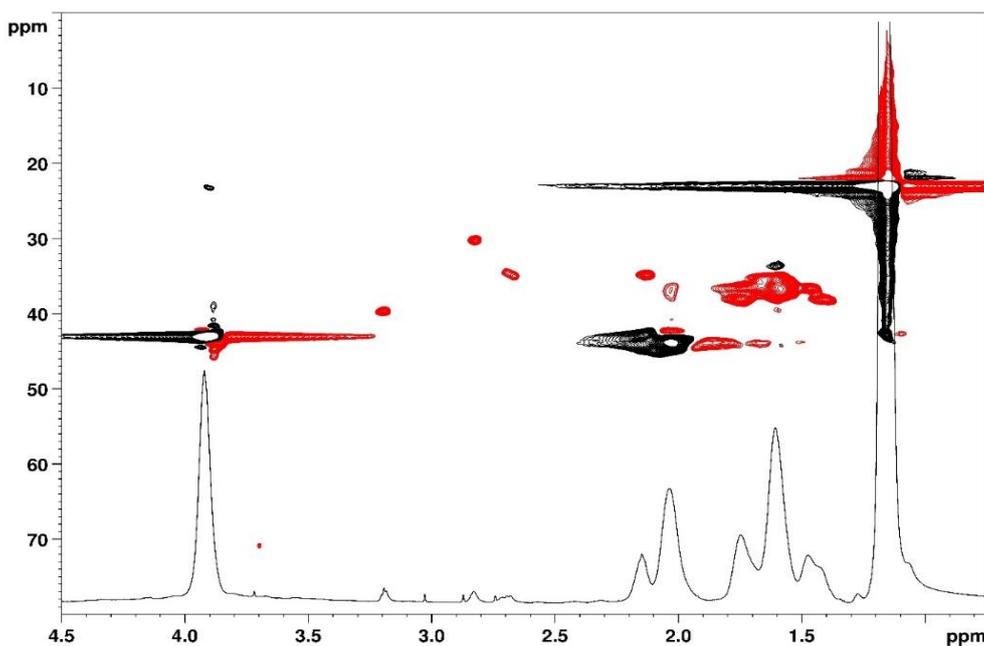


Figure S6. Spectres RMN- $^1\text{H}$  et  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -DEPT-HSQC ( $\text{D}_2\text{O}$ , 600 MHz, 40 °C, groupements  $\text{CH}_2$  en rouge, CH et  $\text{CH}_3$  en noir) de l'EPS-p5-0%.

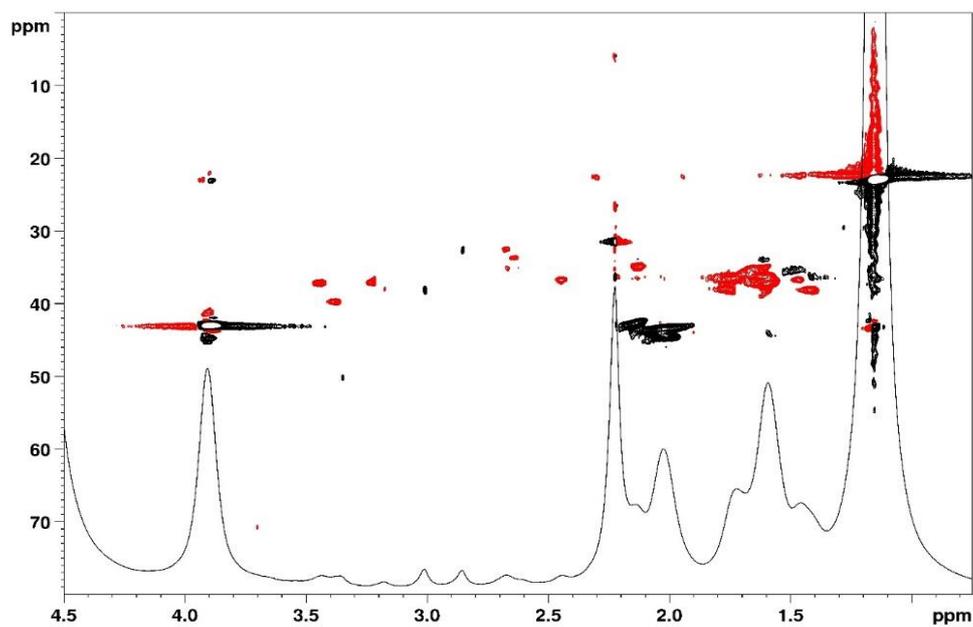


Figure S7. Spectres RMN- $^1\text{H}$  et  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -DEPT-HSQC ( $\text{D}_2\text{O}$ , 600 MHz, 40 °C, groupements  $\text{CH}_2$  en rouge,  $\text{CH}$  et  $\text{CH}_3$  en noir) de l'EPS-p5-2%.

# Références

---



## - A -

- Abaandou, L., Quan, D., Shiloach, J., 2021. Affecting HEK293 Cell Growth and Production Performance by Modifying the Expression of Specific Genes. *Cells* 10, 1667. <https://doi.org/10.3390/cells10071667>
- Abdi, F., Michel, R., Poirot, R., Dakir, M., Sancey, L., Ravaine, V., Auzély-Velty, R., 2020. Dynamic Covalent Chemistry Enables Reconfigurable All-Polysaccharide Nanogels. *Macromolecular Rapid Communications* 41, 2000213. <https://doi.org/10.1002/marc.202000213>
- Afloarea, O.-T., Cheaburu Yilmaz, C.N., Verestiuc, L., Bibire, N., 2022. Development of Vaginal Carriers Based on Chitosan-Grafted-PNIPAAm for Progesterone Administration. *Gels* 8, 596. <https://doi.org/10.3390/gels8090596>
- Afroze, F., Nies, E., Berghmans, H., 2000. Phase transitions in the system poly(N-isopropylacrylamide)/water and swelling behaviour of the corresponding networks. *Journal of Molecular Structure* 554, 55–68. [https://doi.org/10.1016/S0022-2860\(00\)00559-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2860(00)00559-7)
- Ahearne, M., 2014. Introduction to cell–hydrogel mechanosensing. *Interface Focus* 4, 20130038. <https://doi.org/10.1098/rsfs.2013.0038>
- Aigner, T., Stöve, J., 2003. Collagens—major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair. *Advanced Drug Delivery Reviews, Collagen in drug delivery and tissue engineering* 55, 1569–1593. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.08.009>
- Aisenbrey, E.A., Murphy, W.L., 2020. Synthetic alternatives to Matrigel. *Nat Rev Mater* 5, 539–551. <https://doi.org/10.1038/s41578-020-0199-8>
- Akbarzadeh Solbu, A., Koernig, A., Kjesbu, J.S., Zaytseva-Zotova, D., Sletmoen, M., Strand, B.L., 2022. High resolution imaging of soft alginate hydrogels by atomic force microscopy. *Carbohydrate Polymers* 276, 118804. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118804>
- Akoumany, K., Zykwincka, A., Siquin, C., Marchand, L., Fanuel, M., Ropartz, D., Rogniaux, H., Pipelier, M., Delbarre-Ladrat, C., Colliec-Jouault, S., 2019. Characterization of New Oligosaccharides Obtained by An Enzymatic Cleavage of the Exopolysaccharide Produced by the Deep-Sea Bacterium *Alteromonas infernus* Using its Cell Extract. *Molecules* 24, 3441. <https://doi.org/10.3390/molecules24193441>
- Alavarse, A.C., Frachini, E.C.G., da Silva, R.L.C.G., Lima, V.H., Shavandi, A., Petri, D.F.S., 2022. Crosslinkers for polysaccharides and proteins: Synthesis conditions, mechanisms, and crosslinking efficiency, a review. *International Journal of Biological Macromolecules* 202, 558–596. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.01.029>
- Alonso, J.M., Andrade del Olmo, J., Perez Gonzalez, R., Saez-Martinez, V., 2021. Injectable Hydrogels: From Laboratory to Industrialization. *Polymers (Basel)* 13, 650. <https://doi.org/10.3390/polym13040650>
- Ansari, M.J., Rajendran, R.R., Mohanto, S., Agarwal, U., Panda, K., Dhotre, K., Manne, R., Deepak, A., Zafar, A., Yasir, M., Pramanik, S., 2022. Poly(N-isopropylacrylamide)-Based Hydrogels for Biomedical Applications: A Review of the State-of-the-Art. *Gels* 8, 454. <https://doi.org/10.3390/gels8070454>
- Arjun, P., Freeman, J.L., Kannan, R.R., 2022. Neurospecific fabrication and toxicity assessment of a PNIPAM nanogel encapsulated with trans-tephrostachin for blood-brain-barrier permeability in zebrafish model. *Heliyon* 8, e10237. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e10237>

Armiento, A.R., Alini, M., Stoddart, M.J., 2019. Articular fibrocartilage - Why does hyaline cartilage fail to repair? *Advanced Drug Delivery Reviews*, Wound healing and fibrosis – State of play 146, 289–305. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.12.015>

Arnaoutova, I., George, J., Kleinman, H.K., Benton, G., 2012. Basement membrane matrix (BME) has multiple uses with stem cells. *Stem Cell Rev Rep* 8, 163–169. <https://doi.org/10.1007/s12015-011-9278-y>

Aston, R., Sewell, K., Klein, T., Lawrie, G., Grøndahl, L., 2016. Evaluation of the impact of freezing preparation techniques on the characterisation of alginate hydrogels by cryo-SEM. *European Polymer Journal* 82, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2016.06.025>

Atoufi, Z., Kamrava, S.K., Davachi, S.M., Hassanabadi, M., Saeedi Garakani, S., Alizadeh, R., Farhadi, M., Tavakol, S., Bagher, Z., Hashemi Motlagh, G., 2019. Injectable PNIPAM/Hyaluronic acid hydrogels containing multipurpose modified particles for cartilage tissue engineering: Synthesis, characterization, drug release and cell culture study. *International Journal of Biological Macromolecules* 139, 1168–1181. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.101>

## - B -

Bader, D., Lee, D., 2000. Chapter 4 - Structure – Properties of Soft Tissues Articular Cartilage, in: Elices, M. (Ed.), *Pergamon Materials Series, Structural Biological Materials*. Pergamon, pp. 75–103. [https://doi.org/10.1016/S1470-1804\(00\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S1470-1804(00)80008-5)

Badri, A., Williams, A., Linhardt, R.J., Koffas, M.A., 2018. The road to animal-free glycosaminoglycan production: current efforts and bottlenecks. *Current Opinion in Biotechnology* 53, 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.12.018>

Baei, P., Daemi, H., Aramesh, F., Baharvand, H., Eslaminejad, M.B., 2023. Advances in mechanically robust and biomimetic polysaccharide-based constructs for cartilage tissue engineering. *Carbohydrate Polymers* 308, 120650. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.120650>

Bajpayee, A.G., Grodzinsky, A.J., 2017. Cartilage-targeting drug delivery: can electrostatic interactions help? *Nat Rev Rheumatol* 13, 183–193. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2016.210>

Barbier, L., Protat, M., Pipart, P., Marcellan, A., Tran, Y., Hourdet, D., 2023. Sol/gel transition of thermoresponsive Hyaluronan: From liquids to elastic and sticky materials. *Carbohydrate Polymers* 310, 120715. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.120715>

Baumann, C., Hinckel, B., Bozynski, C., Farr, J., 2019. Articular Cartilage: Structure and Restoration: A Clinical Casebook, in: *Joint Preservation of the Knee: A Clinical Casebook*. pp. 3–24. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-01491-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-01491-9_1)

Bertrand, N., Fleischer, J.G., Wasan, K.M., Leroux, J.-C., 2009. Pharmacokinetics and biodistribution of N-isopropylacrylamide copolymers for the design of pH-sensitive liposomes. *Biomaterials* 30, 2598–2605. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.12.082>

Bhosale, A.M., Richardson, J.B., 2008. Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *Br Med Bull* 87, 77–95. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldn025>

Biot, M.A., 2004. General Theory of Three-Dimensional Consolidation. *Journal of Applied Physics* 12, 155–164. <https://doi.org/10.1063/1.1712886>

- Bischofberger, I., Calzolari, D.C.E., De Los Rios, P., Jelezarov, I., Trappe, V., 2014. Hydrophobic hydration of poly-N-isopropyl acrylamide: a matter of the mean energetic state of water. *Sci Rep* 4, 4377. <https://doi.org/10.1038/srep04377>
- Blumenkrantz, N., Asboe-Hansen, G., 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry* 54, 484–489. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(73\)90377-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(73)90377-1)
- Bokias, G., Mylonas, Y., Staikos, G., Bumbu, G.G., Vasile, C., 2001. Synthesis and Aqueous Solution Properties of Novel Thermoresponsive Graft Copolymers Based on a Carboxymethylcellulose Backbone. *Macromolecules* 34, 4958–4964. <https://doi.org/10.1021/ma010154e>
- Bonetti, L., De Nardo, L., Farè, S., 2021. Thermo-Responsive Methylcellulose Hydrogels: From Design to Applications as Smart Biomaterials. *Tissue Engineering Part B: Reviews* 27, 486–513. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2020.0202>
- Bove, M., Carlucci, A., Natale, G., Freda, C., Noro, A., Ferrara, V., Opromolla, G., Martone, M., Cascone, R., Messina, G., Izzo, A., Vicidomini, G., Santini, M., Fiorelli, A., 2021. Tissue Engineering in Musculoskeletal Tissue: A Review of the Literature. *Surgeries* 2, 58–82. <https://doi.org/10.3390/surgeries2010005>
- Bozzi, L., Milas, M., Rinaudo, M., 1996. Characterization and solution properties of a new exopolysaccharide excreted by the bacterium *Alteromonas* sp. strain 1644. *International Journal of Biological Macromolecules* 18, 9–17. [https://doi.org/10.1016/0141-8130\(95\)01038-6](https://doi.org/10.1016/0141-8130(95)01038-6)
- Bracke, J.W., Thacker, K., 1985. Hyaluronic acid from bacterial culture. US4517295A.
- Brannon-Peppas, L., Peppas, N.A., 1991. Equilibrium swelling behavior of pH-sensitive hydrogels. *Chemical Engineering Science* 46, 715–722. [https://doi.org/10.1016/0009-2509\(91\)80177-Z](https://doi.org/10.1016/0009-2509(91)80177-Z)
- Bugbee, W.D., Pallante-Kichura, A.L., Görtz, S., Amiel, D., Sah, R., 2016. Osteochondral Allograft Transplantation in Cartilage Repair: Graft Storage Paradigm, Translational Models, and Clinical Applications. *J Orthop Res* 34, 31–38. <https://doi.org/10.1002/jor.22998>
- Burdick, J.A., Prestwich, G.D., 2011. Hyaluronic Acid Hydrogels for Biomedical Applications. *Advanced Materials* 23, H41–H56. <https://doi.org/10.1002/adma.201003963>
- Bustamante-Torres, M., Romero-Fierro, D., Arcentales-Vera, B., Palomino, K., Magaña, H., Bucio, E., 2021. Hydrogels Classification According to the Physical or Chemical Interactions and as Stimuli-Sensitive Materials. *Gels* 7, 182. <https://doi.org/10.3390/gels7040182>

## - C -

- Candiello, J., Singh, S., Task, K., Kumta, P., Banerjee, I., 2013. Early differentiation patterning of mouse embryonic stem cells in response to variations in alginate substrate stiffness. *Journal of biological engineering* 7, 9. <https://doi.org/10.1186/1754-1611-7-9>
- Capella, V., Rivero, R.E., Liaudat, A.C., Ibarra, L.E., Roma, D.A., Alustiza, F., Mañas, F., Barbero, C.A., Bosch, P., Rivarola, C.R., Rodriguez, N., 2019. Cytotoxicity and bioadhesive properties of poly-N-isopropylacrylamide hydrogel. *Heliyon* 5, e01474. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01474>
- Carneiro, M.J.M., Paula, C.B.A., Ribeiro, I.S., de Lima, L.R.M., Ribeiro, F.O.S., Silva, D.A., Araújo, G.S., Marinho Filho, J.D.B., Araújo, A.J., Freire, R.S., Feitosa, J.P.A., de Paula, R.C.M., 2021. Dual responsive dextran-graft-poly (N-isopropylacrylamide)/doxorubicin prodrug via Schiff base reaction. *International Journal of Biological Macromolecules* 185, 390–402. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.06.095>

- Case, D., Ben-Shalom, I., Brozell, S.R., Cerutti, D.S., Cheatham, T., Cruzeiro, V.W.D., Darden, T., Duke, R., Ghoreishi, D., Gilson, M., Gohlke, H., Götz, A., Greene, D., Harris, R., Homeyer, N., Huang, Y., Izadi, S., Kovalenko, A., Kurtzman, T., Kollman, P.A., 2018. Amber 2018.
- Castell, J.V., Cervera, M., Marco, R., 1979. A convenient micromethod for the assay of primary amines and proteins with fluorecamine. A reexamination of the conditions of reaction. *Analytical Biochemistry* 99, 379–391. [https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(79\)80022-6](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(79)80022-6)
- Celikkin, N., Rinoldi, C., Costantini, M., Trombetta, M., Rainer, A., Świążkowski, W., 2017. Naturally derived proteins and glycosaminoglycan scaffolds for tissue engineering applications. *Materials Science and Engineering: C* 78, 1277–1299. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.04.016>
- Cesaretti, M., Luppi, E., Maccari, F., Volpi, N., 2003. A 96-well assay for uronic acid carbazole reaction. *Carbohydrate Polymers* 54, 59–61. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(03\)00144-9](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(03)00144-9)
- Chan, E.P., Hu, Y., Johnson, P.M., Suo, Z., Stafford, C.M., 2012. Spherical indentation testing of poroelastic relaxations in thin hydrogel layers. *Soft Matter* 8, 1492–1498. <https://doi.org/10.1039/C1SM06514A>
- Chan, L.C., Cox, B.G., 2007. Kinetics of Amide Formation through Carbodiimide/N-Hydroxybenzotriazole (HOBt) Couplings. *J. Org. Chem.* 72, 8863–8869. <https://doi.org/10.1021/jo701558y>
- Chaudhary, S., Jain, V.P., Jaiswar, G., 2022. Chapter 4 - The composition of polysaccharides: monosaccharides and binding, group decorating, polysaccharides chains, in: Singh, P., Manzoor, K., Ikram, S., Annamalai, P.K. (Eds.), *Innovation in Nano-Polysaccharides for Eco-Sustainability*. Elsevier, pp. 83–118. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823439-6.00005-2>
- Chaudhuri, O., Cooper-White, J., Janmey, P.A., Mooney, D.J., Shenoy, V.B., 2020. Effects of extracellular matrix viscoelasticity on cellular behaviour. *Nature* 584, 535–546. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2612-2>
- Chaudhuri, O., Gu, L., Klumpers, D., Darnell, M., Bencherif, S.A., Weaver, J.C., Huebsch, N., Lee, H., Lippens, E., Duda, G.N., Mooney, D.J., 2016. Hydrogels with tunable stress relaxation regulate stem cell fate and activity. *Nat Mater* 15, 326–334. <https://doi.org/10.1038/nmat4489>
- Chauhan, N., Saxena, K., Jain, U., 2022. Hydrogel based materials: A progressive approach towards advancement in biomedical applications. *Materials Today Communications* 33, 104369. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2022.104369>
- Chen, C.-T., Pawar, V.D., Munot, Y.S., Chen, C.-C., Hsu, C.-J., 2005. Diethylene glycol ether-linked 3,4,5-trihydroxybenzamides as triply branched dendritic anchors to CdSe/ZnS core/shell type nanoparticles: potential hydrophilic fluorescent probes. *Chem. Commun.* 2483–2485. <https://doi.org/10.1039/B418806C>
- Chen, F., Le, P., Lai, K., Fernandes-Cunha, G.M., Myung, D., 2020. Simultaneous Interpenetrating Polymer Network of Collagen and Hyaluronic Acid as an In Situ-Forming Corneal Defect Filler. *Chem. Mater.* 32, 5208–5216. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.0c01307>
- Chen, J.-P., Cheng, T.-H., 2009. Preparation and evaluation of thermo-reversible copolymer hydrogels containing chitosan and hyaluronic acid as injectable cell carriers. *Polymer* 50, 107–116. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2008.10.045>

- Chen, J.-P., Cheng, T.-H., 2006. Thermo-Responsive Chitosan-graft-poly(N-isopropylacrylamide) Injectable Hydrogel for Cultivation of Chondrocytes and Meniscus Cells. *Macromol. Biosci.* 6, 1026–1039. <https://doi.org/10.1002/mabi.200600142>
- Chen, J.-P., Leu, Y.-L., Fang, C.-L., Chen, C.-H., Fang, J.-Y., 2011. Thermosensitive Hydrogels Composed of Hyaluronic Acid and Gelatin as Carriers for the Intravesical Administration of Cisplatin. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 100, 655–666. <https://doi.org/10.1002/jps.22309>
- Cheng, Y.-S., Champlaud, M.-F., Burgeson, R.E., Marinkovich, M.P., Yurchenco, P.D., 1997. Self-assembly of Laminin Isoforms\*. *Journal of Biological Chemistry* 272, 31525–31532. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.50.31525>
- Chevalier, X., Richette, P., 2005. Cartilage articulaire normal : anatomie, physiologie, métabolisme, vieillissement. *EMC - Rhumatologie-Orthopédie* 2, 41–58. <https://doi.org/10.1016/j.emcrho.2004.10.005>
- Chong, B., Blank, L., Mclaughlin, R., Nielsen, L., 2005. Microbial hyaluronic acid production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 66, 341–351. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1774-4>
- Chopin, N., Sinquin, C., Ratiskol, J., Zykwinska, A., Weiss, P., Cérantola, S., Le Bideau, J., Collic-Jouault, S., 2015. A Direct Sulfation Process of a Marine Polysaccharide in Ionic Liquid. *Biomed Res Int* 2015, 508656. <https://doi.org/10.1155/2015/508656>
- Chung, C.-W., Kang, J.Y., Yoon, I.-S., Hwang, H.-D., Balakrishnan, P., Cho, H.-J., Chung, K.-D., Kang, D.-H., Kim, D.-D., 2011. Interpenetrating polymer network (IPN) scaffolds of sodium hyaluronate and sodium alginate for chondrocyte culture. *Colloids Surf B Biointerfaces* 88, 711–716. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.08.005>
- Chung, J.Y., Song, M., Ha, C.-W., Kim, J.-A., Lee, C.-H., Park, Y.-B., 2014. Comparison of articular cartilage repair with different hydrogel-human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell composites in a rat model. *Stem Cell Research & Therapy* 5, 39. <https://doi.org/10.1186/scrt427>
- Chyzy, A., Plonska-Brzezinska, M.E., 2020. Hydrogel Properties and Their Impact on Regenerative Medicine and Tissue Engineering. *Molecules* 25, 5795. <https://doi.org/10.3390/molecules25245795>
- Cimini, D., De Rosa, M., Carlino, E., Ruggiero, A., Schiraldi, C., 2013. Homologous overexpression of rfaH in E. coli K4 improves the production of chondroitin-like capsular polysaccharide. *Microb Cell Fact* 12, 46. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-46>
- Cimini, D., Restaino, O.F., Catapano, A., De Rosa, M., Schiraldi, C., 2010. Production of capsular polysaccharide from Escherichia coli K4 for biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 85, 1779–1787. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2261-8>
- Ciocoiu, O.-N., Staikos, G., Vasile, C., 2018. Thermoresponsive behavior of sodium alginate grafted with poly(N-isopropylacrylamide) in aqueous media. *Carbohydrate Polymers* 184, 118–126. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.059>
- Clouet, J., Vinatier, C., Merceron, C., Pot-vaucel, M., Maugars, Y., Weiss, P., Grimandi, G., Guicheux, J., 2009. From osteoarthritis treatments to future regenerative therapies for cartilage. *Drug Discov Today* 14, 913–925. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2009.07.012>
- Colas, G., Gervier, R., Lux, F., Viskov, C., 2006. Procédé de production de polysaccharide k5. FR2874931B1.

- Collic-Jouault, S., Esposito, F., Ledru, H., Siquin, C., Marchand, L., Fillaudeau, A., Routier, S., Buron, F., Lopin-Bon, C., Cuenot, S., Bedini, E., Zykwska, A., 2023. Glycosaminoglycan Mimetics Obtained by Microwave-Assisted Sulfation of Marine Bacterium Sourced Infernan Exopolysaccharide. *Biomacromolecules* 24, 462–470. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.2c01277>
- Constantin, M., Bucătariu, S., Stoica, I., Fundueanu, G., 2017. Smart nanoparticles based on pullulan-g-poly(N-isopropylacrylamide) for controlled delivery of indomethacin. *International Journal of Biological Macromolecules* 94, 698–708. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.064>
- Conzatti, G., Ayadi, F., Cavalie, S., Carrère, N., Tournette, A., 2019. Thermosensitive PNIPAM grafted alginate/chitosan PEC. *Applied Surface Science* 467–468, 940–948. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.10.269>
- Cook, M.T., Haddow, P., Kirton, S.B., McAuley, W.J., 2021. Polymers Exhibiting Lower Critical Solution Temperatures as a Route to Thermoreversible Gelators for Healthcare. *Advanced Functional Materials* 31, 2008123. <https://doi.org/10.1002/adfm.202008123>
- Cooperstein, M.A., Canavan, H.E., 2013. Assessment of cytotoxicity of (N-isopropyl acrylamide) and Poly(N-isopropyl acrylamide)-coated surfaces. *Biointerphases* 8, 19. <https://doi.org/10.1186/1559-4106-8-19>
- Cornette, V., Ramirez-Pastor, A.J., Nieto, F., 2003. Percolation of polyatomic species on a square lattice. *Eur. Phys. J. B* 36, 391–399. <https://doi.org/10.1140/epjb/e2003-00358-1>
- Coronado, R., Pekerar, S., Lorenzo, A., Sabino, M., 2011. Characterization of thermo-sensitive hydrogels based on poly(N-isopropylacrylamide)/hyaluronic acid. *Polymer Bulletin* 67, 101–124. <https://doi.org/10.1007/s00289-010-0407-6>
- Corrigan, N., Jung, K., Moad, G., Hawker, C.J., Matyjaszewski, K., Boyer, C., 2020. Reversible-deactivation radical polymerization (Controlled/living radical polymerization): From discovery to materials design and applications. *Progress in Polymer Science* 111, 101311. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2020.101311>
- Cortez-Lemus, N.A., Licea-Claverie, A., 2016. Poly(N-vinylcaprolactam), a comprehensive review on a thermoresponsive polymer becoming popular. *Progress in Polymer Science* 53, 1–51. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2015.08.001>
- Costa, M.C.M., Silva, S.M.C., Antunes, F.E., 2015. Adjusting the low critical solution temperature of poly(N-isopropyl acrylamide) solutions by salts, ionic surfactants and solvents: A rheological study. *Journal of Molecular Liquids, Surfactants in Solution. Selected Papers presented at the 20th International Symposium on Surfactants in Solution, 22 - 27 June 2014* 210, 113–118. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2015.02.008>
- Crosby, C.O., Stern, B., Kalkunte, N., Pedahzur, S., Ramesh, S., Zoldan, J., 2022. Interpenetrating polymer network hydrogels as bioactive scaffolds for tissue engineering. *Rev Chem Eng* 38, 347–361. <https://doi.org/10.1515/revce-2020-0039>
- Cuenot, S., Gélébart, P., Siquin, C., Collic-Jouault, S., Zykwska, A., 2022. Mechanical relaxations of hydrogels governed by their physical or chemical crosslinks. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 133, 105343. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2022.105343>
- Cui, N., Dai, C.-Y., Mao, X., Lv, X., Gu, Y., Lee, E.-S., Jiang, H.-B., Sun, Y., 2022. Ploxamer-Based Scaffolds for Tissue Engineering Applications: A Review. *Gels* 8, 360. <https://doi.org/10.3390/gels8060360>

## - D -

- Darie-Niță, R.N., Râpă, M., Frackowiak, S., 2022. Special Features of Polyester-Based Materials for Medical Applications. *Polymers (Basel)* 14, 951. <https://doi.org/10.3390/polym14050951>
- De Bernardo, S., Weigele, M., Toome, V., Manhart, K., Leimgruber, W., Böhlen, P., Stein, S., Udenfriend, S., 1974. Studies on the reaction of fluorescamine with primary amines. *Arch Biochem Biophys* 163, 390–399. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(74\)90490-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(74)90490-1)
- De Oliveira, T.E., Mukherji, D., Kremer, K., Netz, P.A., 2017. Effects of stereochemistry and copolymerization on the LCST of PNIPAm. *J Chem Phys* 146, 034904. <https://doi.org/10.1063/1.4974165>
- DeAngelis, P.L., 2012. Glycosaminoglycan polysaccharide biosynthesis and production: today and tomorrow. *Appl Microbiol Biotechnol* 94, 295–305. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3801-6>
- Debruyne, A.C., Okkelman, I.A., Dmitriev, R.I., 2023. Balance between the cell viability and death in 3D. *Semin Cell Dev Biol* 144, 55–66. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2022.09.005>
- Delbarre-Ladrat, C., Siquin, C., Lebellenger, L., Zykwincka, A., Collic-Jouault, S., 2014. Exopolysaccharides produced by marine bacteria and their applications as glycosaminoglycan-like molecules. *Front. Chem.* 2. <https://doi.org/10.3389/fchem.2014.00085>
- Deming, J.W., 1998. Deep ocean environmental biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* 9, 283–287. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(98\)80060-8](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(98)80060-8)
- Derayea, S.M., Samir, E., 2020. A review on the use of fluorescamine as versatile and convenient analytical probe. *Microchemical Journal* 156, 104835. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104835>
- Deshmukh, S.A., Sankaranarayanan, S.K.R.S., Suthar, K., Mancini, D.C., 2012. Role of solvation dynamics and local ordering of water in inducing conformational transitions in poly(N-isopropylacrylamide) oligomers through the LCST. *J Phys Chem B* 116, 2651–2663. <https://doi.org/10.1021/jp210788u>
- Despanie, J., Dhandhukia, J.P., Hamm-Alvarez, S.F., MacKay, J.A., 2016. Elastin-Like Polypeptides: Therapeutic Applications for an Emerging Class of Nanomedicines. *J Control Release* 240, 93–108. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.11.010>
- D’Este, M., Alini, M., Eglin, D., 2012. Single step synthesis and characterization of thermoresponsive hyaluronan hydrogels. *Carbohydrate Polymers* 90, 1378–1385. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.07.007>
- D’Este, M., Eglin, D., Alini, M., 2014. A systematic analysis of DMTMM vs EDC/NHS for ligation of amines to hyaluronan in water. *Carbohydr Polym* 108, 239–246. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.02.070>
- Ding, H., Li, B., Liu, Z., Liu, G., Pu, S., Feng, Y., Jia, D., Zhou, Y., 2020. Decoupled pH- and Thermo-Responsive Injectable Chitosan/PNIPAM Hydrogel via Thiol-Ene Click Chemistry for Potential Applications in Tissue Engineering. *Advanced Healthcare Materials* 9, 2000454. <https://doi.org/10.1002/adhm.202000454>
- Doblado, L.R., Martínez-Ramos, C., Pradas, M.M., 2021. Biomaterials for Neural Tissue Engineering. *Frontiers in Nanotechnology* 3.

Don, trong-ming, Chen, H.-R., 2005. Synthesis and characterization of AB-crosslinked graft copolymers based on maleilated chitosan and N-isopropylacrylamide. *Carbohydrate Polymers* 61, 334–347. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.05.025>

Dromel, P.C., Singh, D., Andres, E., Likes, M., Kurisawa, M., Alexander-Katz, A., Spector, M., Young, M., 2021. A bioinspired gelatin-hyaluronic acid-based hybrid interpenetrating network for the enhancement of retinal ganglion cells replacement therapy. *NPJ Regen Med* 6, 85. <https://doi.org/10.1038/s41536-021-00195-3>

Du, H., Wickramasinghe, R., Qian, X., 2010. Effects of Salt on the Lower Critical Solution Temperature of Poly (N-Isopropylacrylamide). *J. Phys. Chem. B* 114, 16594–16604. <https://doi.org/10.1021/jp105652c>

Dubreucq, G., Domon, B., Fournet, B., 1996. Structure determination of a novel uronic acid residue isolated from the exopolysaccharide produced by a bacterium originating from deep sea hydrothermal vents. *Carbohydr Res* 290, 175–181. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(96\)00155-3](https://doi.org/10.1016/0008-6215(96)00155-3)

### - E -

Ekerdt, B.L., Fuentes, C.M., Lei, Y., Adil, M.M., Ramasubramanian, A., Segalman, R.A., Schaffer, D.V., 2018. Thermoreversible Hyaluronic Acid-PNIPAAm Hydrogel Systems for 3D Stem Cell Culture. *Adv Healthc Mater* 7, e1800225. <https://doi.org/10.1002/adhm.201800225>

El Khadem, H.S., 2003. Carbohydrates, in: Meyers, R.A. (Ed.), *Encyclopedia of Physical Science and Technology* (Third Edition). Academic Press, New York, pp. 369–416. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227410-5/00080-6>

EMA, 2018. Sterilisation of the medicinal product, active substance, excipient and primary container - Scientific guideline [WWW Document]. European Medicines Agency. URL <https://www.ema.europa.eu/en/sterilisation-medicinal-product-active-substance-excipient-primary-container-scientific-guideline> (accessed 8.28.23).

Esdaille, C.J., Washington, K.S., Laurencin, C.T., 2021. Regenerative engineering: a review of recent advances and future directions. *Regen Med* 16, 495–512. <https://doi.org/10.2217/rme-2021-0016>

Essmann, U., Perera, L., Berkowitz, M.L., Darden, T., Lee, H., Pedersen, L.G., 1995. A smooth particle mesh Ewald method. *The Journal of Chemical Physics* 103, 8577–8593. <https://doi.org/10.1063/1.470117>

Evans, R.M.L., Tassieri, M., Auhl, D., Waigh, T.A., 2009. Direct conversion of rheological compliance measurements into storage and loss moduli. *Phys. Rev. E* 80, 012501. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.80.012501>

### - F -

Fan, Y., Liu, Y., Wu, Y., Dai, F., Yuan, M., Wang, F., Bai, Y., Deng, H., 2021. Natural polysaccharides based self-assembled nanoparticles for biomedical applications – A review. *International Journal of Biological Macromolecules* 192, 1240–1255. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.10.074>

Feeney, M., Casadei, M.A., Matricardi, P., 2009. Carboxymethyl derivative of scleroglucan: a novel thermosensitive hydrogel forming polysaccharide for drug delivery applications. *J Mater Sci: Mater Med* 20, 1081–1087. <https://doi.org/10.1007/s10856-008-3665-1>

- Ferreira, N.N., Ferreira, L.M.B., Cardoso, V.M.O., Boni, F.I., Souza, A.L.R., Gremião, M.P.D., 2018. Recent advances in smart hydrogels for biomedical applications: From self-assembly to functional approaches. *European Polymer Journal* 99, 117–133. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.12.004>
- Figueiredo, T., Cosenza, V., Ogawa, Y., Jeacomine, I., Vallet, A., Ortega, S., Michel, R., Olsson, J.D.M., Gerfaud, T., Boiteau, J.-G., Jing, J., Harris, C., Auzély-Velty, R., 2020. Boronic acid and diol-containing polymers: how to choose the correct couple to form “strong” hydrogels at physiological pH. *Soft Matter* 16, 3628–3641. <https://doi.org/10.1039/D0SM00178C>
- Finore, I., Di Donato, P., Mastascusa, V., Nicolaus, B., Poli, A., 2014. Fermentation technologies for the optimization of marine microbial exopolysaccharide production. *Mar Drugs* 12, 3005–3024. <https://doi.org/10.3390/md12053005>
- Flégeau, K., Pace, R., Gautier, H., Rethore, G., Guicheux, J., Le Visage, C., Weiss, P., 2017. Toward the development of biomimetic injectable and macroporous biohydrogels for regenerative medicine. *Adv Colloid Interface Sci* 247, 589–609. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.07.012>
- Flégeau, K., Toquet, C., Rethore, G., d'Arros, C., Messenger, L., Halgand, B., Dupont, D., Autrusseau, F., Leoeur, J., Veziers, J., Bordat, P., Bresin, A., Guicheux, J., Delplace, V., Gautier, H., & Weiss, P., 2020. In Situ Forming, Silanized Hyaluronic Acid Hydrogels with Fine Control Over Mechanical Properties and In Vivo Degradation for Tissue Engineering Applications. *Advanced Healthcare Materials*, 9, 19, 2000981. <https://doi.org/10.1002/adhm.202000981>.
- Flory, P.J., 1953. *Principles of Polymer Chemistry*. Cornell University Press.
- Flory, P.J., Rehner, J., 1943. Statistical Mechanics of Cross-Linked Polymer Networks II. Swelling. *The Journal of Chemical Physics* 11, 521–526. <https://doi.org/10.1063/1.1723792>
- Fox, A., Bedi, A., Rodeo, S., 2009. The Basic Science of Articular Cartilage: Structure, Composition, and Function. *Sports health* 1, 461–8. <https://doi.org/10.1177/1941738109350438>
- Freyria, A.-M., Mallein-Gerin, F., 2012. Chondrocytes or adult stem cells for cartilage repair: the indisputable role of growth factors. *Injury* 43, 259–265. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2011.05.035>
- Fuentes, C., Choi, J., Zielke, C., Peñarrieta, J.M., Lee, S., Nilsson, L., 2019. Comparison between conventional and frit-inlet channels in separation of biopolymers by asymmetric flow field-flow fractionation. *Analyst* 144, 4559–4568. <https://doi.org/10.1039/C9AN00466A>
- Fujishige, S., Kubota, K., Ando, I., 1989. Phase transition of aqueous solutions of poly(N-isopropylacrylamide) and poly(N-isopropylmethacrylamide). *J. Phys. Chem.* 93, 3311–3313. <https://doi.org/10.1021/j100345a085>
- Furyk, S., Zhang, Y., Ortiz-Acosta, D., Cremer, P.S., Bergbreiter, D.E., 2006. Effects of end group polarity and molecular weight on the lower critical solution temperature of poly(N-isopropylacrylamide). *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 44, 1492–1501. <https://doi.org/10.1002/pola.21256>
- G -
- Gaborieau, M., Castignolles, P., 2011. Size-exclusion chromatography (SEC) of branched polymers and polysaccharides. *Anal Bioanal Chem* 399, 1413–1423. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4221-7>

- Galante, R., Pinto, T.J.A., Colaço, R., Serro, A.P., 2018. Sterilization of hydrogels for biomedical applications: A review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 106, 2472–2492. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34048>
- Gan, M., Zhou, Q., Ge, J., Zhao, J., Wang, Y., Yan, Q., Wu, C., Yu, H., Xiao, Q., Wang, W., Yang, H., Zou, J., 2021. Precise in-situ release of microRNA from an injectable hydrogel induces bone regeneration. *Acta Biomater* 135, 289–303. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.08.041>
- Gandhi, N.S., Mancera, R.L., 2008. The Structure of Glycosaminoglycans and their Interactions with Proteins. *Chemical Biology & Drug Design* 72, 455–482. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2008.00741.x>
- Gao, L., Orth, P., Cucchiari, M., Madry, H., 2019. Autologous Matrix-Induced Chondrogenesis: A Systematic Review of the Clinical Evidence. *Am J Sports Med* 47, 222–231. <https://doi.org/10.1177/0363546517740575>
- Gélébart, P., Cuenot, S., Siquin, C., Halgand, B., Sourice, S., Le Visage, C., Guicheux, J., Collic-Jouault, S., Zykwin, A., 2022. Microgels based on Infernan, a glycosaminoglycan-mimetic bacterial exopolysaccharide, as BMP-2 delivery systems. *Carbohydrate Polymers* 284, 119191. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119191>
- Gharbi, I., Guettari, M., Chroudi, A., Touati, H., Hamza, S., 2020. Technologie de désinfection dans les hôpitaux : Effets nocifs des UVC Disinfection Technology in Hospitals: Harmful effects of UVC. *LA TUNISIE MEDICALE* 98.
- Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., Kempson, I., 2021. The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *Int J Mol Sci* 22, 12827. <https://doi.org/10.3390/ijms222312827>
- Gilbert, S.J., Blain, E.J., 2018. Chapter 4 - Cartilage mechanobiology: How chondrocytes respond to mechanical load, in: Verbruggen, S.W. (Ed.), *Mechanobiology in Health and Disease*. Academic Press, pp. 99–126. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812952-4.00004-0>
- Giovannini, G., Rossi, R.M., Boesel, L.F., 2021. Changes in Optical Properties upon Dye–Clay Interaction: Experimental Evaluation and Applications. *Nanomaterials* 11, 197. <https://doi.org/10.3390/nano11010197>
- Grabarek, Z., Gergely, J., 1990. Zero-length crosslinking procedure with the use of active esters. *Anal Biochem* 185, 131–135. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(90\)90267-d](https://doi.org/10.1016/0003-2697(90)90267-d)
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., Nairn, R., 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36, 59–74. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-36-1-59>
- Graham, S., Marina, P.F., Blencowe, A., 2019. Thermoresponsive polysaccharides and their thermoreversible physical hydrogel networks. *Carbohydrate Polymers* 207, 143–159. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.11.053>
- Grant, G.T., Morris, E.R., Rees, D.A., Smith, P.J.C., Thom, D., 1973. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model. *FEBS Letters* 32, 195–198. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(73\)80770-7](https://doi.org/10.1016/0014-5793(73)80770-7)

Grant, K.B., Patabhi, S., 2001. Use of a fluorescence microplate reader for the detection and characterization of metal-assisted peptide hydrolysis. *Anal Biochem* 289, 196–201. <https://doi.org/10.1006/abio.2000.4963>

Gresham, I.J., Willott, J.D., Johnson, E.C., Li, P., Webber, G.B., Wanless, E.J., Nelson, A.R.J., Prescott, S.W., 2023. Effect of surfactants on the thermoresponse of PNIPAM investigated in the brush geometry. *Journal of Colloid and Interface Science* 631, 260–271. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2022.10.071>

Guezennec, J., 2002. Deep-sea hydrothermal vents: a new source of innovative bacterial exopolysaccharides of biotechnological interest? *J Ind Microbiol Biotechnol* 29, 204–208. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000298>

Guezennec, J., Pignet, P., Lijour, Y., Gentric, E., Ratiskol, J., Collic-Jouault, S., 1998. Sulfation and depolymerization of a bacterial exopolysaccharide of hydrothermal origin. *Carbohydrate Polymers* 37, 19–24. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(98\)00006-X](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(98)00006-X)

Guo, H., Brûlet, A., Rajamohanam, P.R., Marcellan, A., Sanson, N., Hourdet, D., 2015. Influence of topology of LCST-based graft copolymers on responsive assembling in aqueous media. *Polymer* 60, 164–175. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2015.01.038>

Guo, H., De Magalhaes Goncalves, M., Ducouret, G., Hourdet, D., 2018. Cold and Hot Gelling of Alginate-*graft*-PNIPAM: a Schizophrenic Behavior Induced by Potassium Salts. *Biomacromolecules* 19, 576–587. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b01667>

Guo, Z., Li, S., Wang, C., Xu, J., Kirk, B., Wu, J., Liu, Z., Xue, W., 2017. Biocompatibility and cellular uptake mechanisms of poly(N-isopropylacrylamide) in different cells. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* 32, 17–31. <https://doi.org/10.1177/0883911516648969>

Gupta, N.R., Ghute, P.P., Badiger, M.V., 2011. Synthesis and characterization of thermo-sensitive graft copolymer of carboxymethyl guar and poly(N-isopropylacrylamide). *Carbohydrate Polymers* 83, 74–80. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.07.023>

## - H -

Ha, D.I., Lee, S.B., Chong, M.S., Lee, Y.M., Kim, S.Y., Park, Y.H., 2006. Preparation of thermo-responsive and injectable hydrogels based on hyaluronic acid and poly(N-isopropylacrylamide) and their drug release behaviors. *Macromol. Res.* 14, 87–93. <https://doi.org/10.1007/BF03219073>

Haddow, P., McAuley, W.J., Kirton, S.B., Cook, M.T., 2020. Poly(N-isopropyl acrylamide)–poly(ethylene glycol)–poly(N-isopropyl acrylamide) as a thermoreversible gelator for topical administration. *Mater. Adv.* 1, 371–386. <https://doi.org/10.1039/D0MA00080A>

Halperin, A., Kröger, M., Winnik, F.M., 2015. Poly(N-isopropylacrylamide) Phase Diagrams: Fifty Years of Research. *Angewandte Chemie International Edition* 54, 15342–15367. <https://doi.org/10.1002/anie.201506663>

Hamid, R., Rotshteyn, Y., Rabadi, L., Parikh, R., Bullock, P., 2004. Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. *Toxicol In Vitro* 18, 703–710. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2004.03.012>

Han, L., Grodzinsky, A.J., Ortiz, C., 2011. Nanomechanics of the Cartilage Extracellular Matrix. *Annu Rev Mater Res* 41, 133–168. <https://doi.org/10.1146/annurev-matsci-062910-100431>

- Haq, M.A., Su, Y., Wang, D., 2017. Mechanical properties of PNIPAM based hydrogels: A review. *Materials Science and Engineering: C* 70, 842–855. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.09.081>
- Haraguchi, Y., Shimizu, T., Matsuura, K., Sekine, H., Tanaka, N., Tadakuma, K., Yamato, M., Kaneko, M., Okano, T., 2014. Cell sheet technology for cardiac tissue engineering. *Methods Mol Biol* 1181, 139–155. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1047-2\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1047-2_13)
- Harimoto, M., Yamato, M., Hirose, M., Takahashi, C., Isoi, Y., Kikuchi, A., Okano, T., 2002. Novel approach for achieving double-layered cell sheets co-culture: overlaying endothelial cell sheets onto monolayer hepatocytes utilizing temperature-responsive culture dishes. *J Biomed Mater Res* 62, 464–470. <https://doi.org/10.1002/jbm.10228>
- Henry, N., Clouet, J., Fragale, A., Griveau, L., Chédeville, C., Véziers, J., Weiss, P., Le Bideau, J., Guicheux, J., Le Visage, C., 2017. Pullulan microbeads/Si-HPMC hydrogel injectable system for the sustained delivery of GDF-5 and TGF- $\beta$ 1: new insight into intervertebral disc regenerative medicine. *Drug Deliv* 24, 999–1010. <https://doi.org/10.1080/10717544.2017.1340362>
- Henschel, C., Schanzenbach, D., Laschewsky, A., Ko, C.-H., Papadakis, C.M., Müller-Buschbaum, P., 2023. Thermoresponsive and co-nonsolvency behavior of poly(N-vinyl isobutyramide) and poly(N-isopropyl methacrylamide) as poly(N-isopropyl acrylamide) analogs in aqueous media. *Colloid Polym Sci* 301, 703–720. <https://doi.org/10.1007/s00396-023-05083-4>
- Hertz, H., 1881. The Contact of Elastic Solids. *J Reine Angew, Math* 92, 156–171.
- Heskins, M., Guillet, J.E., 1968. Solution Properties of Poly(N-isopropylacrylamide). *Journal of Macromolecular Science: Part A - Chemistry* 2, 1441–1455. <https://doi.org/10.1080/10601326808051910>
- Heymann, D., Ruiz-Velasco, C., Chesneau, J., Ratiskol, J., Siquin, C., Collic-Jouault, S., 2016. Anti-Metastatic Properties of a Marine Bacterial Exopolysaccharide-Based Derivative Designed to Mimic Glycosaminoglycans. *Molecules* 21, 309. <https://doi.org/10.3390/molecules21030309>
- Hodder, E., Duin, S., Kilian, D., Ahlfeld, T., Seidel, J., Nachtigall, C., Bush, P., Covill, D., Gelinsky, M., Lode, A., 2019. Investigating the effect of sterilisation methods on the physical properties and cytocompatibility of methyl cellulose used in combination with alginate for 3D-bioplotting of chondrocytes. *J Mater Sci Mater Med* 30, 10. <https://doi.org/10.1007/s10856-018-6211-9>
- Hofmeister, F., 1888. On the understanding of the effects of salts 24, 247–260.
- Hoogenboom, R., Schlaad, H., 2017. Thermoresponsive poly(2-oxazoline)s, polypeptoids, and polypeptides. *Polymer Chemistry* 8, 24–40. <https://doi.org/10.1039/C6PY01320A>
- Hu, M., Yang, J., Xu, J., 2021. Structural and biological investigation of chitosan/hyaluronic acid with silanized-hydroxypropyl methylcellulose as an injectable reinforced interpenetrating network hydrogel for cartilage tissue engineering. *Drug Deliv* 28, 607–619. <https://doi.org/10.1080/10717544.2021.1895906>
- Hu, Y., Kim, Y., Jeong, J., Park, S., Shin, Y., Ki Hong, I., Sung Kim, M., Jung, S., 2022. Novel temperature/pH-responsive hydrogels based on succinoglycan/poly(N-isopropylacrylamide) with improved mechanical and swelling properties. *European Polymer Journal* 174, 111308. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2022.111308>

Hu, Y., Zhao, X., Vlassak, J.J., Suo, Z., 2010. Using indentation to characterize the poroelasticity of gels. *Applied Physics Letters* 96, 121904. <https://doi.org/10.1063/1.3370354>

Huang, D., Huang, Y., Xiao, Y., Yang, X., Lin, H., Feng, G., Zhu, X., Zhang, X., 2019. Viscoelasticity in natural tissues and engineered scaffolds for tissue reconstruction. *Acta Biomater* 97, 74–92. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.08.013>

Humphrey, W., Dalke, A., Schulten, K., 1996. VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph* 14, 33–38, 27–28. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5)

Hunziker, E.B., 2010. The structure of articular cartilage, in: *Regenerative Medicine and Biomaterials for the Repair of Connective Tissues*. Elsevier, pp. 83–105. <https://doi.org/10.1533/9781845697792.1.83>

Hunziker, E.B., 2002. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage* 10, 432–463. <https://doi.org/10.1053/joca.2002.0801>

- | -

Ilochonwu, B.C., Mihajlovic, M., Maas-Bakker, R.F., Rousou, C., Tang, M., Chen, M., Hennink, W.E., Vermonden, T., 2022. Hyaluronic Acid-PEG-Based Diels–Alder In Situ Forming Hydrogels for Sustained Intraocular Delivery of Bevacizumab. *Biomacromolecules* 23, 2914–2929. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.2c00383>

Inderhaug, E., Solheim, E., 2019. Osteochondral Autograft Transplant (Mosaicplasty) for Knee Articular Cartilage Defects. *JBJS Essent Surg Tech* 9, e34.1-2. <https://doi.org/10.2106/JBJS.ST.18.00113>

Iuchi, K., Oya, K., Hosoya, K., Sasaki, K., Sakurada, Y., Nakano, T., Hisatomi, H., 2020. Different morphologies of human embryonic kidney 293T cells in various types of culture dishes. *Cytotechnology* 72, 131–140. <https://doi.org/10.1007/s10616-019-00363-w>

- J -

Jana, S., Uchman, M., 2020. Poly(2-oxazoline)-based stimulus-responsive (Co)polymers: An overview of their design, solution properties, surface-chemistries and applications. *Progress in Polymer Science* 106, 101252. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2020.101252>

Janitermi, M., Jorsarai, S.G.A., Fattahi, E., 2022. Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells from Rat Bone Marrow on the Elastic Modulus of Electrospun Silk Fibroin Scaffolds. *Regen. Eng. Transl. Med.* 8, 125–133. <https://doi.org/10.1007/s40883-021-00199-x>

Jayawardena, I., Turunen, P., Cambraia Garms, B., Rowan, A., Corrie, S., Grøndahl, L., 2023. Evaluation of techniques used for visualisation of hydrogel morphology and determination of pore size distributions. *Materials Advances* 4, 669–682. <https://doi.org/10.1039/D2MA00932C>

Jeong, B., Kim, S.W., Bae, Y.H., 2012. Thermosensitive sol–gel reversible hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews* 64, 154–162. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.012>

Joshi, J., Homburg, S.V., Ehrmann, A., 2022. Atomic Force Microscopy (AFM) on Biopolymers and Hydrogels for Biotechnological Applications—Possibilities and Limits. *Polymers (Basel)* 14, 1267. <https://doi.org/10.3390/polym14061267>

Jouault, S.C., Chevolut, L., Helley, D., Ratiskol, J., Bros, A., Siquin, C., Roger, O., Fischer, A.-M., 2001. Characterization, chemical modifications and in vitro anticoagulant properties of an exopolysaccharide produced by *Alteromonas infernus*. *Biochimica et Biophysica Acta*.

- K -

Kaberova, Z., Karpushkin, E., Nevoralová, M., Vetrík, M., Šlouf, M., Dušková-Smrčková, M., 2020. Microscopic Structure of Swollen Hydrogels by Scanning Electron and Light Microscopies: Artifacts and Reality. *Polymers* 12, 578. <https://doi.org/10.3390/polym12030578>

Kamerling, J.P., Gerwig, G.J., Vliegthart, J.F., Clamp, J.R., 1975. Characterization by gas-liquid chromatography-mass spectrometry and proton-magnetic-resonance spectroscopy of pertrimethylsilyl methyl glycosides obtained in the methanolysis of glycoproteins and glycopeptides. *Biochem J* 151, 491–495. <https://doi.org/10.1042/bj1510491>

Kanazawa, H., Okano, T., 2011. Temperature-responsive chromatography for the separation of biomolecules. *J Chromatogr A* 1218, 8738–8747. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.04.015>

Kang, S.-W., Yoon, J.-R., Lee, J.-S., Kim, H.J., Lim, H.-W., Lim, H.C., Park, J.-H., Kim, B.-S., 2006. The use of poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres as injectable cell carriers for cartilage regeneration in rabbit knees. *J Biomater Sci Polym Ed* 17, 925–939. <https://doi.org/10.1163/156856206777996862>

Kang, Z., Zhou, Z., Wang, Y., Huang, H., Du, G., Chen, J., 2018. Bio-Based Strategies for Producing Glycosaminoglycans and Their Oligosaccharides. *Trends in Biotechnology* 36, 806–818. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.03.010>

Kasaai, M.R., 2004. Photodegradation and photo-crosslinking of polysaccharides. pp. 201–217.

Kielbassa, C., Roza, L., Epe, B., 1997. Wavelength dependence of oxidative DNA damage induced by UV and visible light. *Carcinogenesis* 18, 811–816. <https://doi.org/10.1093/carcin/18.4.811>

Kim, H., Witt, H., Oswald, T.A., Tarantola, M., 2020. Adhesion of Epithelial Cells to PNIPAm Treated Surfaces for Temperature-Controlled Cell-Sheet Harvesting. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 12, 33516–33529. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c09166>

Kim, J.-H., Yoo, S.-J., Oh, D.-K., Kweon, Y.-G., Park, D.-W., Lee, C.-H., Gil, G.-H., 1996. Selection of a *Streptococcus equi* mutant and optimization of culture condition for the production of high molecular weight hyaluronic acid. *Enzyme and Microbial Technology* 19, 440–445. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(96\)00019-1](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(96)00019-1)

Kim, Y., Zharkinbekov, Z., Razyieva, K., Tabyldiyeva, L., Berikova, K., Zhumagul, D., Temirkhanova, K., Saparov, A., 2023. Chitosan-Based Biomaterials for Tissue Regeneration. *Pharmaceutics* 15, 807. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15030807>

Kirschner, K.N., Yongye, A.B., Tschampel, S.M., González-Outeiriño, J., Daniels, C.R., Foley, B.L., Woods, R.J., 2008. GLYCAM06: A generalizable biomolecular force field. *Carbohydrates. Journal of Computational Chemistry* 29, 622–655. <https://doi.org/10.1002/jcc.20820>

Klouda, L., 2015. Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications: A seven-year update. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, Polymers for Drug Delivery Systems* 97, 338–349. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.05.017>

Köwitsch, A., Zhou, G., Groth, T., 2018. Medical application of glycosaminoglycans: a review. *J Tissue Eng Regen Med* 12, e23–e41. <https://doi.org/10.1002/term.2398>

Kozlovskaya, V., Kharlampieva, E., 2020. Self-Assemblies of Thermoresponsive Poly( *N* - vinylcaprolactam) Polymers for Applications in Biomedical Field. *ACS Appl. Polym. Mater.* 2, 26–39. <https://doi.org/10.1021/acsapm.9b00863>

Krishnamoorthy, S., Noorani, B., Xu, C., 2019. Effects of Encapsulated Cells on the Physical–Mechanical Properties and Microstructure of Gelatin Methacrylate Hydrogels. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 5061. <https://doi.org/10.3390/ijms20205061>

Krishnan, Y., Grodzinsky, A.J., 2018. Cartilage diseases. *Matrix Biol* 71–72, 51–69. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.05.005>

Kuo, J.W., Swann, D.A., Prestwich, G.D., 1991. Chemical modification of hyaluronic acid by carbodiimides. *Bioconjug Chem* 2, 232–241. <https://doi.org/10.1021/bc00010a007>

- L -

Lagneau, N., Tournier, P., Nativel, F., Maugars, Y., Guicheux, J., Le Visage, C., Delplace, V., 2023. Harnessing cell-material interactions to control stem cell secretion for osteoarthritis treatment. *Biomaterials* 296, 122091. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2023.122091>

Lai, J.-Y., Luo, L.-J., 2017. Chitosan- g -poly( *N* -isopropylacrylamide) copolymers as delivery carriers for intracameral pilocarpine administration. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 113, 140–148. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.11.038>

Lanzalaco, S., Armelin, E., 2017. Poly(*N*-isopropylacrylamide) and Copolymers: A Review on Recent Progresses in Biomedical Applications. *Gels* 3, 36. <https://doi.org/10.3390/gels3040036>

Laredo, J.-D., 2006. Nouvelles approches en imagerie du cartilage. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine* 190, 1459–1474. [https://doi.org/10.1016/S0001-4079\(19\)33206-6](https://doi.org/10.1016/S0001-4079(19)33206-6)

Laurienzo, P., 2010. Marine polysaccharides in pharmaceutical applications: an overview. *Mar Drugs* 8, 2435–2465. <https://doi.org/10.3390/md8092435>

Lawry, G.V., Bewyer, D., 2008. 1 - ANATOMY OF JOINTS, GENERAL CONSIDERATIONS, AND PRINCIPLES OF JOINT EXAMINATION, in: Lawry, G.V., Kreder, H.J., Hawker, G.A., Jerome, D. (Eds.), *Fam's Musculoskeletal Examination and Joint Injection Techniques (Second Edition)*. Mosby, Philadelphia, pp. 1–5. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-06504-7.10001-6>

Le Costaouëc, T., Cérantola, S., Ropartz, D., Ratiskol, J., Sinquin, C., Collic-Jouault, S., Boisset, C., 2012. Structural data on a bacterial exopolysaccharide produced by a deep-sea *Alteromonas macleodii* strain. *Carbohydr Polym* 90, 49–59. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.04.059>

Lee, D.-S., Choi, H.G., Chung, K.H., Lee, B.Y., Yoon, H.C., 2008. Fabrication of an integrated microfluidic device based on a heat-sensitive poly(*N*-isopropylacrylamide) polymer and micromachining protocols for programmed bio-molecular patterning. *Sensors and Actuators B: Chemical, Proceedings of the Eleventh International Meeting on Chemical Sensors IMCS-11* 130, 150–157. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2007.07.134>

Lee, E.H., Radok, J.R.M., 1960. The Contact Problem for Viscoelastic Bodies. *Journal of Applied Mechanics* 27, 438–444. <https://doi.org/10.1115/1.3644020>

Lee, H., Kim, J.Y., Choi, W., Moon, M.H., 2017. Effect of cationic monomer content on polyacrylamide copolymers by frit-inlet asymmetrical flow field-flow fractionation/multi-angle light scattering. *J Chromatogr A* 1503, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.04.057>

- Lee, H.-Y., Kim, H.-E., Jeong, S.-H., 2019. One-pot synthesis of silane-modified hyaluronic acid hydrogels for effective antibacterial drug delivery via sol-gel stabilization. *Colloids Surf B Biointerfaces* 174, 308–315. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.11.034>
- Lee, J.S., Zhou, W., Meng, F., Zhang, D., Otto, C., Feijen, J., 2010. Thermosensitive hydrogel-containing polymersomes for controlled drug delivery. *Journal of Controlled Release* 146, 400–408. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.06.002>
- Lesage, C., Lafont, M., Guihard, P., Weiss, P., Guicheux, J., Delplace, V., 2022. Material-Assisted Strategies for Osteochondral Defect Repair. *Advanced Science* 9, 2200050. <https://doi.org/10.1002/advs.202200050>
- Li, G., Qi, M., Yu, N., Liu, X., 2015. Hybrid vesicles co-assembled from anionic graft copolymer and metal ions for controlled drug release. *Chemical Engineering Journal* 262, 710–715. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.10.029>
- Li, H., Wu, C., Yu, X., Zhang, W., 2023. Recent advances of PVA-based hydrogels in cartilage repair application. *Journal of Materials Research and Technology* 24, 2279–2298. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2023.03.130>
- Li, Z., Xu, W., Wang, X., Jiang, W., Ma, X., Wang, F., Zhang, C., Ren, C., 2021. Fabrication of PVA/PAAm IPN hydrogel with high adhesion and enhanced mechanical properties for body sensors and antibacterial activity. *European Polymer Journal* 146, 110253. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.110253>
- Lima, L.H., Morales, Y., Cabral, T., 2016. Ocular Biocompatibility of Poly-N-Isopropylacrylamide (pNIPAM). *J Ophthalmol* 2016, 5356371. <https://doi.org/10.1155/2016/5356371>
- Lima, L.R.M., Cavalcante, C.M.W.S.A., Carneiro, M.J.M., Mendes, J.F.S., Sousa, N.A., Freire, R.S., Pinto, V.P.T., Fontenelle, R.O.S., Feitosa, J.P.A., de Paula, R.C.M., 2021. Thermal responsive poly-N-isopropylacrylamide/galactomannan copolymer nanoparticles as a potential amphotericin delivery carrier. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications* 2, 100126. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2021.100126>
- Lin, P., Clash, C., Pearce, E.M., Kwei, T.K., Aponte, M.A., 1988. Solubility and miscibility of poly(ethyl oxazoline). *J. Polym. Sci. B Polym. Phys.* 26, 603–619. <https://doi.org/10.1002/polb.1988.090260312>
- Lin, Y.Y., Hu, B.W., 2006. Load relaxation of a flat rigid circular indenter on a gel half space. *Journal of Non-Crystalline Solids* 352, 4034–4040. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2006.07.007>
- Lindenauer, K.G., Darby, J.L., 1994. Ultraviolet disinfection of wastewater: Effect of dose on subsequent photoreactivation. *Water Research* 28, 805–817. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(94\)90087-6](https://doi.org/10.1016/0043-1354(94)90087-6)
- Liu, H., Cheng, Y., Chen, J., Chang, F., Wang, J., Ding, J., Chen, X., 2018. Component effect of stem cell-loaded thermosensitive polypeptide hydrogels on cartilage repair. *Acta Biomater* 73, 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.04.035>
- Liu, K., Guo, L., Chen, X., Liu, L., Gao, C., 2023. Microbial synthesis of glycosaminoglycans and their oligosaccharides. *Trends Microbiol* 31, 369–383. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2022.11.003>

Liu, L., Xiang, Y., Wang, Z., Yang, X., Yu, X., Lu, Y., Deng, L., Cui, W., 2019. Adhesive liposomes loaded onto an injectable, self-healing and antibacterial hydrogel for promoting bone reconstruction. *NPG Asia Materials* 11, 81. <https://doi.org/10.1038/s41427-019-0185-z>

Liu, M., Song, X., Wen, Y., Zhu, J.-L., Li, J., 2017. Injectable Thermo-responsive Hydrogel Formed by Alginate-g-Poly(N-isopropylacrylamide) That Releases Doxorubicin-Encapsulated Micelles as a Smart Drug Delivery System. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 9, 35673–35682. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b12849>

Liu, M., Wen, Y., Song, X., Zhu, J.-L., Li, J., 2019. A smart thermo-responsive adsorption system for efficient copper ion removal based on alginate-g-poly(N-isopropylacrylamide) graft copolymer. *Carbohydrate Polymers* 219, 280–289. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.05.018>

Liu, W., Madry, H., Cucchiari, M., 2022. Application of Alginate Hydrogels for Next-Generation Articular Cartilage Regeneration. *Int J Mol Sci* 23, 1147. <https://doi.org/10.3390/ijms23031147>

Liu, W., Zhang, B., Lu, W.W., Li, X., Zhu, D., De Yao, K., Wang, Q., Zhao, C., Wang, C., 2004. A rapid temperature-responsive sol–gel reversible poly(N-isopropylacrylamide)-g-methylcellulose copolymer hydrogel. *Biomaterials* 25, 3005–3012. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.09.077>

Liu, Z., Zhang, S., Gao, C., Meng, X., Wang, S., Kong, F., 2022. Temperature/pH-Responsive Carboxymethyl Cellulose/Poly (N-isopropyl acrylamide) Interpenetrating Polymer Network Aerogels for Drug Delivery Systems. *Polymers (Basel)* 14, 1578. <https://doi.org/10.3390/polym14081578>

Loeser, R.F., 2014. Integrins and chondrocyte-matrix interactions in articular cartilage. *Matrix Biol* 39, 11–16. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2014.08.007>

Longhin, E.M., El Yamani, N., Rundén-Pran, E., Dusinska, M., 2022. The alamar blue assay in the context of safety testing of nanomaterials. *Front Toxicol* 4, 981701. <https://doi.org/10.3389/ftox.2022.981701>

Luckanagul, J.A., Pitakchatwong, C., Ratnatilaka Na Bhuket, P., Muangnoi, C., Rojsitthisak, Pranee, Chirachanchai, S., Wang, Q., Rojsitthisak, Pornchai, 2018. Chitosan-based polymer hybrids for thermo-responsive nanogel delivery of curcumin. *Carbohydrate Polymers* 181, 1119–1127. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.11.027>

Ly, M., Wang, Z., Laremore, T.N., Zhang, F., Zhong, W., Pu, D., Zagorevski, D.V., Dordick, J.S., Linhardt, R.J., 2011. Analysis of *E. coli* K5 capsular polysaccharide heparosan. *Anal Bioanal Chem* 399, 737–745. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3679-7>

## - M -

Madison, S., Carnali, J., 2013. pH Optimization of Amidation via Carbodiimides. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 52, 13547–13555. <https://doi.org/10.1021/ie401724m>

Mahinroosta, M., Jomeh Farsangi, Z., Allahverdi, A., Shakoobi, Z., 2018. Hydrogels as intelligent materials: A brief review of synthesis, properties and applications. *Materials Today Chemistry* 8, 42–55. <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2018.02.004>

Makshakova, O., Zykwincka, A., Cuenot, S., Collic-Jouault, S., Perez, S., 2022. Three-dimensional structures, dynamics and calcium-mediated interactions of the exopolysaccharide, Infernan, produced by the deep-sea hydrothermal bacterium *Alteromonas infernus*. *Carbohydrate Polymers* 276, 118732. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118732>

- Manavitehrani, I., Fathi, A., Badr, H., Daly, S., Negahi Shirazi, A., Dehghani, F., 2016. Biomedical Applications of Biodegradable Polyesters. *Polymers (Basel)* 8, 20. <https://doi.org/10.3390/polym8010020>
- Marian, M., Shah, R., Gashi, B., Zhang, S., Bhavnani, K., Wartzack, S., Rosenkranz, A., 2021. Exploring the lubrication mechanisms of synovial fluids for joint longevity – A perspective. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 206, 111926. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111926>
- Markert, C.D., Guo, X., Skardal, A., Wang, Z., Bharadwaj, S., Zhang, Y., Bonin, K., Guthold, M., 2013. Characterizing the micro-scale elastic modulus of hydrogels for use in regenerative medicine. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 27, 115–127. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2013.07.008>
- Marsili, L., Dal Bo, M., Eisele, G., Donati, I., Berti, F., Toffoli, G., 2021. Characterization of Thermoresponsive Poly-N-Vinylcaprolactam Polymers for Biological Applications. *Polymers* 13, 2639. <https://doi.org/10.3390/polym13162639>
- Martinez-Garcia, F.D., Fischer, T., Hayn, A., Mierke, C.T., Burgess, J.K., Harmsen, M.C., 2022. A Beginner's Guide to the Characterization of Hydrogel Microarchitecture for Cellular Applications. *Gels* 8, 535. <https://doi.org/10.3390/gels8090535>
- Matanović, M.R., Kristl, J., Grabnar, P.A., 2014. Thermoresponsive polymers: insights into decisive hydrogel characteristics, mechanisms of gelation, and promising biomedical applications. *Int J Pharm* 472, 262–275. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.06.029>
- Matou, S., Collic-Jouault, S., Helley, D., Ratiskol, J., Siquin, C., Boisset, C., Guezennec, J., Fischer, A.-M., 2007. Use of Low-Molecular-Weight Highly Sulfated Polysaccharide Derivatives for Modulating Angiogenesis. *US20070259833A1*.
- Mazières, B., Laroche, M., Constantin, A., Cantagrel, A. (Eds.), 2018. Chapitre 2 - L'articulation, entité fonctionnelle, in: *Rhumatologie pour le Praticien*. Elsevier, Paris, pp. 29–42. <https://doi.org/10.1016/B978-2-294-74832-5.00002-6>
- Mende, M., Bednarek, C., Wawryszyn, M., Sauter, P., Biskup, M.B., Schepers, U., Bräse, S., 2016. Chemical Synthesis of Glycosaminoglycans. *Chem. Rev.* 116, 8193–8255. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00010>
- Menezes, R., Vincent, R., Osorno, L., Hu, P., Arinze, T.L., 2023. Biomaterials and tissue engineering approaches using glycosaminoglycans for tissue repair: Lessons learned from the native extracellular matrix. *Acta Biomaterialia, The Mechanics of Cells and Fibers* 163, 210–227. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2022.09.064>
- Merceron, C., Portron, S., Vignes-Colombeix, C., Rederstorff, E., Masson, M., Lesoeur, J., Sourice, S., Siquin, C., Collic-Jouault, S., Weiss, P., Vinatier, C., Guicheux, J., 2012. Pharmacological Modulation of Human Mesenchymal Stem Cell Chondrogenesis by a Chemically Oversulfated Polysaccharide of Marine Origin: Potential Application to Cartilage Regenerative Medicine. *STEM CELLS* 30, 471–480. <https://doi.org/10.1002/stem.1686>
- Metawea, O.R.M., Abdelmoneem, M.A., Haiba, N.S., Khalil, H.H., Teleb, M., Elzoghby, A.O., Khafaga, A.F., Noreldin, A.E., Albericio, F., Khattab, S.N., 2021. A novel “smart” PNIPAM-based copolymer for breast cancer targeted therapy: Synthesis, and characterization of dual pH/temperature-responsive

- lactoferrin-targeted PNIPAM-co-AA. *Colloids Surf B Biointerfaces* 202, 111694. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111694>
- Minas, T., Ogura, T., Bryant, T., 2016. Autologous Chondrocyte Implantation. *JBS Essent Surg Tech* 6, e24. <https://doi.org/10.2106/JBJS.ST.16.00018>
- Mirahmadi, F., Tafazzoli-Shadpour, M., Shokrgozar, M.A., Bonakdar, S., 2013. Enhanced mechanical properties of thermosensitive chitosan hydrogel by silk fibers for cartilage tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 33, 4786–4794. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.07.043>
- Mohammed, A.S.A., Naveed, M., Jost, N., 2021. Polysaccharides; Classification, Chemical Properties, and Future Perspective Applications in Fields of Pharmacology and Biological Medicine (A Review of Current Applications and Upcoming Potentialities). *J Polym Environ* 29, 2359–2371. <https://doi.org/10.1007/s10924-021-02052-2>
- Mojarradi, H., 2011. Coupling of substances containing a primary amine to hyaluronan via carbodiimide-mediated amidation.
- Montalbetti, C., Falque, V., 2005. Amide Bond Formation and Peptide Coupling. *Tetrahedron* 61, 10827–10852. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2005.08.031>
- Montreuil, J., Bouquelet, S., Debray, H., Fournet, B., Spick, G., Strecker, G., 1986. Glycoproteins, in: Chaplin, M.F., F, K.J. (Eds.), *Carbohydrate Analysis. A Practical Approach*. IRL Press: Oxford, UK, pp. 143–204.
- Moon, H.J., Choi, B.G., Park, M.H., Joo, M.K., Jeong, B., 2011. Enzymatically degradable thermogelling poly(alanine-co-leucine)-poloxamer-poly(alanine-co-leucine). *Biomacromolecules* 12, 1234–1242. <https://doi.org/10.1021/bm101518c>
- Moreno-Guerra, J.A., Romero-Sánchez, I.C., Martínez-Borquez, A., Tassieri, M., Stiakakis, E., Laurati, M., 2019. Model-Free Rheo-AFM Probes the Viscoelasticity of Tunable DNA Soft Colloids. *Small* 15, 1904136. <https://doi.org/10.1002/smll.201904136>
- Mortisen, D., Peroglio, M., Alini, M., Eglin, D., 2010. Tailoring Thermoreversible Hyaluronan Hydrogels by “Click” Chemistry and RAFT Polymerization for Cell and Drug Therapy. *Biomacromolecules* 11, 1261–1272. <https://doi.org/10.1021/bm100046n>
- Mueller, M.B., Tuan, R.S., 2011. Anabolic/Catabolic balance in pathogenesis of osteoarthritis: identifying molecular targets. *PM R* 3, S3-11. <https://doi.org/10.1016/j.pmrj.2011.05.009>
- Müller, B., Kohn, D., 1999. [Indication for and performance of articular cartilage drilling using the Pridie method]. *Orthopade* 28, 4–10. <https://doi.org/10.1007/s001320050315>
- Munarin, F., Bozzini, S., Visai, L., Tanzi, M.C., Petrini, P., 2013. Sterilization treatments on polysaccharides: Effects and side effects on pectin. *Food Hydrocolloids* 31, 74–84. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.09.017>
- Murano, E., Perin, D., Khan, R., Bergamin, M., 2011. Hyaluronan: From Biomimetic to Industrial Business Strategy. *Natural Product Communications* 6, 1934578X1100600. <https://doi.org/10.1177/1934578X1100600415>
- Musarurwa, H., Tavengwa, N.T., 2022. Thermo-responsive polymers and advances in their applications in separation science. *Microchemical Journal* 179, 107554. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107554>

Muzzarelli, R.A.A., Greco, F., Busilacchi, A., Sollazzo, V., Gigante, A., 2012. Chitosan, hyaluronan and chondroitin sulfate in tissue engineering for cartilage regeneration: A review. *Carbohydrate Polymers* 89, 723–739. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.04.057>

- N -

Na, D., K, J., K, T., 2017. Fabrication of Functional High Density Cell Sheets for Tissue Engineering Using Spin-Coated poly(N-isopropylacrylamide)Thin Films. *Insights of Stem Cell Research and Therapy* 1.

Naahidi, S., Jafari, M., Logan, M., Wang, Y., Yuan, Y., Bae, H., Dixon, B., Chen, P., 2017. Biocompatibility of hydrogel-based scaffolds for tissue engineering applications. *Biotechnology Advances* 35, 530–544. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.05.006>

Nakajima, N., Ikada, Y., 1995. Mechanism of Amide Formation by Carbodiimide for Bioconjugation in Aqueous Media. *Bioconjugate Chem.* 6, 123–130. <https://doi.org/10.1021/bc00031a015>

Nalam, P.C., Gosvami, N.N., Caporizzo, M.A., Composto, R.J., Carpick, R.W., 2015. Nano-rheology of hydrogels using direct drive force modulation atomic force microscopy. *Soft Matter* 11, 8165–8178. <https://doi.org/10.1039/C5SM01143D>

Naor, D., 2016. Editorial: Interaction Between Hyaluronic Acid and Its Receptors (CD44, RHAMM) Regulates the Activity of Inflammation and Cancer. *Front Immunol* 7, 39. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00039>

Narayanan, G., Vernekar, V.N., Kuyinu, E.L., Laurencin, C.T., 2016. Poly (Lactic Acid)-Based Biomaterials for Orthopaedic Regenerative Engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 107, 247–276. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.04.015>

Narumi, A., Sato, S., Shen, X., Kakuchi, T., 2022. Precision synthesis for well-defined linear and/or architecturally controlled thermoresponsive poly(N-substituted acrylamide)s. *Polym. Chem.* 13, 1293–1319. <https://doi.org/10.1039/D1PY01449H>

Nativel, F., Renard, D., Hached, F., Pinta, P.-G., D'Arros, C., Weiss, P., Le Visage, C., Guicheux, J., Billon-Chabaud, A., Grimandi, G., 2018. Application of Millifluidics to Encapsulate and Support Viable Human Mesenchymal Stem Cells in a Polysaccharide Hydrogel. *Int J Mol Sci* 19, 1952. <https://doi.org/10.3390/ijms19071952>

Navaei, A., Truong, D., Heffernan, J., Cutts, J., Brafman, D., Sirianni, R.W., Vernon, B., Nikkhah, M., 2016. PNIPAAm-based biohybrid injectable hydrogel for cardiac tissue engineering. *Acta Biomater* 32, 10–23. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.12.019>

Neises, B., Steglich, W., 1978. Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids. *Angewandte Chemie International Edition in English* 17, 522–524. <https://doi.org/10.1002/anie.197805221>

Nemati Mahand, S., Aliakbarzadeh, S., Moghaddam, A., Salehi Moghaddam, A., Kruppke, B., Nasrollahzadeh, M., Khonakdar, H.A., 2022. Polyoxazoline: A review article from polymerization to smart behaviors and biomedical applications. *European Polymer Journal* 178, 111484. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2022.111484>

Nichols, C.M., Lardièrre, S.G., Bowman, J.P., Nichols, P.D., A E Gibson, J., Guézennec, J., 2005. Chemical characterization of exopolysaccharides from Antarctic marine bacteria. *Microb Ecol* 49, 578–589. <https://doi.org/10.1007/s00248-004-0093-8>

Nisbet, D.R., Crompton, K.E., Hamilton, S.D., Shirakawa, S., Prankerd, R.J., Finkelstein, D.I., Horne, M.K., Forsythe, J.S., 2006. Morphology and gelation of thermosensitive xyloglucan hydrogels. *Biophys Chem* 121, 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2005.12.005>

Nukavarapu, S.P., Dorcemus, D.L., 2013. Osteochondral tissue engineering: Current strategies and challenges. *Biotechnology Advances*, Pearl (30th) Anniversary Edition: Nanotechnology & Regenerative Medicine 31, 706–721. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.11.004>

## - O -

Olson, J.L., Atala, A., Yoo, J.J., 2011. Tissue Engineering: Current Strategies and Future Directions. *Chonnam Med J* 47, 1–13. <https://doi.org/10.4068/cmj.2011.47.1.1>

Ono, Y., Shikata, T., 2006. Hydration and Dynamic Behavior of Poly(N-isopropylacrylamide)s in Aqueous Solution: A Sharp Phase Transition at the Lower Critical Solution Temperature. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 10030–10031. <https://doi.org/10.1021/ja063990i>

Øvrebø, Ø., Perale, G., Wojciechowski, J.P., Echalièr, C., Jeffers, J.R.T., Stevens, M.M., Haugen, H.J., Rossi, F., 2022. Design and clinical application of injectable hydrogels for musculoskeletal therapy. *Bioengineering & Translational Medicine* 7, e10295. <https://doi.org/10.1002/btm2.10295>

## - P -

Pamies, R., Zhu, K., Kjøniksen, A.-L., Nyström, B., 2009. Thermal response of low molecular weight poly-(N-isopropylacrylamide) polymers in aqueous solution. *Polym. Bull.* 62, 487–502. <https://doi.org/10.1007/s00289-008-0029-4>

Pap, T., Bertrand, J., 2013. Syndecans in cartilage breakdown and synovial inflammation. *Nat Rev Rheumatol* 9, 43–55. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2012.178>

Pardeshi, S., Damiri, F., Zehravi, M., Joshi, R., Kapare, H., Prajapati, M.K., Munot, N., Berrada, M., Giram, P.S., Rojekar, S., Ali, F., Rahman, M.H., Barai, H.R., 2022. Functional Thermoresponsive Hydrogel Molecule to Material Design for Biomedical Applications. *Polymers (Basel)* 14, 3126. <https://doi.org/10.3390/polym14153126>

Park, K.M., Lee, S.Y., Joung, Y.K., Na, J.S., Lee, M.C., Park, K.D., 2009. Thermosensitive chitosan-Pluronic hydrogel as an injectable cell delivery carrier for cartilage regeneration. *Acta Biomater* 5, 1956–1965. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.01.040>

Peng, Z., Sun, H., Bunpetch, V., Koh, Y., Wen, Y., Wu, D., Ouyang, H., 2021. The regulation of cartilage extracellular matrix homeostasis in joint cartilage degeneration and regeneration. *Biomaterials* 268, 120555. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120555>

Peppas, N.A., Bures, P., Leobandung, W., Ichikawa, H., 2000. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *Eur J Pharm Biopharm* 50, 27–46. [https://doi.org/10.1016/s0939-6411\(00\)00090-4](https://doi.org/10.1016/s0939-6411(00)00090-4)

Peppas, N.A., Hoffman, A.S., 2020. Hydrogels, in: *Biomaterials Science*. Elsevier, pp. 153–166. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816137-1.00014-3>

Perez, S., Makshakova, O., Angulo, J., Bedini, E., Bisio, A., de Paz, J.L., Fadda, E., Guerrini, M., Hricovini, Michal, Hricovini, Milos, Lisacek, F., Nieto, P.M., Pagel, K., Paiardi, G., Richter, R., Samsonov, S.A., Vivès, R.R., Nikitovic, D., Ricard Blum, S., 2023. Glycosaminoglycans: What Remains To Be Deciphered? *JACS Au* 3, 628–656. <https://doi.org/10.1021/jacsau.2c00569>

Peroglio, M., Grad, S., Mortisen, D., Sprecher, C.M., Illien-Jünger, S., Alini, M., Eglin, D., 2012. Injectable thermoreversible hyaluronan-based hydrogels for nucleus pulposus cell encapsulation. *Eur Spine J* 21 Suppl 6, S839-849. <https://doi.org/10.1007/s00586-011-1976-2>

Pertici, V., Pin-Barre, C., Rivera, C., Pellegrino, C., Laurin, J., Gignes, D., Trimaille, T., 2018. Degradable and Injectable Hydrogel for Drug Delivery in Soft Tissues. *Biomacromolecules* 20. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.8b01242>

Petit, L., Karakasyan, C., Pantoustier, N., Hourdet, D., 2007. Synthesis of graft polyacrylamide with responsive self-assembling properties in aqueous media. *Polymer* 48, 7098–7112. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2007.09.040>

Petitou, M., van Boeckel, C.A.A., 2004. A synthetic antithrombin III binding pentasaccharide is now a drug! What comes next? *Angew Chem Int Ed Engl* 43, 3118–3133. <https://doi.org/10.1002/anie.200300640>

Pharmacopée européenne, 2017. Presentation - Methods of Preparation of Sterile Products - 2017 [WWW Document]. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. URL <https://www.edqm.eu/en/d/221073> (accessed 8.28.23).

Pnipam | Sigma-Aldrich [WWW Document], n.d. URL <https://www.sigmaaldrich.com/FR/fr/search/pnipam?focus=products&page=1&perpage=30&sort=relevance&term=pnipam&type=product> (accessed 9.21.23).

Podewitz, M., Wang, Y., Quoika, P.K., Loeffler, J.R., Schauerl, M., Liedl, K.R., 2019. Coil-Globule Transition Thermodynamics of Poly(N-isopropylacrylamide). *J Phys Chem B* 123, 8838–8847. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b06125>

Polymer Source [WWW Document], n.d. URL <https://www.polymersource.ca/index.php?route=product/maincategory> (accessed 9.21.23).

Poole, R., Kojima, T., Yasuda, T., Mwale, F., Kobayashi, M., Laverty, S., 2001. Composition and Structure of Articular Cartilage: A Template for Tissue Repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 391, S26–S33.

Poon, C., 2022. Measuring the density and viscosity of culture media for optimized computational fluid dynamics analysis of in vitro devices. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 126, 105024. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2021.105024>

Praillet, C., Grimaud, J., Lortat-Jacob, H., 1998. Les protéoglycanes. (I) Molécules aux multiples fonctions... futures molécules thérapeutiques? *Med Sci (Paris)* 14, 412. <https://doi.org/10.4267/10608/1056>

## - Q -

Qiao, S.-L., Mamuti, M., An, H.-W., Wang, H., 2022. Thermoresponsive Polymer Assemblies: From Molecular Design to Theranostics Application. *Progress in Polymer Science* 131, 101578. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2022.101578>

Qin, Z., Zhang, R., Xu, Y., Cao, Y., Xiao, L., 2021. A one-pot synthesis of thermosensitive PNIPAAm interpenetration polymer networks(IPN) hydrogels. *JCIS Open* 1, 100002. <https://doi.org/10.1016/j.jciso.2021.100002>

Qiu, X., Koga, T., Tanaka, F., Winnik, F.M., 2013. New insights into the effects of molecular weight and end group on the temperature-induced phase transition of poly(N-isopropylacrylamide) in water. *Sci. China Chem.* 56, 56–64. <https://doi.org/10.1007/s11426-012-4781-9>

- R -

Raguénès, G.H.C., Peres, A., Ruimy, R., Pignet, P., Christen, R., Loaec, M., Rougeaux, H., Barbier, G., Guezennec, J.G., 1997. *Alteromonas infernus* sp. nov., a new polysaccharide-producing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Journal of Applied Microbiology* 82, 422–430. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1997.00125.x>

Raina, N., Pahwa, R., Thakur, V.K., Gupta, M., 2022. Polysaccharide-based hydrogels: New insights and futuristic prospects in wound healing. *International Journal of Biological Macromolecules* 223, 1586–1603. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.11.115>

Raleigh, A.R., Mccarty, W., Chen, A.C., Meinert, C., Klein, T., Sah, R., 2017. Synovial Joints: Mechanobiology and Tissue Engineering of Articular Cartilage and Synovial Fluid, in: Reference Module in Materials Science and Materials Engineering. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803581-8.09304-8>

Ramirez, L.M.F., Rihouey, C., Chaubet, F., Le Cerf, D., Picton, L., 2021. Characterization of dextran particle size: How frit-inlet asymmetrical flow field-flow fractionation (FI-AF4) coupled online with dynamic light scattering (DLS) leads to enhanced size distribution. *Journal of Chromatography A* 1653, 462404. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462404>

Rampersad, S.N., 2012. Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Basel)* 12, 12347–12360. <https://doi.org/10.3390/s120912347>

Rana, M.M., De la Hoz Siegler, H., 2021. Tuning the Properties of PNIPAm-Based Hydrogel Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering. *Polymers (Basel)* 13, 3154. <https://doi.org/10.3390/polym13183154>

Ray, B., Okamoto, Y., Kamigaito, N., Sawamoto, M., Seno, K., Kanaoka, S., Aoshima, S., 2005. Effect of tacticity of poly(N-isopropylacrylamide) on the phase separation temperature of its aqueous solutions. *POLYMER JOURNAL* 37, 234–237.

Rederstorff, E., Fatimi, A., Siquin, C., Ratiskol, J., Merceron, C., Vinatier, C., Weiss, P., Collic-Jouault, S., 2011a. Sterilization of Exopolysaccharides Produced by Deep-Sea Bacteria: Impact on Their Stability and Degradation. *Marine Drugs* 9, 224–241. <https://doi.org/10.3390/md9020224>

Rederstorff, E., Rethore, G., Weiss, P., Sourice, S., Beck-Cormier, S., Mathieu, E., Maillason, M., Jacques, Y., Collic-Jouault, S., Fellah, B.H., Guicheux, J., Vinatier, C., 2017. Enriching a cellulose hydrogel with a biologically active marine exopolysaccharide for cell-based cartilage engineering: Polysaccharide hydrogel for cartilage engineering. *J Tissue Eng Regen Med* 11, 1152–1164. <https://doi.org/10.1002/term.2018>

Rederstorff, E., Weiss, P., Sourice, S., Pilet, P., Xie, F., Siquin, C., Collic-Jouault, S., Guicheux, J., Laïb, S., 2011b. An in vitro study of two GAG-like marine polysaccharides incorporated into injectable hydrogels for bone and cartilage tissue engineering. *Acta Biomaterialia* 7, 2119–2130. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.01.025>

Ricard-Blum, S., Perez, S., 2022. Glycosaminoglycan interaction networks and databases. *Current Opinion in Structural Biology* 74, 102355. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2022.102355>

- Rider, C.C., Mulloy, B., 2017. Heparin, Heparan Sulphate and the TGF- $\beta$  Cytokine Superfamily. *Molecules* 22, 713. <https://doi.org/10.3390/molecules22050713>
- Roger, O., Kervarec, N., Ratiskol, J., Collic-Jouault, S., Chevolut, L., 2004. Structural studies of the main exopolysaccharide produced by the deep-sea bacterium *Alteromonas infernus*. *Carbohydrate Research* 339, 2371–2380. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2004.07.021>
- Rogers, W.J., 2012. 7 - Sterilisation techniques for polymers, in: Lerouge, S., Simmons, A. (Eds.), *Sterilisation of Biomaterials and Medical Devices*, Woodhead Publishing Series in Biomaterials. Woodhead Publishing, pp. 151–211. <https://doi.org/10.1533/9780857096265.151>
- Rougeaux, H., Guezennec, J., Carlson, R.W., Kervarec, N., Pichon, R., Talaga, P., 1999a. Structural determination of the exopolysaccharide of *Pseudoalteromonas* strain HYD 721 isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Carbohydr Res* 315, 273–285. [https://doi.org/10.1016/s0008-6215\(99\)00019-1](https://doi.org/10.1016/s0008-6215(99)00019-1)
- Rougeaux, H., Kervarec, N., Pichon, R., Guezennec, J., 1999b. Structure of the exopolysaccharide of *Vibrio diabolicus* isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Carbohydr Res* 322, 40–45. [https://doi.org/10.1016/s0008-6215\(99\)00214-1](https://doi.org/10.1016/s0008-6215(99)00214-1)
- Rougeaux, H., Talaga, P., Carlson, R.W., Guezennec, J., 1998. Structural studies of an exopolysaccharide produced by *Alteromonas macleodii* subsp. *fijiensis* originating from a deep-sea hydrothermal vent. *Carbohydr Res* 312, 53–59. [https://doi.org/10.1016/s0008-6215\(97\)10061-1](https://doi.org/10.1016/s0008-6215(97)10061-1)
- Ruel-Gariépy, E., Leroux, J.-C., 2004. In situ-forming hydrogels—review of temperature-sensitive systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, The International Association of Pharmaceutical Technology (APV) 58, 409–426. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2004.03.019>
- Russo, E., Villa, C., 2019. Poloxamer Hydrogels for Biomedical Applications. *Pharmaceutics* 11, 671. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11120671>
- Rutala, W.A., Weber, D.J., 2016. Disinfection, sterilization, and antisepsis: An overview. *Am J Infect Control* 44, e1-6. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2015.10.038>
- Ryckaert, J.-P., Ciccotti, G., Berendsen, H.J.C., 1977. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *Journal of Computational Physics* 23, 327–341. [https://doi.org/10.1016/0021-9991\(77\)90098-5](https://doi.org/10.1016/0021-9991(77)90098-5)

- S -

- S. A. Bento, C., Gaspar, M.C., Coimbra, P., De Sousa, H.C., E. M. Braga, M., 2023. A review of conventional and emerging technologies for hydrogels sterilization. *International Journal of Pharmaceutics* 634, 122671. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.122671>
- Sabel-Grau, T., Tyushina, A., Babalik, C., Lensen, M.C., 2022. UV-VIS Curable PEG Hydrogels for Biomedical Applications with Multifunctionality. *Gels* 8, 164. <https://doi.org/10.3390/gels8030164>
- Safakas, K., Saravanou, S.-F., Iatridi, Z., Tsitsilianis, C., 2021. Alginate-g-PNIPAM-Based Thermo/Shear-Responsive Injectable Hydrogels: Tailoring the Rheological Properties by Adjusting the LCST of the Grafting Chains. *International Journal of Molecular Sciences* 22, 3824. <https://doi.org/10.3390/ijms22083824>
- Schild, H.G., 1992. Poly(N-isopropylacrylamide): experiment, theory and application. *Progress in Polymer Science* 17, 163–249. [https://doi.org/10.1016/0079-6700\(92\)90023-R](https://doi.org/10.1016/0079-6700(92)90023-R)

- Schiraldi, C., Cimini, D., De Rosa, M., 2010. Production of chondroitin sulfate and chondroitin. *Appl Microbiol Biotechnol* 87, 1209–1220. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2677-1>
- Šedová, P., Buffa, R., Šilhár, P., Kovářová, L., Vágnerová, H., Bednařík, J., Basarabová, I., Hejlová, L., Ščigalková, I., Šimek, M., Velebný, V., 2019. The effect of hydrazide linkers on hyaluronan hydrazone hydrogels. *Carbohydr Polym* 216, 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.04.011>
- Senni, K., Gueniche, F., Yousfi, M., Fioretti, F., Godeau, G.-J., Collic-Jouault, S., Ratiskol, J., Siquin, C., Raguene, G., Courtois, A., Guezennec, J., 2015. Sulfated depolymerized derivatives of exopolysaccharides (EPS) from mesophilic marine bacteria, method for preparing same, and uses thereof in tissue regeneration. US9125883B2.
- Shi, J., Yu, L., Ding, J., 2021. PEG-based thermosensitive and biodegradable hydrogels. *Acta Biomaterialia* 128, 42–59. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.04.009>
- Shin, D.Y., Hwang, E., Cho, I.-H., Moon, M.H., 2007. Molecular weight and structure characterization of sodium hyaluronate and its gamma radiation degradation products by flow field-flow fractionation and on-line multiangle light scattering. *J Chromatogr A* 1160, 270–275. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.05.047>
- Shiroya, T., Yasui, M., Fujimoto, K., Kawaguchi, H., 1995. Control of enzymatic activity using thermosensitive polymers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 4, 275–285. [https://doi.org/10.1016/0927-7765\(94\)01175-5](https://doi.org/10.1016/0927-7765(94)01175-5)
- Sivakumar, P.M., Yetisgin, A.A., Sahin, S.B., Demir, E., Cetinel, S., 2022. Bone tissue engineering: Anionic polysaccharides as promising scaffolds. *Carbohydr Polym* 283, 119142. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119142>
- Sodhi, H., Panitch, A., 2020. Glycosaminoglycans in Tissue Engineering: A Review. *Biomolecules* 11, 29. <https://doi.org/10.3390/biom11010029>
- Soledad Lencina, M. M., Iatridi, Z., Villar, M.A., Tsitsilianis, C., 2014. Thermoresponsive hydrogels from alginate-based graft copolymers. *European Polymer Journal* 61, 33–44. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2014.09.011>
- Solorzano, I.O. de, Bejagam, K.K., An, Y., Singh, S.K., Deshmukh, S.A., 2020. Solvation dynamics of N-substituted acrylamide polymers and the importance for phase transition behavior. *Soft Matter* 16, 1582–1593. <https://doi.org/10.1039/C9SM01798D>
- Song, S.J., Park, C.H., 2019. Microfracture for cartilage repair in the knee: current concepts and limitations of systematic reviews. *Ann Transl Med* 7, S108. <https://doi.org/10.21037/atm.2019.05.11>
- Spearman, B.S., Agrawal, N.K., Rubiano, A., Simmons, C.S., Mobini, S., Schmidt, C.E., 2020. Tunable methacrylated hyaluronic acid-based hydrogels as scaffolds for soft tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res A* 108, 279–291. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36814>
- Specht, E.H., Valley, H., Hills, N., Neher, H.T., Roham & Haas, 1956. Preparation of Acrylamide. 2,773,063.
- Sponchioni, M., Capasso Palmiero, U., Moscatelli, D., 2019. Thermo-responsive polymers: Applications of smart materials in drug delivery and tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C* 102, 589–605. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.04.069>

- Stampoultzis, T., Karami, P., Pioletti, D.P., 2021. Thoughts on cartilage tissue engineering: A 21st century perspective. *Current Research in Translational Medicine* 69, 103299. <https://doi.org/10.1016/j.retram.2021.103299>
- Staros, J.V., Wright, R.W., Swingle, D.M., 1986. Enhancement by N-hydroxysulfosuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions. *Anal Biochem* 156, 220–222. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(86\)90176-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90176-4)
- Stein, S., Böhlen, P., Udenfriend, S., 1974. Studies on the kinetics of reaction and hydrolysis of fluorescamine. *Arch Biochem Biophys* 163, 400–403. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(74\)90491-3](https://doi.org/10.1016/0003-9861(74)90491-3)
- Stoltz, J.F., Netter, P., Huselstein, C., de Isla, N., Wei Yang, J., Muller, S., 2005. Mécanobiologie du chondrocyte. Application à l'ingénierie du cartilage. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine* 189, 1803–1816. [https://doi.org/10.1016/S0001-4079\(19\)33437-5](https://doi.org/10.1016/S0001-4079(19)33437-5)
- Su, C., Liu, J., Yang, Z., Jiang, L., Liu, X., Shao, W., 2020. UV-mediated synthesis of carboxymethyl cellulose/poly-N-isopropylacrylamide composite hydrogels with triple stimuli-responsive swelling performances. *International Journal of Biological Macromolecules* 161, 1140–1148. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.094>
- Su, M., Ruan, L., Dong, X., Tian, S., Lang, W., Wu, M., Chen, Y., Lv, Q., Lei, L., 2023. Current state of knowledge on intelligent-response biological and other macromolecular hydrogels in biomedical engineering: A review. *International Journal of Biological Macromolecules* 227, 472–492. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.12.148>
- Subramani, R., Izquierdo-Alvarez, A., Bhattacharya, P., Meerts, M., Moldenaers, P., Ramon, H., Van Oosterwyck, H., 2020. The Influence of Swelling on Elastic Properties of Polyacrylamide Hydrogels. *Frontiers in Materials* 7.
- Sugiura, S., Imano, W., Takagi, T., Sakai, K., Kanamori, T., 2009. Thermoresponsive protein adsorption of poly(N-isopropylacrylamide)-modified streptavidin on polydimethylsiloxane microchannel surfaces. *Biosens Bioelectron* 24, 1135–1140. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.06.038>
- Suliman, F.E.O., Al-Lawati, Z.H., Al-Kindy, S.M.Z., 2008. A Spectrofluorimetric Sequential Injection Method for the Determination of Penicillamine Using Fluorescamine in the Presence of  $\beta$ -cyclodextrins. *J Fluoresc* 18, 1131–1138. <https://doi.org/10.1007/s10895-008-0363-9>
- Sun, Ting Wang, Jianhui Pang, Xiguang Chen, Ya Liu, 2020. Hydroxybutyl Chitosan Centered Biocomposites for Potential Curative Applications: A Critical Review. *Biomacromolecules* 21, 1351–1367. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00071>
- Sun, X., DenHartog, E., Zhang, X., McCord, M., 2018. Study of poly(N-isopropylacrylamide) grafted cotton fabrics initiated by atmospheric pressure plasma. *Applied Surface Science* 453, 182–191. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.05.056>
- Supper, S., Anton, N., Seidel, N., Riemenschnitter, M., Curdy, C., Vandamme, T., 2014. Thermosensitive chitosan/glycerophosphate-based hydrogel and its derivatives in pharmaceutical and biomedical applications. *Expert Opin Drug Deliv* 11, 249–267. <https://doi.org/10.1517/17425247.2014.867326>
- Suwan, J., Torelli, A., Onishi, A., Dordick, J.S., Linhardt, R.J., 2012. Addressing endotoxin issues in bioengineered heparin. *Biotechnol Appl Biochem* 59, 420–428. <https://doi.org/10.1002/bab.1042>
- Svanholm, L., Köttö, A., Deuda Lundkvist, S., 2021. Ion specific effects in polymer conformation.

Symbol Nomenclature for Glycans (SNFG) - NCBI [WWW Document], n.d. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/glycans/snfg.html> (accessed 9.20.23).

- T -

Tan, R., She, Z., Wang, M., Fang, Z., Liu, Y., Feng, Q., 2012. Thermo-sensitive alginate-based injectable hydrogel for tissue engineering. *Carbohydrate Polymers* 87, 1515–1521. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.09.048>

Tang, L., Wang, L., Yang, X., Feng, Y., Li, Y., Feng, W., 2021. Poly(N-isopropylacrylamide)-based smart hydrogels: Design, properties and applications. *Progress in Materials Science* 115, 100702. <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2020.100702>

Tang, S., Richardson, B.M., Anseth, K.S., 2021. Dynamic covalent hydrogels as biomaterials to mimic the viscoelasticity of soft tissues. *Progress in Materials Science* 120, 100738. <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2020.100738>

Tang, S., Zhao, L., Yuan, J., Chen, Y., Leng, Y., 2020. Chapter 3 - Physical hydrogels based on natural polymers, in: Chen, Y. (Ed.), *Hydrogels Based on Natural Polymers*. Elsevier, pp. 51–89. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816421-1.00003-3>

Tavagnacco, L., Zaccarelli, E., Chiessi, E., 2020. Molecular description of the coil-to-globule transition of Poly(N-isopropylacrylamide) in water/ethanol mixture at low alcohol concentration. *Journal of Molecular Liquids* 297, 111928. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111928>

Tavagnacco, L., Zaccarelli, E., Chiessi, E., 2018. On the molecular origin of the cooperative coil-to-globule transition of poly( N -isopropylacrylamide) in water. *Physical Chemistry Chemical Physics* 20, 9997–10010. <https://doi.org/10.1039/C8CP00537K>

Tenhu, H., Niskanen, J., 2016. How to manipulate the upper critical solution temperature (UCST)? *Polym. Chem.* 8. <https://doi.org/10.1039/C6PY01612J>

Ter Boo, G.-J.A., Arens, D., Metsemakers, W.-J., Zeiter, S., Richards, R.G., Grijpma, D.W., Eglin, D., Moriarty, T.F., 2016. Injectable gentamicin-loaded thermo-responsive hyaluronic acid derivative prevents infection in a rabbit model. *Acta Biomater* 43, 185–194. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.07.029>

Themes, U.F.O., 2019. Articular Cartilage Lesion. *Musculoskeletal Key*. URL <https://musculoskeletalkey.com/articular-cartilage-lesion/> (accessed 9.19.23).

Tian, X., Chen, X., 2014. Effects of Cell Density on Mechanical Properties of Alginate Hydrogel Tissue Scaffolds. *Journal of Biomimetics, Biomaterials, and Tissue Engineering* 19, 77–85. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/JBBTE.19.77>

Totlis, T., Marín Fermín, T., Kalifis, G., Terzidis, I., Maffulli, N., Papakostas, E., 2021. Arthroscopic debridement for focal articular cartilage lesions of the knee: A systematic review. *Surgeon* 19, 356–364. <https://doi.org/10.1016/j.surge.2020.11.011>

Tran, H.D.N., Park, K.D., Ching, Y.C., Huynh, C., Nguyen, D.H., 2020. A comprehensive review on polymeric hydrogel and its composite: Matrices of choice for bone and cartilage tissue engineering. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 89, 58–82. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2020.06.017>

Tzounis, P.-N., Anogiannakis, S.D., Theodorou, D.N., 2017. General Methodology for Estimating the Stiffness of Polymer Chains from Their Chemical Constitution: A Single Unperturbed Chain Monte Carlo Algorithm. *Macromolecules* 50, 4575–4587. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.7b00645>

- U -

Udenfriend, S., Stein, S., Böhlen, P., Dairman, W., Leimgruber, W., Weigele, M., 1972. Fluorescamine: A Reagent for Assay of Amino Acids, Peptides, Proteins, and Primary Amines in the Picomole Range. *Science* 178, 871–872. <https://doi.org/10.1126/science.178.4063.871>

UV-C Dose Required to Kill Microorganisms, 2021. . UV Light Technology. URL <https://uv-light.co.uk/uv-dosage-required-to-kill-microorganisms/> (accessed 8.28.23).

- V -

Van den Hoogen, B.M., van Weeren, P.R., Lopes-Cardozo, M., van Golde, L.M., Barneveld, A., van de Lest, C.H., 1998. A microtiter plate assay for the determination of uronic acids. *Anal Biochem* 257, 107–111. <https://doi.org/10.1006/abio.1997.2538>

Varghese, J.M., Ismail, Y.A., Lee, C.K., Shin, K.M., Shin, M.K., Kim, S.I., So, I., Kim, S.J., 2008. Thermoresponsive hydrogels based on poly(N-isopropylacrylamide)/chondroitin sulfate. *Sensors and Actuators B: Chemical* 135, 336–341. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2008.09.001>

Varki, A., Cummings, R.D., Aebi, M., Packer, N.H., Seeberger, P.H., Esko, J.D., Stanley, P., Hart, G., Darvill, A., Kinoshita, T., Prestegard, J.J., Schnaar, R.L., Freeze, H.H., Marth, J.D., Bertozzi, C.R., Etzler, M.E., Frank, M., Vliegthart, J.F., Lütke, T., Perez, S., Bolton, E., Rudd, P., Paulson, J., Kanehisa, M., Toukach, P., Aoki-Kinoshita, K.F., Dell, A., Narimatsu, H., York, W., Taniguchi, N., Kornfeld, S., 2015. Symbol Nomenclature for Graphical Representations of Glycans. *Glycobiology* 25, 1323–1324. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwv091>

Vasile, C., Nita, L.E., 2011. Novel multi-stimuli responsive sodium alginate-grafted-poly(N-isopropylacrylamide) copolymers: II. Dilute solution properties. *Carbohydrate Polymers* 86, 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.04.012>

Veraldi, N., Quadri, I.D., van de Looij, Y., Modernell, L.M., Siquin, C., Zykwincka, A., Tournier, B.B., Dalonneau, F., Li, H., Li, J.-P., Millet, P., Vives, R., Collic-Jouault, S., de Agostini, A., Sanches, E.F., Sizonenko, S.V., 2023. Low-molecular weight sulfated marine polysaccharides: Promising molecules to prevent neurodegeneration in mucopolysaccharidosis IIIA? *Carbohydrate Polymers* 320, 121214. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.121214>

Vignon, É., 2000. Structure et métabolisme du cartilage articulaire. *Revue du Rhumatisme* 67, 112–118. [https://doi.org/10.1016/S1169-8330\(00\)80088-5](https://doi.org/10.1016/S1169-8330(00)80088-5)

Vilaplana, F., Gilbert, R.G., 2010. Characterization of branched polysaccharides using multiple-detection size separation techniques. *Journal of Separation Science* 33, 3537–3554. <https://doi.org/10.1002/jssc.201000525>

Vinatier, C., Magne, D., Weiss, P., Trojani, C., Rochet, N., Carle, G.F., Vignes-Colombeix, C., Chadjichristos, C., Galera, P., Daculsi, G., Guicheux, J., 2005. A silanized hydroxypropyl methylcellulose hydrogel for the three-dimensional culture of chondrocytes. *Biomaterials* 26, 6643–6651. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.04.057>

Vincent, P., Pignet, P., Talmont, F., Bozzi, L., Fournet, B., Guezennec, J., Jeanthon, C., Prieur, D., 1994. Production and Characterization of an Exopolysaccharide Excreted by a Deep-Sea Hydrothermal Vent Bacterium Isolated from the Polychaete Annelid *Alvinella pompejana*. *Appl Environ Microbiol* 60, 4134–4141. <https://doi.org/10.1128/aem.60.11.4134-4141.1994>

Vining, K.H., Mooney, D.J., 2017. Mechanical forces direct stem cell behaviour in development and regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 18, 728–742. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.108>

- W -

Wang, C.-Z., Eswaramoorthy, R., Lin, T.-H., Chen, C.-H., Fu, Y.-C., Wang, C.-K., Wu, S.-C., Wang, G.-J., Chang, J.-K., Ho, M.-L., 2018. Enhancement of chondrogenesis of adipose-derived stem cells in HA-PNIPAAm-CL hydrogel for cartilage regeneration in rabbits. *Sci Rep* 8, 10526. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28893-x>

Wang, J., Wang, W., Kollman, P.A., Case, D.A., 2006. Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations. *J Mol Graph Model* 25, 247–260. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2005.12.005>

Wang, J., Wolf, R.M., Caldwell, J.W., Kollman, P.A., Case, D.A., 2004. Development and testing of a general amber force field. *Journal of Computational Chemistry* 25, 1157–1174. <https://doi.org/10.1002/jcc.20035>

Wang, K., Chen, G., Weng, S., Hou, L., Ye, D., Jiang, X., 2023. Thermo-Responsive Poly(N-isopropylacrylamide)/Hydroxypropylmethyl Cellulose Hydrogel with High Luminous Transmittance and Solar Modulation for Smart Windows. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 15, 4385–4397. <https://doi.org/10.1021/acsami.2c15367>

Wang, W., Dai, J., Huang, Y., Li, X., Yang, J., Zheng, Y., Shi, X., 2023. Extracellular matrix mimicking dynamic interpenetrating network hydrogel for skin tissue engineering. *Chemical Engineering Journal* 457, 141362. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2023.141362>

Wang, X., Li, Z., Shi, T., Zhao, P., An, K., Lin, C., Liu, H., 2017. Injectable dextran hydrogels fabricated by metal-free click chemistry for cartilage tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 73, 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.12.053>

Ward, M., Georgiou, T., 2011. Thermoresponsive Polymers for Biomedical Applications. *Polymers* 3. <https://doi.org/10.3390/polym3031215>

Wei, W., Dai, H., 2021. Articular cartilage and osteochondral tissue engineering techniques: Recent advances and challenges. *Bioactive Materials* 6, 4830–4855. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.05.011>

Westin, C.B., Nagahara, M.H.T., Decarli, M.C., Kelly, D.J., Moraes, Â.M., 2020. Development and characterization of carbohydrate-based thermosensitive hydrogels for cartilage tissue engineering. *European Polymer Journal* 129, 109637. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.109637>

Wichterle, O., Lím, D., 1960. Hydrophilic Gels for Biological Use. *Nature* 185, 117–118. <https://doi.org/10.1038/185117a0>

Williams, D.F., 1987. Definitions in Biomaterials: Proceedings of a Consensus Conference of the European Society for Biomaterials, Chester, England, March 3-5, 1986. Elsevier.

Wiwatsamphan, P., Chirachanchai, S., 2022. Persistently reversible pH-/thermo-responsive chitosan/poly (N-isopropyl acrylamide) hydrogel through clickable crosslinked interpenetrating network. *Polymer Degradation and Stability* 198, 109874. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2022.109874>

Wu, S.-W., Liu, X., Miller, A.L., Cheng, Y.-S., Yeh, M.-L., Lu, L., 2018. Strengthening injectable thermo-sensitive NIPAAm-g-chitosan hydrogels using chemical cross-linking of disulfide bonds as scaffolds for tissue engineering. *Carbohydr Polym* 192, 308–316. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.03.047>

Wu, T.-Y., Zrimsek, A.B., Bykov, S.V., Jakubek, R.S., Asher, S.A., 2018. Hydrophobic Collapse Initiates the Poly(N-isopropylacrylamide) Volume Phase Transition Reaction Coordinate. *J. Phys. Chem. B* 122, 3008–3014. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.8b00740>

Wu, Y., Li, X., Wang, Y., Shi, Y., Wang, F., Lin, G., 2022. Research progress on mechanical properties and wear resistance of cartilage repair hydrogel. *Materials & Design* 216, 110575. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2022.110575>

Wu, Y., Schmittmann, B., Zia, R.K.P., 2007. Two-dimensional polymer networks near percolation. *J. Phys. A: Math. Theor.* 41, 025004. <https://doi.org/10.1088/1751-8113/41/2/025004>

- X -

Xiao, Y., Gu, Y., Qin, L., Chen, L., Chen, X., Cui, W., Li, F., Xiang, N., He, X., 2021. Injectable thermosensitive hydrogel-based drug delivery system for local cancer therapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 200, 111581. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111581>

Xiao, Z., Li, Q., Liu, H., Zhao, Q., Niu, Y., Zhao, D., 2022. Adhesion mechanism and application progress of hydrogels. *European Polymer Journal* 173, 111277. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2022.111277>

Xu, W., Zhu, J., Hu, J., Xiao, L., 2022. Engineering the biomechanical microenvironment of chondrocytes towards articular cartilage tissue engineering. *Life Sciences* 309, 121043. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.121043>

Xu, X., Koslowski, M., Raman, A., 2012. Dynamics of surface-coupled microcantilevers in force modulation atomic force microscopy – magnetic vs. dither piezo excitation. *Journal of Applied Physics* 111, 054303. <https://doi.org/10.1063/1.3689815>

Xu, X., Liu, Y., Fu, W., Yao, M., Ding, Z., Xuan, J., Li, D., Wang, S., Xia, Y., Cao, M., 2020. Poly(N-isopropylacrylamide)-Based Thermoresponsive Composite Hydrogels for Biomedical Applications. *Polymers* 12, 580. <https://doi.org/10.3390/polym12030580>

- Y -

Yakut, Y., Tuncer, A., 2020. Chapter 4 - Architecture of human joints and their movement, in: Angin, S., Şimşek, I.E. (Eds.), *Comparative Kinesiology of the Human Body*. Academic Press, pp. 47–57. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812162-7.00004-7>

Yamada, S., Sugahara, K., Özbek, S., 2011. Evolution of glycosaminoglycans. *Commun Integr Biol* 4, 150–158. <https://doi.org/10.4161/cib.4.2.14547>

Yan, Y., Huang, L., Zhang, Q., Zhou, H., 2015. Concentration effect on aggregation and dissolution behavior of poly(N-isopropylacrylamide) in water. *Journal of Applied Polymer Science* 132. <https://doi.org/10.1002/app.41669>

Yang, J., Steck, J., Suo, Z., 2020. Gelation kinetics of alginate chains through covalent bonds. *Extreme Mechanics Letters* 40, 100898. <https://doi.org/10.1016/j.eml.2020.100898>

Yang, Y., Xu, L., Wang, J., Meng, Q., Zhong, S., Gao, Y., Cui, X., 2022. Recent advances in polysaccharide-based self-healing hydrogels for biomedical applications. *Carbohydrate Polymers* 283, 119161. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119161>

Yao, J., Wu, Zhou, Dahmani, F.Z., 2013. Enhanced and sustained topical ocular delivery of cyclosporine A in thermosensitive hyaluronic acid-based in situ forming microgels. *IJN* 3587. <https://doi.org/10.2147/IJN.S47665>

Yap, L.-S., Yang, M.-C., 2020. Thermo-reversible injectable hydrogel composing of pluronic F127 and carboxymethyl hexanoyl chitosan for cell-encapsulation. *Colloids Surf B Biointerfaces* 185, 110606. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110606>

Yarwood, S.J., Woodgett, J.R., 2001. Extracellular matrix composition determines the transcriptional response to epidermal growth factor receptor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4472–4477. <https://doi.org/10.1073/pnas.081069098>

Yuan, J., Xu, W.W., Jiang, S., Yu, H., Poon, H.F., 2018. The Scattered Twelve Tribes of HEK293. *Biomedical and Pharmacology Journal* 11, 621–623.

- Z -

Zarrintaj, P., Ramsey, J.D., Samadi, A., Atoufi, Z., Yazdi, M.K., Ganjali, M.R., Amirabad, L.M., Zangene, E., Farokhi, M., Formela, K., Saeb, M.R., Mozafari, M., Thomas, S., 2020. Ploxamer: A versatile tri-block copolymer for biomedical applications. *Acta Biomater* 110, 37–67. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.04.028>

Zhang, W., Chen, S., Jiang, W., Zhang, Q., Liu, N., Wang, Z., Li, Z., Zhang, D., 2023. Double-network hydrogels for biomaterials: Structure-property relationships and drug delivery. *European Polymer Journal* 185, 111807. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2022.111807>

Zhang, X.-Z., Wu, D.-Q., Chu, C.-C., 2004. Synthesis, characterization and controlled drug release of thermosensitive IPN–PNIPAAm hydrogels. *Biomaterials* 25, 3793–3805. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.10.065>

Zhang, Y., Dong, J., Xu, G., Han, R., Zhou, J., Ni, Y., 2023. Efficient production of hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* using two-stage semi-continuous fermentation. *Bioresource Technology* 377, 128896. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.128896>

Zhang, Y., Furyk, S., Bergbreiter, D.E., Cremer, P.S., 2005. Specific Ion Effects on the Water Solubility of Macromolecules: PNIPAM and the Hofmeister Series. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 14505–14510. <https://doi.org/10.1021/ja0546424>

Zhang, Y., Furyk, S., Sagle, L.B., Cho, Y., Bergbreiter, D.E., Cremer, P.S., 2007. Effects of Hofmeister Anions on the LCST of PNIPAM as a Function of Molecular Weight. *J. Phys. Chem. C* 111, 8916–8924. <https://doi.org/10.1021/jp0690603>

- Zhang, Y., McKown, R.L., Raab, R.W., Rapraeger, A.C., Laurie, G.W., 2011. Focus on Molecules: Syndecan-1. *Exp Eye Res* 93, 329–330. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2010.06.008>
- Zhang, Y., Yu, J., Ren, K., Zuo, J., Ding, J., Chen, X., 2019. Thermosensitive Hydrogels as Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering. *Biomacromolecules* 20, 1478–1492. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b00043>
- Zhao, J., Yan, Y., Shang, Y., Du, Y., Long, L., Yuan, X., Hou, X., 2017. Thermosensitive elastin-derived polypeptide hydrogels crosslinked by genipin. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* 66, 369–377. <https://doi.org/10.1080/00914037.2016.1217534>
- Zhao, X., Huebsch, N., Mooney, D.J., Suo, Z., 2010. Stress-relaxation behavior in gels with ionic and covalent crosslinks. *J Appl Phys* 107, 063509. <https://doi.org/10.1063/1.3343265>
- Zhao, Z., Fan, C., Chen, F., Sun, Y., Xia, Y., Ji, A., Wang, D.-A., 2020. Progress in Articular Cartilage Tissue Engineering: A Review on Therapeutic Cells and Macromolecular Scaffolds. *Macromol Biosci* 20, e1900278. <https://doi.org/10.1002/mabi.201900278>
- Zheng, W.J., An, N., Yang, J.H., Zhou, J., Chen, Y.M., 2015. Tough Al-alginate/Poly(N-isopropylacrylamide) Hydrogel with Tunable LCST for Soft Robotics. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 7, 1758–1764. <https://doi.org/10.1021/am507339r>
- Zhu, P., 2014. Effects of Sodium Dodecyl Sulfate on Structures of Poly(N-isopropylacrylamide) at Particle Surface. *The journal of physical chemistry. B* 119. <https://doi.org/10.1021/jp510350w>
- Zoratto, N., Matricardi, P., 2018. Semi-IPN- and IPN-Based Hydrogels. *Adv Exp Med Biol* 1059, 155–188. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-76735-2\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-76735-2_7)
- Zykwinska, A., Makshakova, O., Gélébart, P., Siquin, C., Stephant, N., Collic-Jouault, S., Perez, S., Cuenot, S., 2022. Interactions between infernan and calcium: From the molecular level to the mechanical properties of microgels. *Carbohydrate Polymers* 292, 119629. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119629>
- Zykwinska, A., Marquis, M., Godin, M., Marchand, L., Siquin, C., Garnier, C., Jonchère, C., Chédeville, C., Le Visage, C., Guicheux, J., Collic-Jouault, S., Cuenot, S., 2019. Microcarriers Based on Glycosaminoglycan-Like Marine Exopolysaccharide for TGF- $\beta$ 1 Long-Term Protection. *Marine Drugs* 17, 65. <https://doi.org/10.3390/md17010065>
- Zykwinska, A., Pihet, M., Radji, S., Bouchara, J.-P., Cuenot, S., 2014. Self-assembly of proteins into a three-dimensional multilayer system: investigation of the surface of the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Biochim Biophys Acta* 1844, 1137–1144. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.03.001>







**Titre :** Elaboration d'hydrogels thermosensibles injectables à base d'exopolysaccharides marins pour l'ingénierie tissulaire.

**Mots clés :** exopolysaccharide, infernane, pNIPAM, chimie carbodiimide, hydrogel thermosensible, ingénierie tissulaire

**Résumé :** L'ingénierie tissulaire se positionne aujourd'hui comme une stratégie prometteuse offrant des solutions novatrices pour le traitement des lésions du cartilage articulaire. Ce domaine, faisant intervenir les techniques des sciences des matériaux, ingénierie et de la biologie, vise à restaurer le cartilage endommagé par le développement de biomatériaux. Parmi eux, les hydrogels semblent particulièrement bien mimer les propriétés biologiques et mécaniques de la matrice extracellulaire. Les hydrogels injectables thermosensibles, solubles à température ambiante et gélifiants à température physiologique, offrent une application mini-invasive. L'exopolysaccharide (EPS), sécrété par la bactérie des sources hydrothermales océaniques profondes *Alteromonas infernus*, nommé infernane, possédant naturellement des propriétés biologiques mimétiques des glycosaminoglycans (GAG), est donc un candidat prometteur en tant que composant des hydrogels. Néanmoins, l'EPS sous forme native ne possédant pas de capacité de gélification intrinsèque, sa formulation en hydrogel à part entière est un défi à surmonter.

Ce travail de thèse avait ainsi pour objectif la conception d'hydrogels thermosensibles injectables à base d'EPS GAG-mimétiques marins pour l'ingénierie tissulaire. Cette étude peut se décomposer en deux parties, une première visant à fonctionnaliser l'EPS par un polymère thermosensible, le poly(N-isopropylacrylamide) (pNIPAM), puis à caractériser les propriétés physico-chimiques des polymères greffés, EPS-pNIPAM, par de nombreuses techniques complémentaires. La seconde partie portait sur l'étude des propriétés mécaniques des hydrogels d'EPS-pNIPAM obtenus ainsi que sur leur cytocompatibilité à travers des tests de viabilité avec des cellules modèles.

Une bonne compréhension de la relation composition-structure-propriétés fonctionnelles de ces nouveaux hydrogels thermosensibles est essentielle dans le but de leur utilisation future en ingénierie tissulaire du cartilage.

**Title:** Development of injectable thermosensitive hydrogels based on marine exopolysaccharides for tissue engineering.

**Keywords:** exopolysaccharide, infernan, pNIPAM, carbodiimide chemistry, thermosensitive hydrogel, tissue engineering

**Abstract:** Tissue engineering has emerged as a promising strategy offering innovative solutions for the treatment of articular cartilage damage. This field, which combines the techniques of materials science, engineering and biology, aims to restore damaged cartilage through the development of biomaterials. Among them, hydrogels seem to mimic more particularly both biological and mechanical properties of the extracellular matrix. Injectable thermosensitive hydrogels, soluble at room temperature and gelling at physiological temperature, offer minimally invasive applications. Exopolysaccharide (EPS), secreted by a deep-sea hydrothermal vent bacterium *Alteromonas infernus*, named infernan, naturally possessing mimetic biological properties of glycosaminoglycans (GAG), is therefore a promising candidate as a bioactive component of hydrogels. However, since EPS in native form has no intrinsic gelling capacity, its formulation into a fully-fledged hydrogel is a challenge to overcome.

The aim of this thesis was therefore to design injectable thermosensitive hydrogels based on marine GAG-mimetic EPS for tissue engineering. This work can be composed of two parts, the first aiming to functionalize the EPS with a thermosensitive polymer, poly(N-isopropylacrylamide) (pNIPAM), then to characterize the physico-chemical properties of EPS-pNIPAM graft polymers using a number of complementary techniques. The second part of the study focused on mechanical properties of EPS-pNIPAM hydrogels obtained, as well as their biocompatibility through viability tests with model cells.

A good understanding of the composition-structure-functional properties relationship of these new thermosensitive hydrogels is essential for their future use in cartilage tissue engineering.