



HAL
open science

Copolysaccharides à blocs linéaires de chitosane et de dextrane pour la délivrance d'acides nucléiques

Elise Courtecuisse

► **To cite this version:**

Elise Courtecuisse. Copolysaccharides à blocs linéaires de chitosane et de dextrane pour la délivrance d'acides nucléiques. Polymères. Université de Bordeaux, 2024. Français. ⟨NNT : 2024BORD0380⟩. ⟨tel-04988082⟩

HAL Id: tel-04988082

<https://theses.hal.science/tel-04988082v1>

Submitted on 12 Mar 2025

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.



HAL Authorization

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES
SPÉCIALITÉ POLYMÈRES

Par **Elise COURTECUISSÉ**

**Copolysaccharides à blocs linéaires de chitosane et de
dextrane pour la délivrance d'acides nucléiques**

**Linear block copolysaccharides of chitosan and dextran for nucleic
acid delivery**

Sous la direction de Christophe SCHATZ

Soutenue le 6 décembre 2024

Membres du jury :

Mr Bertrand GARBAY	Professeur, Bordeaux INP	Président
Mme Alexandra MONTEBAULT	Professeure, Univ. Claude Bernard Lyon 1	Rapporteur
Mr Luc PICTON	Professeur, Université de Rouen	Rapporteur
Mme Lourdes Mónica BRAVO-ANAYA	Chargée de recherche, CNRS	Examineur
Mr Bjørn E. CHRISTENSEN	Professeur, NTNU, Norvège	Examineur
Mr Gilles JOUCLA	Maître de conférences, Bordeaux INP	Examineur
Mme Chantal PICHON	Professeure, Université d'Orléans	Examineur
Mr Christophe SCHATZ	Maître de conférences, Bordeaux INP	Directeur de thèse

Membres invités :

Mr Thierry DELAIR	Professeur	Invité
Mr Tim DELAS	Docteur	Invité

Titre : Copolysaccharides à blocs linéaires de chitosane et de dextrane pour la délivrance d'acides nucléiques

Résumé : Le chitosane, seul polysaccharide chargé positivement en milieu acide, peut former des complexes polyélectrolytes avec des molécules chargées négativement. Cette propriété en fait un candidat prometteur pour la conception de systèmes non viraux de délivrance d'acides nucléiques. Cependant, à pH physiologique, son faible degré de protonation le rend insoluble, favorisant l'agrégation et la précipitation des complexes. Les modifications chimiques du chitosane affectent son intégrité et, dans certains cas, compromettent ses capacités de complexation. Cette étude propose deux stratégies pour stabiliser les complexes formés entre le chitosane et l'ADN. La première approche repose sur l'utilisation de copolymères à blocs linéaires chitosane-*b*-dextrane. Par son caractère hydrophile et sa capacité à limiter l'agrégation, le dextrane améliore la solubilité et la dispersion des complexes en milieu aqueux. L'intégrité du chitosane est préservée par l'utilisation d'une diamine comme agent de couplage, permettant la liaison des blocs polysaccharides par leurs extrémités réductrices. Parmi les diamines commerciales testées, le dichlorure d'O,O'-1,3-propanediylbishydroxylamine (PDHA) a été préférée en raison de la stabilité des liaisons oximes formées, permettant de s'affranchir de l'étape de réduction. La seconde approche combine l'acétylation du chitosane à l'ajout d'ions zinc dans les complexes formés avec l'ADN. Des degrés d'acétylation supérieurs à 40%, associés au zinc, formant des liaisons de coordination avec le chitosane et l'ADN, ont permis l'obtention de complexes particulièrement stables en conditions physiologiques. Ces deux stratégies ont été évaluées par des tests de transfection du plasmide eGFP sur des cellules HEK 293. Bien que l'expression de la protéine fluorescente soit inférieure à celle obtenue avec un agent de transfection commercial comme la PEI, l'ajout d'un bloc de dextrane a significativement amélioré les taux de transfection comparé au chitosane seul.

Mots clés : Polysaccharide – Chitosane – Dextrane – Copolymère à blocs – Complexes polyélectrolytes – ADN

Title: Linear block copolysaccharides of chitosan and dextran for nucleic acid delivery

Abstract: Chitosan, the only positively charged polysaccharide in acidic medium, can form polyelectrolyte complexes with negatively charged molecules. This property makes it a promising candidate for the design of non-viral nucleic acid delivery systems. However, at physiological pH, its low degree of protonation renders it insoluble, promoting the aggregation and precipitation of complexes. Chemical modifications of chitosan affect its integrity and, in some cases, compromise its complexation properties. This study explores two strategies to stabilize the complexes formed between chitosan and DNA. The first approach is based on the use of linear block copolysaccharides chitosan-*b*-dextran. Due to its hydrophilic nature and ability to limit aggregation, dextran improves the solubility and dispersion of the complexes in aqueous media. The integrity of chitosan is preserved by using a diamine as linker to couple polysaccharide blocks through their reducing ends. Among the commercial diamines tested, O,O'-1,3-propanediylbis(hydroxylamine hydrochloride) (PDHA) was preferred due to the stability of the oxime bonds formed, eliminating the need for a reduction step. The second approach combines the acetylation of chitosan with the addition of zinc ions to the complexes formed with DNA. Degrees of acetylation greater than 40%, in combination with zinc forming coordination bonds with chitosan and DNA, resulted in particularly stable complexes under physiological conditions. Both strategies were evaluated through transfection tests of the eGFP plasmid on HEK 293 cells. Although the expression of the fluorescent protein was lower than that obtained with a commercial transfection agent like PEI, the addition of a dextran block significantly improved the transfection rates compared to chitosan alone.

Key words: Polysaccharide – Chitosan – Dextran – Block copolymer – Polyelectrolyte complexes – DNA

Unité de recherche

Laboratoire de Chimie des Polymères Organiques, UMR 5629

Équipe *Polymer Self Assembly and Life Sciences*

16, Avenue Pey-Berland

33607 Pessac Cedex France



Remerciements

Bien qu'une thèse soit un travail individuel, elle ne pourrait aboutir sans le soutien précieux et l'accompagnement de nombreuses personnes.

Pour cela, je souhaite tout d'abord commencer ces remerciements par Christophe, mon directeur de thèse. Merci pour tout ce que vous m'avez appris durant ces trois années, pour ces longues discussions passionnées à parler de science mais aussi de la vie. Je suis convaincue que le binôme formé entre un doctorant et son directeur de thèse est l'élément clé de la réussite d'une thèse, et j'ai eu la chance inestimable de vous avoir à mes côtés. Vous avez toujours été présent, que ce soit pour m'encourager dans les moments de doute, me proposer des solutions ou m'ouvrir de nouvelles perspectives. Pour tout cela, merci infiniment Christophe.

Cette thèse n'aurait pu aboutir sans le soutien financier du Ministère français de l'Enseignement supérieur et de la Recherche ainsi que de l'École Doctorale des Sciences Chimiques de Bordeaux, que je tiens donc à remercier.

Je tiens ensuite à adresser mes remerciements aux membres de mon jury de thèse pour avoir accepté et pris le temps d'évaluer mes travaux.

Je tenais à remercier particulièrement Bertrand et Gilles, qui en plus d'avoir fait partie de mon jury ont été très présents au cours de ma thèse. Merci pour ta gentillesse Bertrand, merci d'avoir si souvent pris le temps de vulgariser la biologie pour la chimiste que je suis et merci pour ton énergie et ta bonne humeur communicatives. Gilles, merci d'avoir accepté de m'accueillir dans ton laboratoire pour quelques jours qui se sont finalement transformés en quelques mois... mais surtout de m'avoir formée et accompagnée pour l'évaluation biologique de mes systèmes, mon dernier chapitre de thèse n'aurait pu voir le jour sans ton aide.

I would also like to thank Bjorn for his kindness and valuable advice. Thank you for welcoming me to Trondheim at the beginning of my PhD and for all the insightful scientific discussions we had, whether in Bordeaux or elsewhere in Europe.

Mónica, merci pour ta bienveillance, ta gentillesse et nos longues discussions passionnées sur le chitosane. Si je devais avoir un seul regret au cours de cette thèse, ce serait de ne pas avoir pu concrétiser ce projet de post-doctorat à Rennes à tes côtés.

Tim, un grand merci pour tout le travail que tu as fait en amont sur ce fabuleux polysaccharide qu'est le chitosane. Au cas où tu en doutais, ta thèse a été mon livre de chevet pendant 3 ans !

Je tenais également à remercier tout particulièrement Jeff et Martin pour m'avoir accueillie en stage et, surtout, pour m'avoir transmis cette passion pour la recherche. Ce stage à vos côtés a été déterminant dans mon envie de poursuivre en thèse, et sachez que je ne le regrette

absolument pas ! Merci Jeff pour ta bonne humeur, ta bienveillance et ton oreille toujours attentive, tu as été un véritable soutien pour moi tout au long de ces trois années.

Je souhaite bien évidemment remercier tous mes collègues du LCPO que j'ai eu la chance de rencontrer au cours de ces trois années, qu'il s'agisse des permanents, des doctorants, des post-doctorants, mais également du personnel administratif et technique.

Je tiens à adresser une mention particulière à Paul, Léna et Frédérique, qui m'ont accompagnée par leur expertise et leur bienveillance. Je n'oublie pas non plus Amélie et Sylvain pour les (très) nombreuses SEC réalisées au cours de ces trois années. Sylvain, au-delà de la chromatographie, merci d'avoir été un véritable soutien moral, ta bonne humeur et nos longues discussions me manqueront. Enfin, comment ne pas remercier Manu pour son talent au confocal et pour les magnifiques images de cellules que tu as pu obtenir, toujours avec une bonne dose d'humour !

Je souhaite sincèrement remercier toute la Team 3 du LCPO, merci à tous les permanents qui ont été présents au cours de ma thèse, que ce soit de près ou de loin ; Sébastien, Colin, Elisabeth, Jeff, Olivier, Bertrand et Angela. Mais surtout un immense merci à mes collègues doctorants et post-doctorants que j'ai eu la chance de croiser durant ces années de thèse : Martin, Pedro, Johanna, Hannah, Mostafa, Sarah, Valentin, Amin, Arthur, Alice, Matthieu, Camille, Julien, Alban, Sifan, Yupei, Antoine, Yue, Dongxu, Chloé et Enzo. Merci à vous tous d'avoir supporté mes humeurs, mes potins et mes papotages surtout pendant mes longues heures passées devant la DLS !

Je souhaitais tout particulièrement mentionner Marie et Anouk avec qui nous formions un trio infernal. Merci infiniment de m'avoir soutenue et épaulée notamment au début de ma thèse mais surtout merci pour votre amitié, vos rires si caractéristiques et peu discrets et tous nos moments passés ensemble au labo et en dehors.

I also want to thank Diana for being my best and only French student. Lady D (or Grumpy D, depending on the day), you truly brightened my life. Thank you for that and for all the self-confidence you gave me. Now, when I think of MIT, it no longer reminds me of a university, but of you.

Une mention spéciale pour Eloïse et Rosanna avec qui j'ai partagé mes galères mais aussi mes joies pendant 3 ans. Merci à vous deux d'avoir été ma dose de positivité lorsque j'en avais besoin. Finalement, je voulais également remercier Leslie pour son soutien infailible surtout en cette dernière année de thèse. Merci pour toutes ces discussions scientifiques et personnelles, tu as été plus qu'une épaupe pour moi, une véritable amie.

La réussite d'une thèse ne repose pas seulement sur l'aspect professionnel, mais aussi sur le soutien personnel. C'est pourquoi je tiens à remercier mes amis et ma famille, qui m'ont accompagnée et soutenue durant ces trois années. Un immense merci à mes proches qui ont fait le déplacement pour ma soutenance et qui ont contribué à rendre ce jour si spécial.

Une mention particulière à mes deux soutiens de toujours, mes parents. Votre amour, votre confiance et votre soutien indéfectible ont été des forces qui m'ont permis de surmonter tous les obstacles que j'ai pu rencontrer. Je mesure la chance que j'ai de vous avoir à mes côtés et, pour cela, je ne vous remercierai jamais assez.

Finalement, je conclurai ces remerciements par toi, Sébastien, mon soutien de chaque instant durant ces trois années. Merci d'avoir partagé mes joies et mes peines, d'avoir été un pilier inébranlable tout au long de cette période parfois difficile, mais surtout d'avoir apporté de la douceur et du bonheur à mon quotidien. Je t'aime.

« *Le succès, c'est aller d'échec en échec sans perdre son enthousiasme.* »

Winston Churchill

« *A chaque ancre, sa bouée.* »

Auteur inconnu

Table des matières

Table des abréviations	16
Introduction générale	19
Chapitre 1 : Bibliographie	23
1. LE CHITOSANE : ORIGINE, PROPRIETES PHYSICOCHEMISTIQUES ET BIOLOGIQUES.....	25
1.1. De la chitine au chitosane	25
1.2. Propriétés du chitosane en solution	28
1.3. Propriétés biologiques du chitosane	31
2. COMPLEXES POLYELECTROLYTES CHITOSANE/ACIDES NUCLEIQUES	33
2.1. Formulation des polyplexes chitosane/AN.....	34
2.2. Propriétés physicochimiques des polyplexes chitosane/AN.....	34
2.2.1. Taille des polyplexes.....	34
2.2.2. Potentiel zêta des polyplexes	37
2.2.3. Force des interactions électrostatiques des polyplexes	38
2.2.4. Pouvoir tampon	38
2.2.5. Stabilité colloïdale	39
2.3. Evaluation biologique	39
2.3.1. Trafic intracellulaire.....	39
2.3.2. Efficacité de transfection	41
2.3.3. Cytotoxicité	43
3. VERS UNE PLUS GRANDE STABILITE DES COMPLEXES A BASE DE CHITOSANE.....	44
3.1. Modifications chimiques du chitosane	44
3.1.1. Amélioration de la stabilité des complexes	44
3.1.2. Amélioration de la capacité de ciblage	46
3.1.3. Amélioration de l'échappement endosomal.....	48
3.1.4. Amélioration de la dissociation des complexes	50
3.2. Modifications non-covalentes des complexes	51
4. COPOLYMERES LINEAIRES A BASE DE CHITOSANE	53
5. CONCLUSION.....	62
REFERENCES.....	63
Chapitre 2 : Synthèse de copolysaccharides à blocs chitosane-<i>b</i>-dextrane	73
1. INTRODUCTION.....	75
2. SECTION EXPERIMENTALE.....	77
2.1. Matériels	77
2.2. Dépolymérisation du chitosane.....	77
2.3. Fonctionnalisation terminale du dextrane par l'ADH et le PDHA	78
2.4. Fonctionnalisation terminale du chitosane par l'ADH et le PDHA	78
2.5. Synthèse de copolysaccharides à blocs linéaires chitosane- <i>b</i> -dextrane.....	78
2.6. Purification des copolysaccharides à blocs linéaires	79
2.7. Synthèse de copolysaccharides greffés dextrane- <i>g</i> -chitosane	79
2.8. Chromatographie d'exclusion stérique (SEC)	79

2.9.	Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)	80
2.10.	Analyse thermogravimétrique (ATG).....	81
2.11.	Analyse de diffusion de la lumière	81
2.12.	Formation de nanoparticules de copolysaccharides par nanoprecipitation	81
3.	RESULTATS ET DISCUSSION	81
3.1.	Préparation et caractérisation du chitosane	81
3.2.	Caractérisation des dextrans	86
3.3.	Fonctionnalisation terminale du dextrane et du chitosane avec l'ADH et le PDHA	88
	Considérations générales.....	88
	Conjugués non réduits	90
	Résistance à l'hydrolyse des conjugués non réduits.....	94
	Conjugués réduits	96
3.4.	Synthèse des copolysaccharides chitosane- <i>b</i> -dextrane.....	101
	Méthode de couplage I.....	102
	Méthode de couplage II	108
	Bibliothèque de copolysaccharides	110
3.5.	Solubilité des copolysaccharides chitosane- <i>b</i> -dextrane dans l'eau	114
4.	CONCLUSION.....	117
	REFERENCES.....	119
Chapitre 3 : Stabilisation des complexes chitosane/ADN en conditions physiologiques		123
1.	INTRODUCTION.....	125
2.	SECTION EXPERIMENTALE.....	127
2.1.	Matériels	127
2.2.	Acétylation du chitosane.....	127
2.3.	Formation des complexes	128
2.4.	Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)	128
2.5.	Diffusion dynamique de la lumière (DLS) et potentiel zêta.....	129
2.6.	Spectroscopie UV-vis	129
3.	RESULTATS ET DISCUSSION	129
3.1.	Formation et caractérisation des complexes chitosane/ADN	129
	Présentation du système complexant	129
	Présentation des techniques de caractérisation	131
	Caractérisation par zétamétrie	132
	Caractérisation par DLS	134
	Dosage du chitosane libre.....	137
3.2.	Stabilité des complexes à pH physiologique.....	139
3.2.1.	Influence du degré d'acétylation	140
3.2.2.	Influence du rapport de charge	144
3.3.	Amélioration de la stabilité des complexes.....	145
3.3.1.	Ajout d'ions zinc	145
	Généralités.....	145
	Interactions de l'ADN avec le zinc et le calcium	147

Détermination du rapport zinc:phosphate optimal	148
Stabilité des complexes chitosane/ADN/zinc en conditions physiologiques	151
Comparaison de l'influence du zinc et du calcium sur la stabilité des complexes	153
Influence de la force ionique	154
Stabilité des complexes dans le PBS	156
3.3.2. Copolymère chitosane- <i>b</i> -dextrane	158
Détermination du rapport de charge optimal.....	159
Influence du dextrane sur la stabilité des complexes copolymères/chitosane.	163
Ajout d'ions zinc dans les complexes copolymères/ADN	165
4. CONCLUSION.....	166
REFERENCES.....	168
Chapitre 4 : Evaluation biologique des complexes chitosane/ADN <i>in vitro</i>	173
1. INTRODUCTION.....	175
2. SECTION EXPERIMENTALE.....	176
2.1. Matériels	176
2.2. Préparation des complexes	177
2.3. Electrophorèse sur gel	177
2.4. Diffusion dynamique de la lumière (DLS)	177
2.5. Transfection des cellules HEK 293	178
2.6. Analyse par cytométrie de flux	178
2.7. Marquage du chitosane et du plasmide	179
2.8. Marquage des cellules HEK 293.....	180
2.9. Microscopie confocale.....	180
3. RESULTATS ET DISCUSSION	181
3.1. Complexes chitosane/plasmide.....	181
3.2. De l'ADN de thymus de veau vers le plasmide	183
3.3. Essais de transfection	187
Transfection n°1	188
Stabilité des complexes PEI/plasmide.....	189
Transfection n°2.....	190
Transfection n°3.....	191
3.4. Suivi de l'internalisation par microscopie confocale.....	192
Suivi de l'internalisation du chitosane	192
Suivi de l'internalisation du chitosane et du plasmide.....	195
3.5. Influence du sens de formulation des complexes.....	200
4. CONCLUSION.....	201
REFERENCES.....	203
Conclusion générale et perspectives	207
Annexes	211

Table des abréviations

ADH	Dihydrazide adipique
ADN	Acide désoxyribonucléique
AN	Acide nucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATG	Analyse thermogravimétrique
COS	Oligosaccharides de chitosane
D	Indice de polydispersité
D ₂ O	Eau deutérée
DA	Degré d'acétylation
DB	Degré de branchement
DAD	Détecteur à barrettes de diodes
DCR	Derived Count Rate
D _H	Diamètre hydrodynamique
DLS	Diffusion dynamique de la lumière
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DOSY	Diffusion Ordered Spectroscopy
dRI	Indice de réfraction différentiel
DP	Degré de polymérisation
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
eGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
FDA	Food and Drug Administration
GlcN	D-glucosamine
GlcNAc	<i>N</i> -acetyl-D-glucosamine
HA	Acide hyaluronique
HEK 293	Human Embryonic Kidney
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HMF	5-hydroxymethylfurfural
ITC	Titration calorimétrique isotherme
MALS	Diffusion de lumière multi-angles
MOPS	Acide 3-morpholino-1-propanesulfonique
NaBH ₃ CN	Cyanoborohydrure de sodium
NaNO ₂	Nitrite de sodium

NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimide
N:P	Rapport amine : phosphate
pb	Paire de bases
PBS	Tampon phosphate salin
PDHA	Dichlorure d'O,O'-1,3-propanediylbishydroxylamine
PDI	Indice de polydispersité
PEC	Complexe polyélectrolyte
PEG	Polyéthylène glycol
PEI	Polyéthylèneimine
PIC	Complexe polyionique
R _{+/-}	Rapport de charge
RMN ¹ H	Résonance magnétique nucléaire du proton
SEC	Chromatographie d'exclusion stérique
siRNA	Petits acides ribonucléiques interférents
SVF	Sérum de veau fœtal
Unité M	Unité 2,5-anhydro-D-mannose
UV-vis	Ultraviolet-visible
Zn:P	Rapport zinc : phosphate

Introduction générale

La délivrance d'acides nucléiques est un enjeu majeur des dernières décennies, initié par l'administration d'ADN dans le cadre de la thérapie génique. Deux approches principales ont été développées pour répondre à cette problématique : les vecteurs viraux, qui utilisent des virus modifiés pour transporter du matériel génétique thérapeutique, et les vecteurs non viraux, qui reposent sur l'encapsulation d'acides nucléiques dans des nanoparticules de lipides ou de polymères. Bien que les vecteurs viraux dominent encore le domaine de la délivrance génique, notamment dans le cadre de la thérapie génique et de la vaccination en raison de leur grande efficacité, le développement de systèmes de délivrance non viraux suscite un intérêt croissant. Ces systèmes visent à surmonter les problèmes de sécurité associés aux vecteurs viraux, tels que l'immunogénicité et les risques de mutagenèse par insertion. Les systèmes non viraux offrent également une flexibilité de formulation considérable et des coûts de fabrication généralement plus bas. La majorité de ces systèmes exploitent la charge polyanionique des acides nucléiques pour les encapsuler de manière efficace dans des vecteurs cationiques. Cette interaction électrostatique favorise la formation de particules stables, facilitant non seulement le transport des acides nucléiques à travers les membranes cellulaires, mais aussi leur protection contre les dégradations enzymatiques. En maximisant l'efficacité d'encapsulation et de libération intracellulaire, ces vecteurs cationiques optimisent la délivrance ciblée des acides nucléiques dans les cellules, augmentant ainsi le potentiel thérapeutique. Les lipoplexes et les nanoparticules lipidiques (LNPs) sont les vecteurs non viraux les plus utilisés aujourd'hui. Les lipoplexes sont des complexes formés par l'association de lipides cationiques avec des acides nucléiques tandis que les LNPs sont des systèmes de délivrance plus complexes qui encapsulent des acides nucléiques par interaction avec des lipides cationiques en présence de lipides neutres, de cholestérol et de phospholipides. Des lipides PEGylés sont également intégrés à la formulation des LNPs afin de stabiliser leur structure et prolonger leur circulation dans le sang. Cependant, plusieurs problèmes associés à ces systèmes, tels que la stabilité à long terme, l'oxydation des lipides et la production d'anticorps dirigés contre le PEG, entravent le développement de ces technologies. Dans ce contexte, les systèmes non viraux basés sur des polymères cationiques suscitent un intérêt croissant pour la délivrance de gènes, en raison de leur simplicité de formulation, leur stabilité et leur capacité à s'adapter à diverses applications thérapeutiques. Parmi les polycations les plus couramment utilisés, la polyéthylèneimine (PEI) et la polylysine (PLL) se distinguent par leur efficacité dans les applications de transfection. Ces deux polycations sont largement utilisés en raison de leur capacité à former des complexes stables avec l'ADN en conditions physiologiques et à favoriser la libération du matériel génétique dans le cytoplasme. Toutefois, la toxicité associée à ces polycations limite grandement leur utilisation. Le chitosane, un polysaccharide cationique, se présente comme une alternative prometteuse à la PEI et à la PLL, notamment grâce à sa biocompatibilité, sa biodégradabilité et, surtout, sa faible toxicité comparée aux autres polycations.

Le chitosane, dérivé principal de la chitine, est un biopolymère constitué d'unités D-glucosamine et N-acétyl-D-glucosamine. Utilisé dans divers domaines tels que le traitement de l'eau, l'agriculture, les

cosmétiques et l'industrie alimentaire, il est reconnu pour ses propriétés bactériostatiques, cicatrisantes, immunomodulatrices et antitumorales, ce qui en fait un candidat prometteur pour des applications biomédicales. Seul polysaccharide chargé positivement en milieu acide par protonation de ses amines primaires, il peut former des complexes polyélectrolytes (PEC) avec des acides nucléiques pour la conception de systèmes non viraux de délivrance de gènes. Cependant, à pH physiologique, son faible degré de protonation le rend insoluble, provoquant ainsi l'agrégation des complexes. Paradoxalement, cette tendance à l'agrégation n'a jamais compromis son efficacité dans les essais biologiques, notamment en transfection génique, où de bons résultats ont été obtenus malgré l'instabilité des complexes formés. De nombreuses modifications chimiques du chitosane ont été proposées pour améliorer la stabilité des complexes en conditions physiologiques et par conséquent augmenter les taux de transfection. Les modifications chimiques courantes incluent la quaternisation des amines primaires pour augmenter leur taux de protonation à pH physiologique et le greffage de groupements hydrophiles pour améliorer la solubilité des chaînes de chitosane. Généralement, ces modifications affectent l'intégrité du chitosane et peuvent dans certaines cas compromettre ses propriétés de complexation.

Dans ce contexte, cette thèse est consacrée à l'élaboration de deux stratégies visant à stabiliser les complexes formés entre le chitosane et l'ADN. La première approche repose sur l'utilisation de copolymères à blocs linéaires chitosane-*b*-dextrane. Le dextrane, grâce à ses propriétés hydrophiles et sa capacité à limiter l'agrégation, permet d'améliorer la solubilité et la dispersion des complexes en milieu aqueux. La seconde approche consiste à combiner l'acétylation du chitosane avec l'ajout d'ions zinc aux complexes formés avec l'ADN pour obtenir des particules stables en conditions physiologiques. Le zinc, en formant des complexes de coordination avec les amines du chitosane et les bases azotées de l'ADN, favorise la cohésion des complexes et renforce leur stabilité en conditions physiologiques.

Le premier chapitre de ce manuscrit est une étude bibliographique des systèmes de délivrance de gènes à base de chitosane. Il commence par une présentation détaillée des propriétés physico-chimiques et biologiques du chitosane, ainsi que de son comportement en solution. Cette introduction est suivie d'une analyse détaillée des complexes polyélectrolytes (PEC) formés entre le chitosane et les acides nucléiques, mettant en évidence les principaux facteurs régissant la formation de ces polyplexes. Les différentes modifications covalentes et non covalentes du chitosane, visant à améliorer la stabilité et l'efficacité des complexes *in vitro*, ont ensuite été abordées. Une dernière section est dédiée aux méthodes de synthèse de copolymères à blocs linéaires à base de polysaccharides. Dans la littérature, les exemples de copolymères à blocs composés d'un bloc polysaccharide et d'un bloc synthétique sont relativement nombreux. Cependant, peu d'études se sont intéressées au couplage linéaire de deux blocs polysaccharides, et ce, malgré l'utilisation fréquente de la chimie « click » pour la synthèse de copolymères à blocs.

Le second chapitre est consacré à la synthèse de copolysaccharides à blocs linéaires de chitosane et de dextrane. La stratégie de synthèse choisie présente l'avantage majeur de préserver l'intégrité du chitosane, puisque le couplage s'effectue exclusivement via les extrémités réductrices des deux polysaccharides. Pour réaliser ce couplage, deux diamines commerciales ont été testées : le dihydrazide adipique (ADH) et le dichlorure de O,O'-1,3-propanediylbishydroxylamine (PDHA), deux diamines reconnues pour leur forte nucléophilie (effet α). Bien que toutes deux soient très réactives vis-à-vis des

extrémités réductrices des polysaccharides, le PDHA a été privilégié en raison de la stabilité des liaisons oximes formées, permettant de s'affranchir de l'étape de réduction. Dans son ensemble, la méthode proposée permet de pallier la faible réactivité des extrémités réductrices ainsi que la faible solubilité du chitosane, tout en assurant l'obtention de copolysaccharides à blocs linéaires avec de très bons rendements. Ce travail a donné lieu à une publication dans le journal *Carbohydrate Polymers* : E. Courtecuisse, S. Bourasseau, B. E. Christensen, et C. Schatz, « Synthesis of linear chitosan-*block*-dextran copolysaccharides with dihydrazide and dioxyamine linkers », *Carbohydrate Polymers*, vol. 345, p. 122576, déc. 2024, doi: 10.1016/j.carbpol.2024.122576.

Le troisième chapitre s'intéresse à la stabilité des complexes chitosane/ADN en conditions physiologiques. Dans un premier temps, il est démontré qu'un degré d'acétylation supérieur à 40 % améliore considérablement la solubilité du chitosane et la stabilité des complexes. L'ajout d'ions zinc, qui interagissent avec le chitosane et l'ADN par le biais de liaisons de coordination, contribue à prévenir la précipitation du chitosane et renforcer la stabilité des complexes. Cette synergie permet d'obtenir des complexes chitosane/ADN particulièrement stables en conditions physiologiques. Les copolysaccharides chitosane-b-dextrane précédemment synthétisés ont été exploités pour la formulation de polyplexes avec l'ADN, révélant qu'un bloc de dextrane quatre fois plus long que celui du chitosane contribue également à la stabilisation des complexes en conditions physiologiques.

Le quatrième et dernier chapitre est dédié à l'évaluation biologique *in vitro* de l'efficacité des deux stratégies de stabilisation des complexes, à savoir l'utilisation du zinc ou de copolysaccharides chitosane-b-dextrane, à travers des tests de transfection du plasmide codant pour l'eGFP sur des cellules HEK 293 en suspension. Les complexes particulièrement stables formés précédemment avec du chitosane de haut DA et en présence de zinc se sont avérés peu efficaces pour la transfection, probablement en raison d'une dissociation insuffisante, liée à leur remarquable stabilité en conditions physiologiques. Cependant, bien que l'expression de la protéine fluorescente soit nettement inférieure à celle obtenue avec un agent de transfection commercial tel que la PEI, l'incorporation d'un bloc de dextrane linéaire a considérablement amélioré les taux de transfection par rapport au chitosane seul. L'analyse par microscopie confocale de fluorescence a montré que, bien que les complexes soient efficacement internalisés par les cellules, leur dissociation dans le cytoplasme demeure limitée. Cela soulève des questions quant à la conception des systèmes de vectorisation à base de chitosane, qui doivent non seulement prévenir l'agrégation en conditions physiologiques, mais aussi assurer une dissociation efficace dans le cytoplasme pour libérer le matériel génétique.

Chapitre 1 : Bibliographie

1. LE CHITOSANE : ORIGINE, PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES ET BIOLOGIQUES

1.1. De la chitine au chitosane

La chitine ou poly (β -(1 \rightarrow 4)-*N*-acétyl-D-glucosamine) (Figure 1) est le deuxième biopolymère le plus abondant après la cellulose. Isolée pour la première fois par Henri Braconnot en 1811 à partir des parois cellulaires des champignons, la chitine se retrouve dans de nombreux organismes vivants, tels que les champignons, l'exosquelette de certains insectes, ainsi que certaines levures et bactéries. De nos jours, elle est principalement produite à partir de ressources marines comme les zooplanctons, les phytoplanctons et surtout les carapaces de crustacés comme les crevettes et les crabes [1]. La production annuelle de chitine par la biosphère est estimée à 10^{11} tonnes [2]. L'extraction de la chitine des crustacés implique un traitement acide pour dissoudre le carbonate de calcium, suivi d'une extraction alcaline pour solubiliser les protéines. Une étape de décoloration est généralement ajoutée pour éliminer les pigments restants et obtenir un produit incolore [3]. La désacétylation partielle de la chitine en conditions alcalines permet d'obtenir le chitosane, son principal dérivé en termes d'applications. Le chitosane est composé d'unités β -(1 \rightarrow 4)-*N*-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) et β -(1 \rightarrow 4)-D-glucosamine (GlcN). Le degré d'acétylation (DA) correspond à la fraction molaire en unités *N*-acétylées (Figure 1).

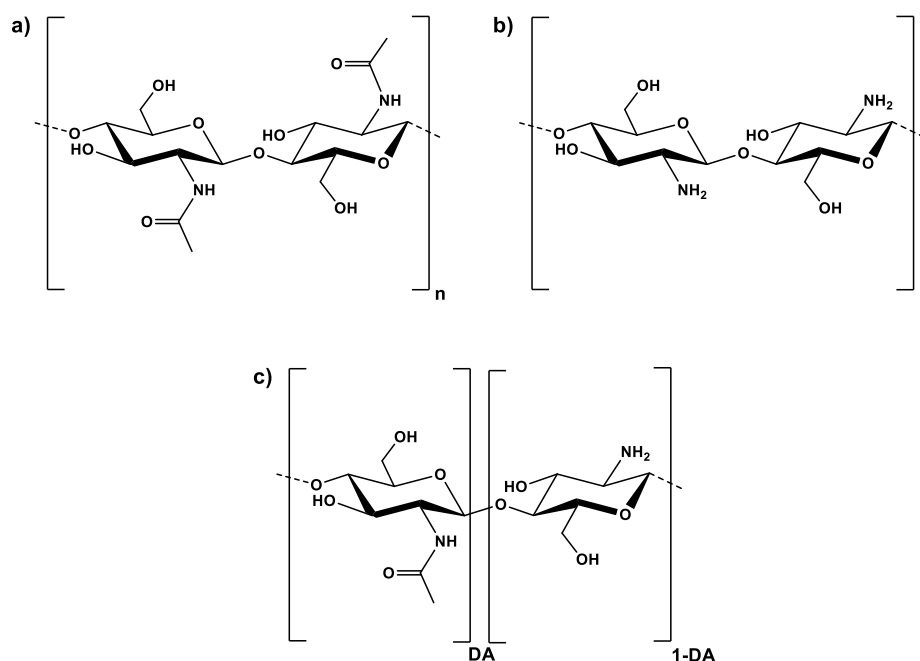


Figure 1. Structures chimiques a) de la chitine, b) du chitosane et c) d'un chitosane partiellement acétylé.

La chitine et le chitosane se distinguent principalement par leurs propriétés de solubilité. Le chitosane est soluble dans des solutions aqueuses légèrement acides, grâce à la protonation de ses amines primaires, tandis que la chitine est insoluble dans l'eau, sauf à de très faibles degrés de polymérisation ($DP < 6$) [4]. Le terme chitosane est utilisé lorsque le degré d'acétylation est suffisamment bas pour permettre la protonation d'un nombre suffisant d'unités glucosamine afin de solubiliser la chaîne polymère [5]. Cette condition est généralement atteinte lorsque le DA est inférieur à 50%, bien que cela dépende de la masse molaire et de l'origine du chitosane [6],[7].

Le degré d'acétylation et la masse molaire du chitosane sont des paramètres cruciaux à contrôler, car ils ont un impact significatif sur ses propriétés en solution et biologiques. La désacétylation hétérogène de la chitine en milieu alcalin est le procédé le plus utilisé à l'échelle industrielle pour contrôler le DA. Ce procédé nécessite l'utilisation d'hydroxyde de sodium ou de potassium concentré (> 40%) à haute température (> 80°C) et pendant plusieurs heures [8]. Sous de telles conditions de réaction, la chitine est sensible à l'hydrolyse, entraînant une importante dégradation des chaînes polymères. Cette méthode ne permet donc pas l'obtention de chitosane de faible DA et de haute masse molaire. Lamarque *et coll.* ont mis en place une méthode de désacétylation hétérogène de la chitine par cycles de congélation-pompage-décongélation permettant d'éliminer le dioxygène, qui catalyse la dégradation des chaînes. Par ailleurs, ce procédé permet également de déstructurer les domaines cristallins de la chitine facilitant la désacétylation du polymère. Les auteurs ont décrit l'obtention de chitosane entièrement désacétylé avec des masses molaires élevées [9]. Un autre moyen de moduler le DA du chitosane tout en conservant sa masse molaire initiale est de procéder à l'acétylation d'un chitosane peu acétylé par action de l'anhydride acétique en conditions douces [10]. Ces conditions permettent d'avoir une distribution statistique des motifs acétylés le long de la chaîne.

Concernant le contrôle de la masse molaire, il existe plusieurs méthodes pour dégrader le chitosane et ainsi obtenir des oligosaccharides de chitosane (COS). Parmi les méthodes de dégradation du chitosane, on peut mentionner l'hydrolyse acide [11], la dégradation enzymatique [12] ou encore la dégradation physique par micro-ondes [13] ou par ultra-sons [14]. Ces méthodes présentent toutefois plusieurs inconvénients : elles nécessitent souvent de longs temps de réaction, des températures élevées et/ou ne sont que très peu contrôlées. La dégradation du chitosane par action du nitrite de sodium est une voie bien plus avantageuse [15]. En effet, elle présente l'avantage d'être rapide, peu onéreuse et bien contrôlée (Figure 2). La dépolymérisation du chitosane avec du nitrite de sodium se fait par un mécanisme de désamination nitreuse (Figure 3).

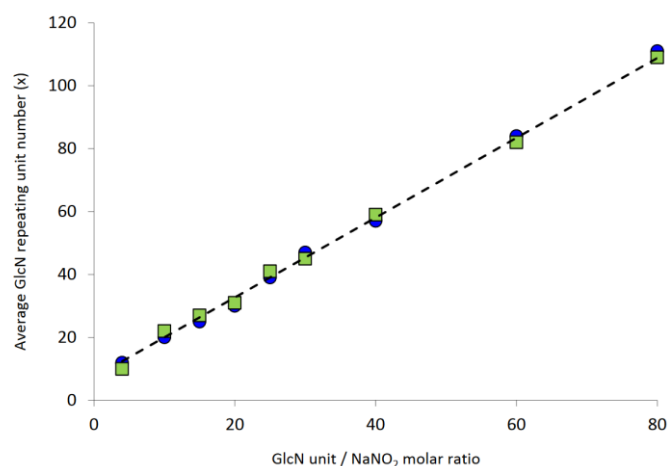


Figure 2. Variation du degré de polymérisation (x) du chitosane en fonction du rapport molaire GlcN/NaNO₂. Les valeurs de x ont été obtenues par RMN ¹H (vert) et par SEC-MALS (bleu) [16].

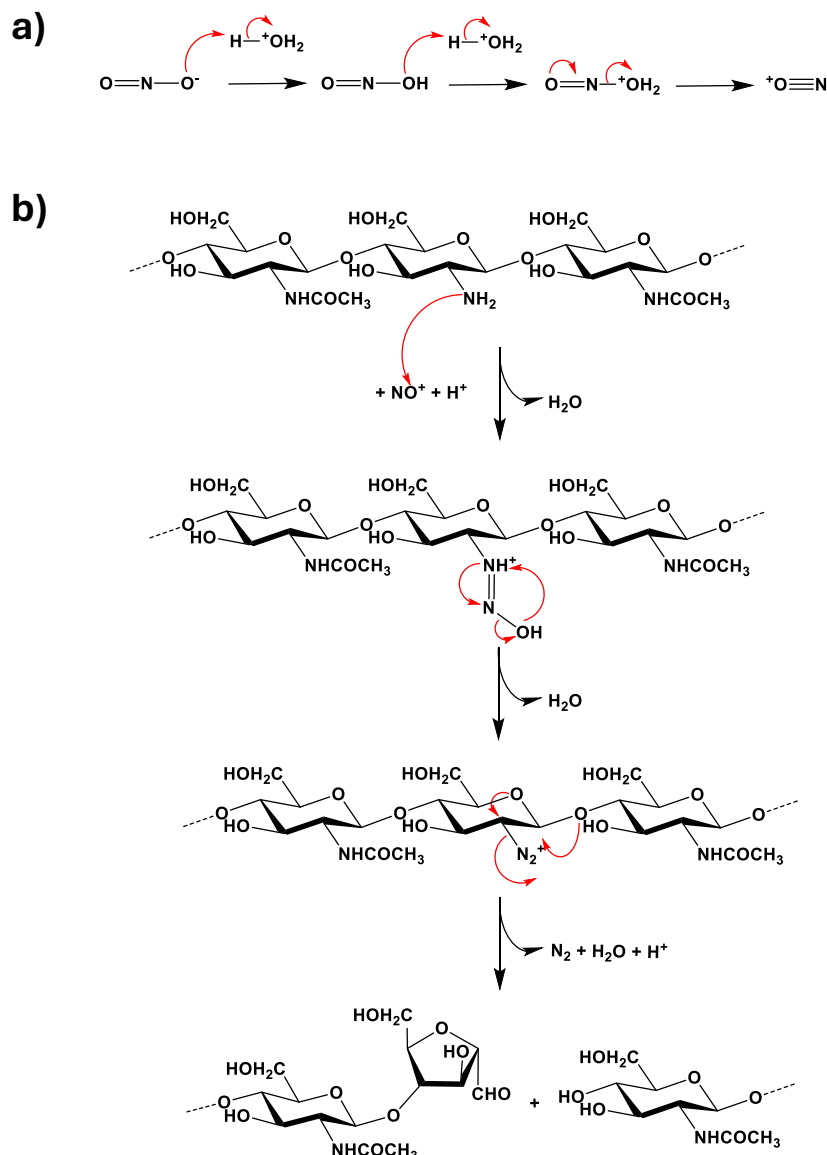


Figure 3. Mécanisme de dépolymérisation du chitosane par action de l'acide nitreux proposé par Tømmeraaas *et coll.* [17]. a) Protonation de la molécule d'acide nitreux (HONO) en ion nitrosonium (NO^+) permettant b) la *N*-nitrosation d'une amine latérale de la chaîne de chitosane. La *N*-nitrosamine formée, instable, se réarrange pour former un ion diazonium. L'addition nucléophile de l'oxygène endocyclique conduit à une scission de la chaîne polymère du chitosane [18].

La désamination nitreuse est une réaction homogène au cours de laquelle le nombre de liaisons glycosidiques clivées est stœchiométrique vis-à-vis de la quantité de nitrite de sodium engagée. La nouvelle extrémité réductrice de la chaîne de chitosane générée lors de cette réaction est une unité 2,5-anhydro-*D*-mannose (unité M) qui possède une fonction aldéhyde hautement réactive en équilibre avec un diol géminé (Figure 4). Cette unité est généralement désactivée en présence d'un agent réducteur tel que NaBH_4 pour éviter des réactions de branchement avec les amines latérales de la chaîne. Bezrodnykh *et coll.* ont décrit que cette réaction ne permettait pas totalement d'éliminer ces réactions secondaires et ont proposé comme alternative la fonctionnalisation terminale avec l'hydroxylamine (NH_2OH) [19].

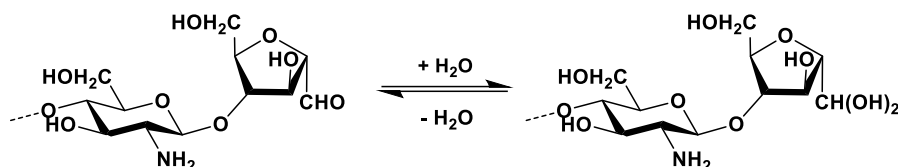


Figure 4. Equilibre d'hydratation entre l'aldéhyde terminal sous sa forme libre et sous forme diol géminé pour un chitosane dépolymérisé en présence de nitrite de sodium.

1.2. Propriétés du chitosane en solution

Le chitosane est un polyélectrolyte faible et plus spécifiquement une polybase faible dont le pK_0 intrinsèque est de 6,5 [20]. Par définition, un polyélectrolyte faible est un polymère possédant des groupes acides ou basiques dont le degré de dissociation varie avec le pH du milieu, ils diffèrent par conséquent des polyélectrolytes forts qui sont totalement ionisés et donc solubles sur une large gamme de pH. Dans le cas du chitosane, ce dernier est soluble lorsque le pH du milieu est globalement inférieur à son pK_0 . Cependant, le comportement en solution du chitosane dépend fortement de sa masse molaire et son degré d'acétylation. En évaluant la fraction de polymère insoluble en fonction du pH, il a été établi que le chitosane est d'autant plus soluble que la masse molaire des chaînes diminue (Figure 5.a) et que le degré d'acétylation augmente (Figure 5.b).

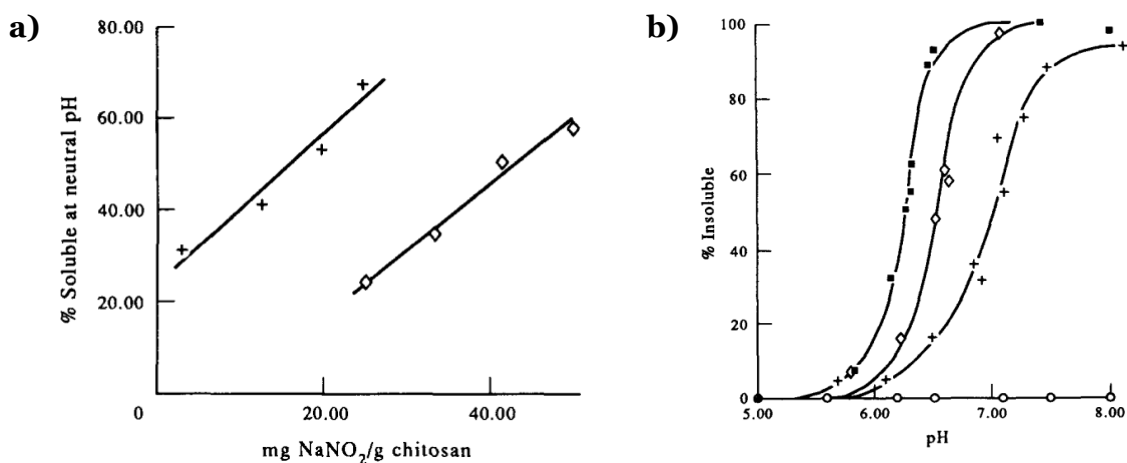


Figure 5. a) Solubilité du chitosane à pH neutre en fonction de la masse molaire exprimée à travers la quantité de nitrite de sodium engagée. b) Solubilité du chitosane en fonction du DA. ■ DA 1%, ◇ DA 17%, + DA 37%, ○ DA 60% [6].

Un suivi par diffusion statique et dynamique de la lumière a permis de déterminer plus précisément les pH critiques auxquels le chitosane commence à s'agréger, ce qui se traduit par une augmentation du rayon de giration ou simplement de l'intensité diffusée. Ainsi, comme évoqué précédemment, le pH critique auquel le chitosane commence à précipiter est fortement corrélé à son degré d'acétylation et son degré de polymérisation. Pour un DA de 1%, le pH critique diminue de 7,5 à 6,1 pour un DP variant de 5 à 50 (Figure 6.a). Pour un DP de 800, le pH critique augmente de 6,15 à 7,5 pour un DA variant de 1 à 50% (Figure 6.b). L'analyse par diffusion statique de la lumière devient particulièrement pertinente lorsque le DA dépasse 50 %. Dans ces conditions, le chitosane est soluble à tout pH, mais les valeurs de rayon de giration obtenues indiquent que le chitosane est plutôt sous forme de microgels que de pelote polymère [21].

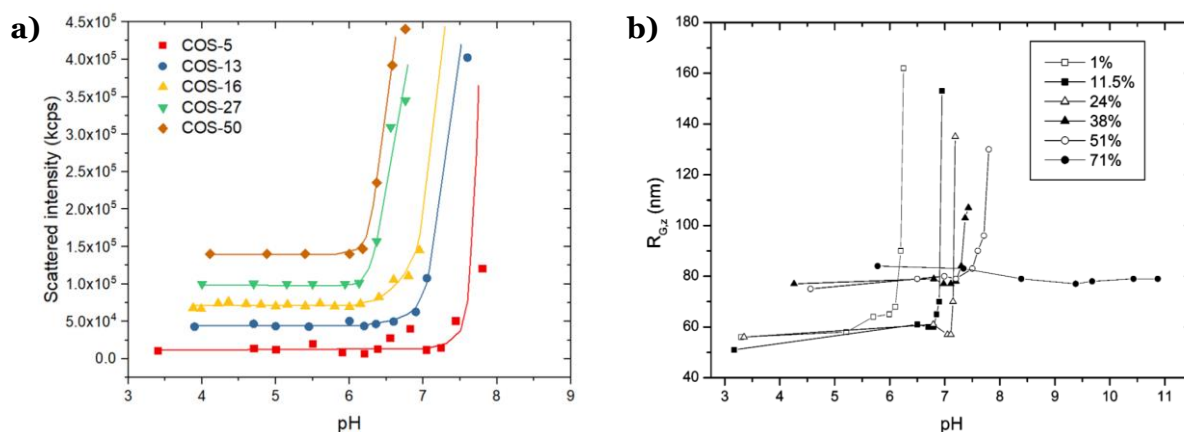


Figure 6. a) Variation de l'intensité diffusée en fonction du pH pour des oligosaccharides de chitosane de différents DPs (DA 1%) [22]. b) Variation du rayon de giration obtenu à partir de mesures MALS (Multi-Angle Light Scattering) en fonction du pH pour des chitosanes de différents DAs (DP 800) dans une solution de 0,1 M NaCl [21].

La valeur du DA ne suffit pas à prédire la solubilité du chitosane ; en effet, la distribution des unités acétylées le long de la chaîne du chitosane a également son importance. Il a été suggéré que la désacétylation hétérogène tend à favoriser une distribution à blocs des unités acétylées tandis que l'acétylation homogène favoriserait une distribution aléatoire des unités acétylées le long de la chaîne. Ainsi, le chitosane avec une distribution aléatoire des unités acétylées présenterait une meilleure solubilité que celui présentant des blocs d'unités acétylées [23]. Weinhold *et coll.* ont par la suite mis en évidence par RMN ¹³C qu'il n'y avait pas de différence de distribution des motifs acétylés entre un chitosane obtenu par désacétylation ou réacétylation [24].

La force ionique du milieu influence également les propriétés du chitosane en solution. A mesure que la concentration en sels augmente, l'écrantage des charges devient plus prononcé, réduisant ainsi les répulsions électrostatiques intra-chaînes et entraînant leur compaction [21]. En augmentant le DA, l'écrantage devient moins important au profit de l'influence des interactions hydrophobes responsables du phénomène de précipitation [25]. Ces interactions hydrophobes sont étroitement liées au contre-ion utilisé. En effet, en fonction de la position des ions considérés dans la série de Hofmeister, ils peuvent soit stabiliser (ions kosmotropes) soit déstabiliser les interactions hydrophobes (ions chaotropes). Dans le cas du chitosane, les ions kosmotropes tels que les ions acétate auront plus tendance à favoriser l'hydratation et donc l'hydrophilie du chitosane que des ions chaotropes comme les perchlorates [26],[27]. La solubilité du chitosane et des polyélectrolytes en général diminue pour des concentrations en sels élevées, ce qui correspond à un effet de *salting-out* [22]. Cette diminution de solubilité est due à l'interaction des ions du sel avec les groupes ionisables du polyélectrolyte, ce qui réduit les interactions entre le polyélectrolyte et les molécules d'eau. De plus, les ions du sel interagissent également avec les molécules d'eau, diminuant ainsi la quantité d'eau disponible pour solubiliser le chitosane [28]. Ces deux effets combinés conduisent à une réduction significative de la solubilité du chitosane.

Un aspect également important du chitosane est sa cationicité c'est-à-dire sa capacité à se comporter comme un polycation dans différentes conditions de pH. Sorlier *et coll.* ont démontré l'existence de trois types de comportements du chitosane en solution (Figure 7). i) Pour des valeurs de DA comprises entre 0% et 20%, le comportement du chitosane correspond à celui d'un polyélectrolyte dont la densité de

charge augmente à mesure que le DA diminue. ii) Pour des valeurs de DA proches de 20%, le chitosane adopte le comportement d'un électrolyte simple avec un pK_a qui varie très peu avec l'augmentation du degré de dissociation (α). iii) Au-delà d'un DA de 20%, une inversion de comportement est observée ; le pK_o augmente considérablement avec le DA mais le pK_a diminue avec l'augmentation de α . Dans cette région, le comportement du chitosane s'apparente à celui de charges isolées dont l'environnement hydrophobe augmente avec le DA [25],[29]. Finalement, l'augmentation du pK_o , passant de 6,46 pour un DA de 5 % à 7,14 pour un DA de 89 % illustre une augmentation de la cationicité des groupes amine dans un environnement plus hydrophobe. Contrairement à la polyéthylèneimine (PEI) dont le pK_a est compris entre 6 et 9 [30], le chitosane même à DA élevé est faiblement cationique à pH physiologique ce qui est en lien direct avec sa faible toxicité [7].

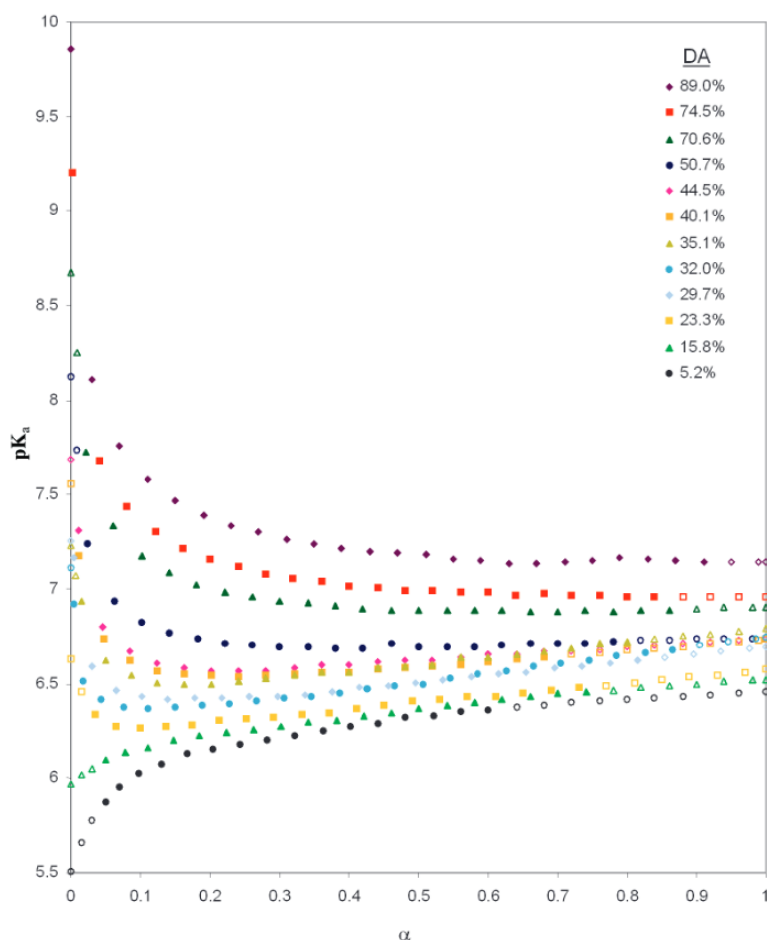


Figure 7. Variation du pK_a en fonction du degré de dissociation (α) et du DA [25].

Finalement, il apparaît que les propriétés en solution du chitosane peuvent être résumées par une loi générale de comportement dépendant du DA. (i) pour des $DA \leq 20\%$, le chitosane adopte les propriétés d'un polyélectrolyte cationique, dont le comportement est régi par la densité de charge. Dans ce domaine, la conformation et les propriétés du chitosane sont principalement déterminées par les interactions électrostatiques intra- et intermoléculaires, qui peuvent être atténuées par l'ajout de sel. (ii) pour des DA compris entre 20% et 50%, les interactions hydrophiles et hydrophobes se compensent n'entraînant pas de réelle influence du DA sur le comportement physicochimique du chitosane. (iii) pour

des DA > 50%, la prédominance des interactions hydrophobes entraîne l'association des chaînes polymères et conduit à la formation de microgels [21],[31].

Finalement, une connaissance précise des paramètres influençant la solubilité du chitosane, tels que sa masse molaire, son degré d'acétylation, sa concentration, la force ionique et le pH du milieu, permet de prédire efficacement sa solubilité.

1.3. Propriétés biologiques du chitosane

Le chitosane trouve des applications importantes dans des domaines tels que l'agriculture, l'industrie alimentaire, les cosmétiques ou encore le traitement de l'eau. Ses propriétés biologiques intrinsèques permettent également de l'utiliser pour des applications biomédicales. En effet, le chitosane est un polysaccharide biodégradable et biocompatible.

La biodégradabilité du chitosane est liée à la présence de chitosanases et chitinases dans de nombreuses cellules (bactéries, plantes, animaux, champignons) capables de le dégrader par hydrolyse des liaisons β -(1 \rightarrow 4) entre les unités de D-glucosamine (GlcN). Il a également été démontré que les lysozymes sont capables de dégrader les chaînes de chitosane. Les lysozymes ont une grande affinité pour les unités N-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc), ils hydrolysent sélectivement les liaisons glycosidiques β -(1 \rightarrow 4) entre les unités GlcNAc et les unités GlcN. Par conséquent, plus le degré d'acétylation (DA) du chitosane est élevé, plus sa dégradation par les lysozymes sera efficace (Figure 8) [32],[33].

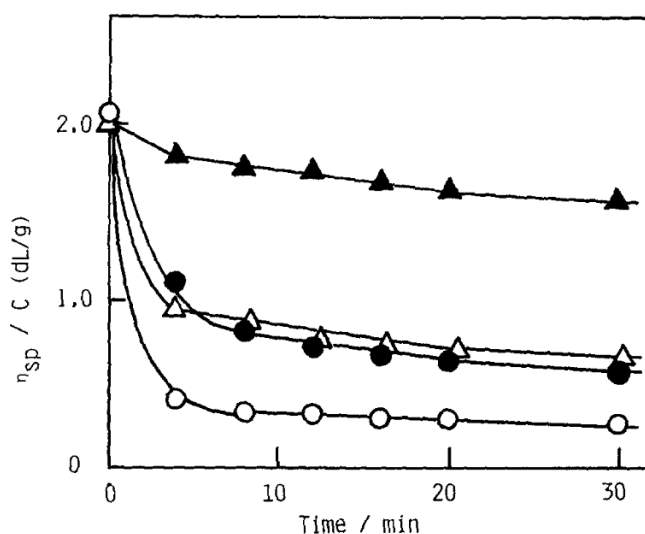


Figure 8. Evolution de la viscosité du chitosane à différents DAs (○ DA 33%, ● DA 23%, △ DA 16%, ▲ DA 9%) sous l'action de lysozymes de blanc d'œuf [32].

La biocompatibilité du chitosane est liée à son origine naturelle, sa faible toxicité, en lien avec sa faible cationicité à pH physiologique, ainsi que sa faible immunogénicité et son caractère non-hémolytique [32],[33].

Le chitosane est également considéré comme bioactif en raison de ses propriétés biologiques telles que son activité immunostimulante, ses propriétés antimicrobiennes, antifongiques, antioxydantes ou encore antitumorales [1].

Grâce à son activité immunostimulante, le chitosane favorise la cicatrisation des plaies en diminuant le temps de coagulation du sang (Figure 9), en augmentant la production de macrophages et la sécrétion de cytokines essentielles au processus de guérison [36]. Les chitosanes avec de faibles DAs peuvent également venir stimuler la production de fibroblastes et accélérer le processus de cicatrisation [37]. Il a été proposé que le chitosane accélère indirectement la prolifération des fibroblastes en formant des complexes avec l'héparine, une molécule aux propriétés anticoagulantes et angiogéniques, qui favorise également la mitogénèse des fibroblastes [38].

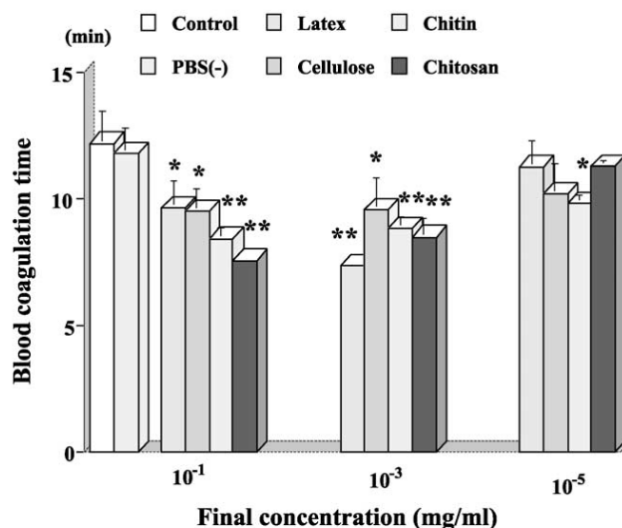


Figure 9. Effet de la chitine et du chitosane sur le temps de coagulation du sang [36].

Les propriétés antimicrobiennes du chitosane sont bien établies, bien que son mécanisme d'action ne soit pas parfaitement élucidé. L'hypothèse la plus plausible est une modification de la perméabilité cellulaire due aux interactions entre le chitosane chargé positivement et la membrane cellulaire chargée négativement, le chitosane étant donc plus efficace sur des bactéries Gram-négatives que Gram-positives [39]. Il a également été démontré qu'une diminution du DA, de la masse molaire et du pH augmente l'activité antimicrobienne du chitosane [40]. Le chitosane possède également des propriétés antifongiques, notamment sur certaines plantes. Il est suggéré qu'en formant un film perméable à la surface des plantes, le chitosane crée une interférence avec la croissance des champignons tout en activant divers processus de défense tels que l'accumulation de chitinases, la synthèse de callose ou la lignification [41].

Les propriétés antioxydantes du chitosane sont liées à sa capacité à neutraliser des radicaux oxygénés - hydroxyle, superoxyde, alkyle et 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) [42] – empêchant ainsi les réactions d'oxydation pouvant endommager les cellules et les tissus. Une fois de plus, il a été démontré que les chitosanes de faibles masses molaires et DAs ont des meilleures propriétés antioxydantes [43],[44]. Même si le mécanisme précis de neutralisation des radicaux par le chitosane n'est pas complètement élucidé, il est majoritairement attribué aux groupes amine et hydroxyle qui réagissent avec les radicaux libres et forment des complexes macromoléculaires radicalaires stables [3],[45].

Les propriétés antitumorales du chitosane ont également été démontrées. Il peut agir selon plusieurs modes d'actions au niveau des cellules tumorales. Un premier mécanisme antitumoral est indirect ; le chitosane augmente la production de lymphokines conduisant à la prolifération de lymphocytes-T [46]. Il peut également agir de manière directe en activant la production de caspase-3 qui induit l'apoptose des cellules tumorales par fragmentation de l'ADN [47]. Il a été prouvé que les chitosanes de faible masse (COS) possèdent une activité antitumorale supérieure à celle des chitosanes de masses molaires plus élevées. Une explication possible est que les COS interagissent plus efficacement avec les récepteurs cellulaires en raison d'une meilleure diffusion et accessibilité par rapport à des chaînes plus longues [3]. Cependant, pour maintenir leur efficacité antitumorale, les COS doivent comporter au moins six unités glucosamine ; en dessous de ce seuil, leur effet antitumoral est largement diminué (Figure 10) [48],[49].

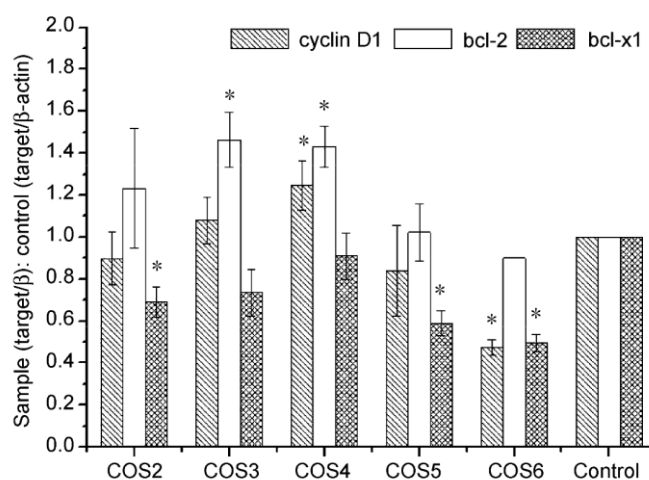


Figure 10. Impact du degré de polymérisation des COS sur l'expression de la *cycline D1*, des ARNm de *bcl-xl* et de *bcl-2* dans les cellules A549 [49].

Il a également été démontré que les COS sont efficaces pour induire une perte de poids, réduire les niveaux de triglycérides et de cholestérol sérique, ainsi que limiter l'accumulation de lipides dans les hépatocytes et les tissus adipeux chez les modèles animaux [50],[51]. Les COS perturbent le métabolisme des lipides dans le corps en inhibant l'activité de la lipase pancréatique, enzyme principale de la digestion et de l'absorption des lipides dans l'intestin. Cette inhibition permet d'interrompre efficacement la digestion et l'absorption des lipides alimentaires dans le corps [52].

En raison de ses diverses activités biologiques et de son caractère polyélectrolyte, le chitosane se présente comme une alternative non toxique à la PEI. Il offre ainsi de nouvelles possibilités pour le développement de complexes chitosane/acides nucléiques.

2. COMPLEXES POLYELECTROLYTES CHITOSANE/ACIDES NUCLEIQUES

La répulsion électrostatique entre les acides nucléiques (AN) et les membranes cellulaires tous deux chargés négativement empêche l'entrée des AN libres dans les cellules. Il devient alors essentiel de mettre en place un système de vectorisation pour permettre leur internalisation dans les cellules mais également pour les protéger des nucléases présentes dans le plasma [53]. La délivrance génique non virale repose sur l'utilisation de polycations ou de lipides cationiques formant des complexes avec les acides nucléiques (ADN, ARN), appelés respectivement polyplexes ou lipoplexes. Grâce à ses propriétés

polycationiques, le chitosane peut interagir avec les AN en formant des complexes polyélectrolytes (PEC), ce qui permet de les condenser et de les protéger.

2.1. Formulation des polyplexes chitosane/AN

Les polyélectrolytes de charges opposées forment spontanément des PEC principalement via des attractions électrostatiques fortes [54]. Les propriétés des PECs sont influencées par plusieurs paramètres tels que la structure des polyélectrolytes (longueur et densité de charge), le rapport de charge, le pH et la force ionique du milieu. Le mélange direct d'une solution de chitosane avec une solution d'AN est la méthode la plus simple et la plus fréquemment utilisée pour produire des nanoparticules à base de chitosane destinées à la délivrance d'AN [35]. Les deux principaux paramètres déterminant les propriétés physicochimiques des polyplexes sont la concentration en AN et le rapport molaire amine/phosphate (N:P). Tous les formulations ayant transfecté efficacement présentent un excès de chitosane par rapport à l'AN utilisé ($N:P > 1$), ce qui confère une charge positive aux complexes. Cet excès de chitosane a pour rôle de protéger les AN de la dégradation par les nucléases tout en favorisant l'internalisation des systèmes dans les cellules par interaction électrostatique avec les membranes cellulaires et nucléaires toutes deux chargées négativement. Le second paramètre essentiel à contrôler est la concentration en AN ; toutes les études tendent à prouver que la taille des polyplexes augmente avec la concentration en AN [35]. De façon générale, les formulations de systèmes de délivrance de gènes non viraux nécessitent des concentrations en AN diluées, proches ou inférieures à 0,1 mg/mL afin d'obtenir des nanoparticules petites et relativement homogènes en tailles [55]. Dans de telles conditions de dilution, les doses administrables de ces systèmes sont limitées et nécessitent la mise en place de méthodes de concentration des polyplexes comme la lyophilisation [55] ou la filtration tangentielle [35],[56].

De façon générale, les réactions de complexation sont gouvernées par la cinétique plutôt que la thermodynamique en raison de la formation quasi instantanée des polyplexes ($< 5 \mu s$ [57]). Dans ces conditions, les propriétés des complexes sont fortement dépendantes des conditions de mélange : l'ordre d'ajout [58], la présence ou l'absence de sels lors du mélange [59],[60], la température [59] ou encore les volumes ajoutés [61],[62]. Cela signifie que l'ajout rapide de la solution de chitosane à celle d'AN présente des limitations au niveau de la reproductibilité et de l'homogénéité questionnant la transposition du procédé à une échelle industrielle. Des systèmes comme un mélangeur en ligne avec connecteur en T [63] ou un mélangeur statique couplé à une double seringue [64] ont été testés, et leurs paramètres, notamment les vitesses de mélange, ont été ajustés afin de permettre l'obtention de polyplexes de petite taille et monodisperses.

2.2. Propriétés physicochimiques des polyplexes chitosane/AN

Une caractérisation complète des polyplexes chitosane/AN est nécessaire afin de mieux comprendre leur mécanisme de formation ainsi que l'influence de leurs propriétés sur l'efficacité de la transfection.

2.2.1. Taille des polyplexes

De façon générale, les tailles des PECs sont très variables car fondamentalement rien ne limite leur croissance contrairement à des agrégats micellaires de molécules amphiphiles. Il est donc important de

contrôler la taille des PECs au moment de leur formation. La diffusion dynamique de la lumière (DLS) est généralement utilisée pour déterminer le rayon hydrodynamique (R_H) des polyplexes mais également pour évaluer leur stabilité au cours du temps. Les valeurs de taille rapportées dans la littérature pour des polyplexes chitosane/AN varient de quelques dizaines de nanomètres [60] à quelques centaines de nanomètres [59] dépendant de la méthode de préparation, des propriétés du chitosane et de l'AN utilisé, ainsi que du milieu d'analyse.

Comme mentionné précédemment, plusieurs études s'accordent à dire que le paramètre expérimental le plus important permettant de contrôler la taille des particules est la concentration de la solution d'AN en lien avec la structure de type agrégats ouverts. Pour des complexes à base d'ADN plasmidique, les tailles de particules varient typiquement de 100 nm au micron (Figure 11) [65]. Pour des complexes à base de siRNA, Malmo *et coll.* [60] ont décrit des tailles de complexes proches de 50 nm obtenus avec une concentration en AN de 1,2 $\mu\text{g/ml}$ et pour un rapport N:P de 30, tandis que Nielsen *et coll.* [66] ont obtenu des particules polydisperses d'environ 300 nm avec une concentration en siRNA d'environ 3,5 mg/ml et pour un rapport N:P de 23.

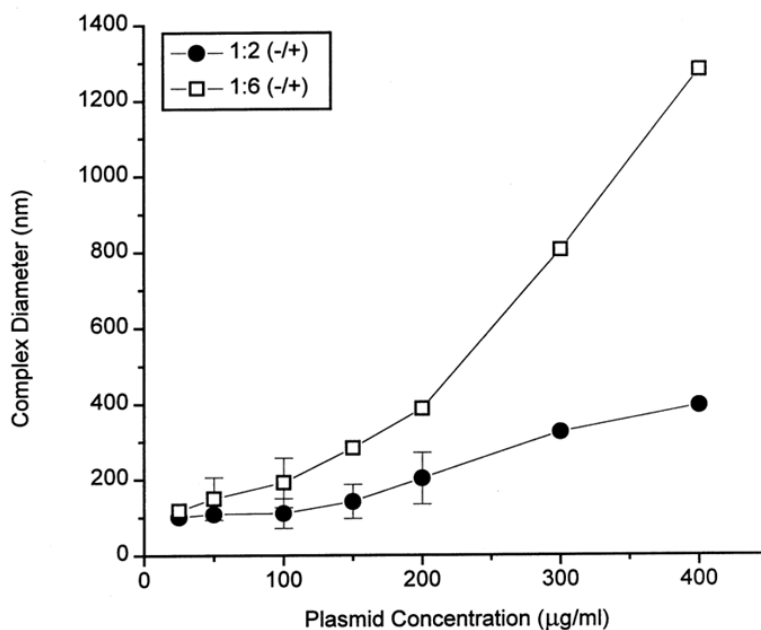


Figure 11. Variation de la taille des complexes chitosane/plasmide en fonction de la concentration en plasmide. Les complexes ont été formulés avec un chitosane de 32 kg/mol [65].

Concernant l'influence du rapport N:P, la plupart des études s'accordent à dire que l'augmentation du rapport N:P n'a que peu d'influence sur une gamme de N:P de 3 à 10 bien qu'une légère contraction des complexes puisse être observée [59],[67]. Cependant, un excès très important en chitosane par rapport à l'AN peut conduire à la formation de polyplexes avec des diamètres légèrement plus grands (Figure 12) [60],[68],[69].

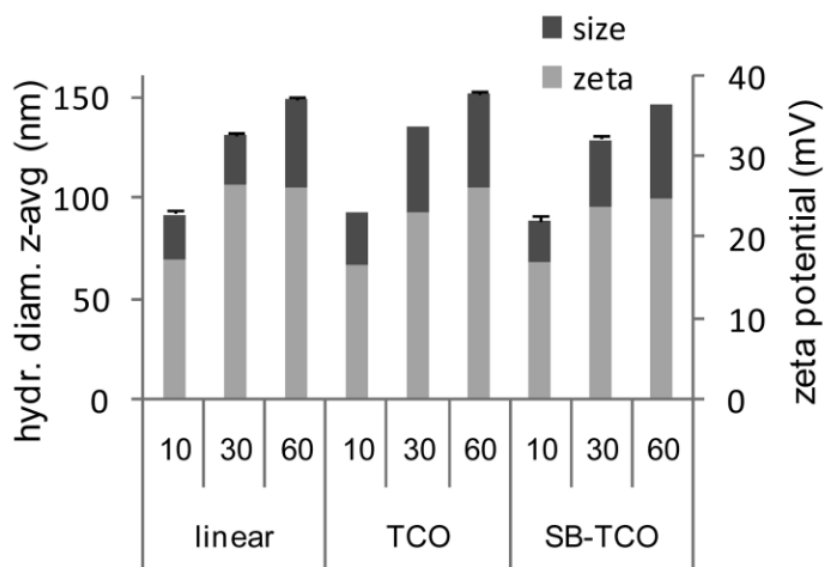


Figure 12. Variation du diamètre hydrodynamique et du potentiel zêta de complexes chitosane/plasmide en fonction du rapport N:P. Les complexes ont été formulés à une concentration de 6 $\mu\text{g/mL}$ en plasmide avec un chitosane linéaire de 7400 g/mol, un chitosane glycosylé (TCO) de 8600 g/mol et avec un chitosane glycosylé auto-ramifié (SB-TCO) de 13 700 g/mol [68].

Les propriétés intrinsèques du chitosane telles que sa masse molaire ou son degré d'acétylation ont un impact sur la taille des polyplexes formés. Plusieurs études démontrent une augmentation de la taille des complexes en lien avec une augmentation de la masse molaire du chitosane (Figure 13) [70],[65]. Cette observation est en lien direct avec la structure des polyplexes, un chitosane de masse molaire élevée conduira à l'obtention d'une couronne positive plus épaisse que celle formée par des plus petites chaînes de chitosane. Cependant l'effet inverse a également été démontré ; une diminution de la taille des complexes avec l'augmentation de la masse molaire de chitosane [61]. Ces résultats contradictoires pourraient s'expliquer par une stabilité colloïdale réduite des polyplexes préparés avec des chitosanes de faibles masse molaires, qui sont stables dans l'eau mais s'agrègent en présence de sel ou également par l'incapacité des petits chitosanes à condenser complètement le plasmide [35],[71]. Des études sur l'influence du degré d'acétylation du chitosane ont montré une légère augmentation de la taille des polyplexes à mesure que le DA augmente [70],[61],[72]. Cela peut être expliqué par le fait que, lorsque le DA augmente, davantage de chaînes de chitosane sont nécessaires pour atteindre un rapport de charges N:P donné [72].

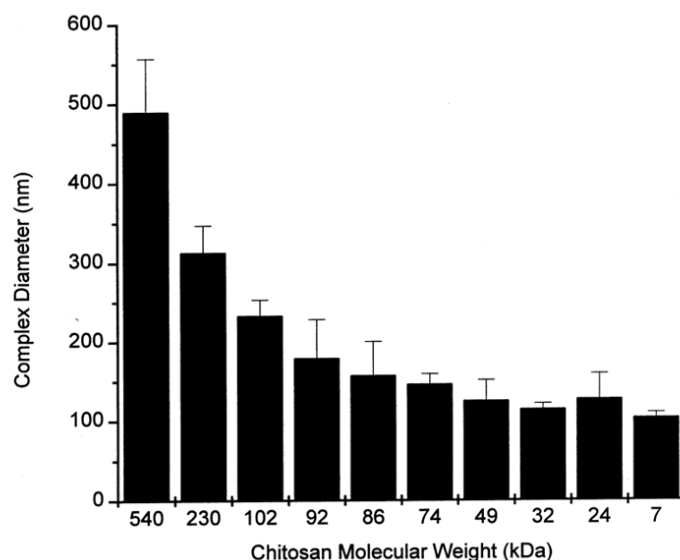


Figure 13. Variation de la taille des complexes chitosane/plasmide en fonction de la masse molaire du chitosane. Les complexes ont été formulés à N:P 6 avec une concentration en plasmide de 100 $\mu\text{g/mL}$ [65].

2.2.2. Potentiel zêta des polyplexes

La stabilité colloïdale des polyplexes chitosane/AN est d'autant meilleure que la charge de surface est importante. Par ailleurs, une forte densité de charge positive facilite également l'internalisation cellulaire des vecteurs [68],[73]. La densité de charge de surface peut être évaluée par mesure du potentiel zêta des particules. Les valeurs rapportées pour les polyplexes à des N:P > 1 varient de quelques millivolts à quelques dizaines de millivolts, dépendant principalement du pH et de la force ionique du milieu ainsi que du rapport de charge N:P. Mao *et coll.* ont rapporté une diminution du potentiel zêta de +20 mV à 0 mV en passant d'un pH 6 à un pH 7 (Figure 14) [59]. Strand *et coll.* ont quant à eux démontré qu'une augmentation du rapport N:P des polyplexes induit une augmentation du potentiel zêta (Figure 12) alors que la masse molaire du chitosane ainsi que son DA ne semblent avoir que très peu d'influence sur celui-ci [72].

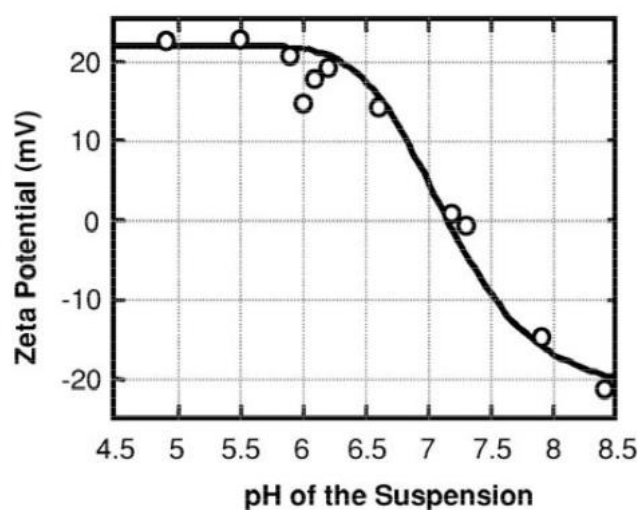


Figure 14. Effet du pH du milieu de suspension des polyplexes chitosane/ADN sur le potentiel zêta [59].

2.2.3. Force des interactions électrostatiques des polyplexes

L'affinité de liaison du chitosane avec les acides nucléiques détermine sa capacité à protéger ces derniers et à assurer la stabilité des polyplexes, influant directement sur l'efficacité de transfection de ces systèmes [71],[74]. L'analyse par retard sur gel ou par déplacement de bromure d'éthidium sont des méthodes utilisées pour évaluer qualitativement cette capacité de complexation et la stabilité des polyplexes. Il a été prouvé que les polyplexes formés avec un chitosane de haut DA, de faible masse molaire ou de faible N:P sont plus facilement dissociés et donc moins stables [70],[75]. Réciproquement, Köping-Höggård *et coll.* ont démontré que des formulations très stables, avec des chitosanes de hautes masses molaires, sont moins efficaces pour la transfection de cellules [75].

Le titrage calorimétrique isotherme (ITC) analysé avec un modèle de sites d'interaction uniques permet de quantifier les constantes de liaison du chitosane au plasmide. En fonction du pH, de la force ionique et des caractéristiques du chitosane, les constantes de liaison varient de ~ 1 à 15 nM^{-1} [76],[77]. Conformément aux résultats précédents, il a été observé que la constante de liaison augmente lorsque le pH ou la force ionique diminue, et lorsque la masse molaire du chitosane augmente ou le DA diminue.

2.2.4. Pouvoir tampon

Lorsque les polyplexes pénètrent dans les cellules par endocytose, ils se trouvent localisés à l'intérieur des endosomes. La compréhension des mécanismes d'échappement endosomal est donc essentielle afin de développer des systèmes de délivrance d'acides nucléiques plus efficaces. Actuellement, plusieurs théories se confrontent ; l'hypothèse de l'éponge à protons [78], de la déstabilisation de la membrane par le polymère [79], de la fusion membranaire [80] ou encore plus récemment, l'hypothèse d'échappement endosomal via les tubules des endosomes de recyclage [81].

Le mécanisme d'éponge à protons étant toujours une des principales théories, il est pertinent de s'intéresser aux polyplexes chitosane/AN de ce point de vue. Selon cette hypothèse, proposée par Behr *et coll.*, les polycations qui présentent un grand pouvoir tampon peuvent limiter l'acidification de l'endosome. Ainsi, au cours de la maturation de l'endosome, les pompes à protons doivent transférer un nombre accru de protons dans le compartiment endosomal pour abaisser le pH. Ce transfert de protons s'accompagne de l'entrée d'ions chlorure afin de maintenir l'équilibre des charges, ce qui entraîne une augmentation de la concentration ionique et un afflux d'eau pour maintenir l'osmolarité. L'afflux de molécules d'eau génère une forte pression osmotique qui provoque le gonflement de l'endosome et entraîne finalement sa rupture et donc la libération de son contenu dans le cytosol [82].

Le pouvoir tampon du chitosane a donc été évalué dans plusieurs études et comparé à celui de la PEI [59], [70], [83]. La plupart des études s'accordent à dire que le chitosane a un pouvoir tampon nettement inférieur à celui de la PEI (Figure 15) ; rendant donc l'échappement endosomal de polyplexes chitosane/AN via le mécanisme d'éponge à protons peu probable. Cependant, d'autres études affirment qu'à des rapports de charge identiques le chitosane posséderait une capacité tampon supérieure à celle de la PEI [84],[85].

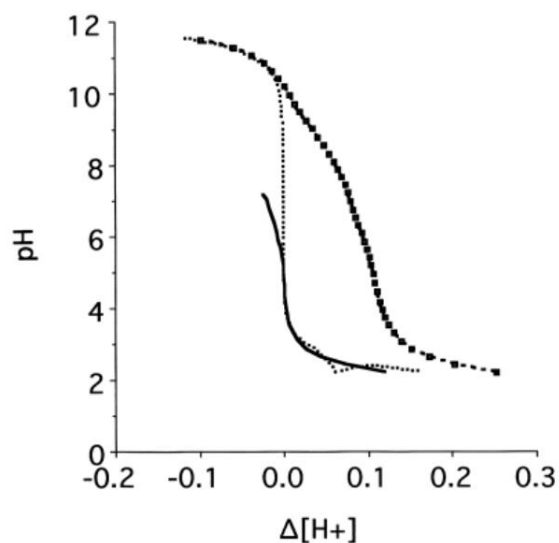


Figure 15. Pouvoir tampon du chitosane (ligne continue) comparé à la PEI (ligne en pointillés en gras) déterminé par titrage acidobasique. Une solution non tamponnée est représentée par une ligne fine en pointillés [70].

2.2.5. Stabilité colloïdale

Le principal inconvénient du chitosane est sa faible solubilité à pH neutre, ce qui engendre des polyplexes instables en conditions physiologiques. La stabilité colloïdale est étudiée en suivant l'évolution du diamètre hydrodynamique des polyplexes au fil du temps dans un milieu simulant les conditions physiologiques (milieu de transfection, PBS, sérum à 10 % + 150 mM de NaCl, etc.). Il a été démontré que la taille des polyplexes chitosane/AN passe d'environ 100 nm à plus d'un micron après seulement une heure d'incubation dans du PBS [68]. Plusieurs modifications du chitosane ont été proposées afin d'améliorer sa solubilité et la stabilité colloïdale de ses polyplexes et sont discutées dans une partie dédiée plus loin dans ce chapitre.

2.3. Evaluation biologique

2.3.1. Trafic intracellulaire

Les polyplexes doivent franchir plusieurs barrières pour assurer l'expression protéique. Ces étapes incluent leur internalisation, l'échappement des vésicules endo-lysosomales ainsi que la dissociation des polyplexes.

Il a été prouvé sur plusieurs types cellulaires que l'internalisation des polyplexes n'est pas l'étape problématique de ce processus. En raison de l'absence de spécificité cellulaire, l'internalisation des complexes à base de chitosane se fait principalement par endocytose non spécifique. Ce processus dépend donc des caractéristiques de surface des complexes [86]. Les membranes cellulaires étant chargées négativement, le processus d'internalisation repose sur des interactions électrostatiques entre les complexes et les membranes. La densité de charge des complexes est le paramètre essentiel influant sur le processus d'internalisation. La masse molaire et le DA affectent donc indirectement cette étape. Huang *et coll.* ont démontré que la force des interactions électrostatiques au sein des complexes ainsi que le taux d'internalisation diminuent lors que la masse molaire diminue et le DA augmente [87]. Les

complexes formés à partir de chitosane de haute masse molaire sont plus stables et offrent donc une meilleure protection aux acides nucléiques contre la dégradation par les nucléases [88] mais ils se dissocient moins bien une fois internalisés. Il convient donc de trouver un compromis permettant une internalisation ainsi qu'une dissociation efficace des complexes [89]. La taille des particules formées n'a pas d'influence significative sur l'internalisation, bien que les particules de taille inférieure au micron soient généralement préférées [61].

Une fois endocytés, les complexes sont encapsulés dans des endosomes qui après maturation fusionneront avec des lysosomes. Il est crucial pour les polyplexes de s'échapper des compartiments endosomaux et lysosomaux avant que les acides nucléiques qu'ils transportent ne soient dégradés. Comme mentionné précédemment, le pouvoir tampon du chitosane entre pH 4,5 et 5,5 fait débat [83],[84], conduisant donc à l'émergence de nouvelles hypothèses concernant le mécanisme d'échappement endosomal des polyplexes à base de chitosane. Köping-Höggård *et coll.* proposent la dégradation enzymatique comme mécanisme le plus probable conduisant à l'échappement endosomal de polyplexes à base de chitosane [70]. Les oligo- et monosaccharides résultant de la dégradation du chitosane augmenteraient l'osmolarité, ce qui entraînerait un afflux d'eau, suivi du gonflement et de la rupture des membranes endosomales. Une autre voie d'échappement endosomal possible serait par déstabilisation directe des membranes endosomales par le chitosane [90]. Le chitosane a un temps de circulation intracellulaire plus long que la PEI, ce qui pourrait être attribué à une densité de charge plus faible et à une capacité de perturbation membranaire réduite [35]. Il convient également de noter que la forte capacité de déstabilisation membranaire de la PEI est en lien avec sa toxicité élevée [91].

Après échappement endosomal, il reste une dernière barrière à franchir : la dissociation des polyplexes pour induire le relargage des acides nucléiques dans le cytoplasme. Cette étape est fortement liée à la stabilité des complexes formés. Comme mentionné précédemment, des complexes trop stables ne pourraient libérer efficacement les acides nucléiques d'où la nécessité de moduler la masse molaire et le DA du chitosane afin d'ajuster la stabilité des polyplexes [89]. Le mécanisme précis favorisant la dissociation des polyplexes reste encore à élucider. Il a été proposé qu'une compétition avec les polyanions présents dans le cytoplasme, comme les glycosaminoglycanes (GAGs), pourrait jouer un rôle dans le relargage des acides nucléiques [92],[93]. Récemment, Grinberg *et coll.* ont suggéré qu'une fraction significative des molécules d'ADN qui ont pu se dissocier du chitosane, demeure immobilisée au sein d'un réseau dense constitué de clusters de chitosane (Figure 16). Par conséquent, la faible solubilité du chitosane en milieu physiologique serait à l'origine de l'efficacité limitée des polyplexes de chitosane en matière de transfection [94].

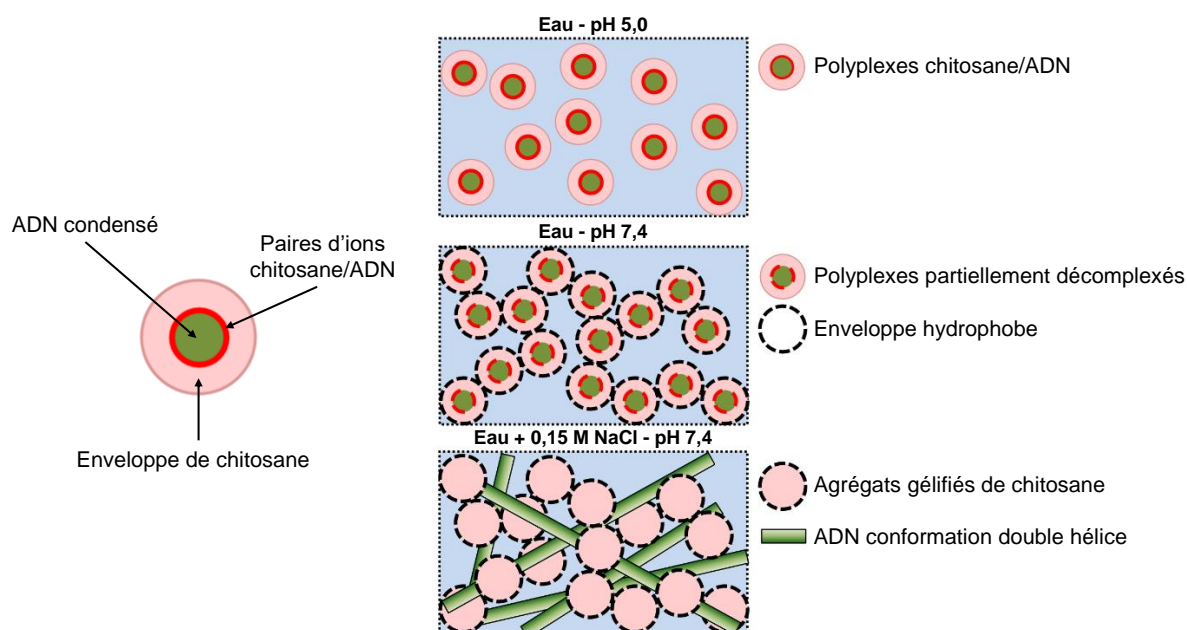


Figure 16. Evolution des polyplexes chitosane/ADN en fonction du pH et de la force ionique du milieu [94].

2.3.2. Efficacité de transfection

L'efficacité de transfection des systèmes chitosane/ADN est fortement dépendante des types cellulaires utilisés. Des meilleurs taux d'expression sont obtenus avec des cellules HEK293 et IB-3-1 comparées à des cellules 9HTEo ou HeLa [59]. Par conséquent, une étude sur les paramètres influençant l'efficacité de la transfection a été privilégiée plutôt qu'une comparaison des taux de transfection décrits dans la littérature.

La stabilité des polyplexes est un premier levier pour améliorer l'efficacité de transfection. Comme mentionné dans les paragraphes précédents, un compromis sur la stabilité des polyplexes doit être trouvé concernant la masse molaire du chitosane utilisé afin de concilier la protection de l'acide nucléique véhiculé (meilleure avec une masse molaire élevée) et une libération intracellulaire efficace de l'ADN (meilleure avec une masse molaire faible), pour obtenir des hauts taux de transfection [59]. Selon Lavertu *et coll.*, un chitosane avec un DA de 8% et une masse molaire de 10 kDa serait la combinaison la plus efficace en termes de transfection [71]. En revanche, une augmentation de la masse molaire de 10 à 40 kDa entraîne une réduction significative de l'efficacité de transfection en créant un polyplexe plus fortement lié. Cependant, cette perte d'efficacité peut être contrebalancée par une augmentation du DA de 8% à 20% pour une masse molaire de 40 kDa ; les systèmes 8-10 (DA- M_n) et 20-40 sont donc équivalents [71].

La présence de sérum augmente l'efficacité de transfection des polyplexes à base de chitosane contrairement à leurs homologues lipoplexes [95] ou PEI [96]. Bien que les raisons pour lesquelles le sérum améliore l'efficacité de transfection ne soient pas entièrement claires, il a été suggéré que cela pourrait être lié à une meilleure division cellulaire, favorisant ainsi une meilleure internalisation des complexes [73].

Le pH détermine directement la densité de charges du chitosane et donc les interactions électrostatiques avec l'ADN et finalement l'interaction complexe-cellule [97]. La faible densité de charge du chitosane à pH physiologique entraîne sa faible solubilité voire son agrégation et donc une déstabilisation des polyplexes à base de chitosane [59],[71],[72]. Pour ces raisons, la formulation des polyplexes est généralement réalisée en conditions acides pour optimiser la complexation avec les acides nucléiques et assurer la stabilité colloïdale avant ajout dans les milieux de cultures cellulaires qui imposent un pH et une force ionique proches des conditions physiologiques [35]. Nimesh *et coll.* ont décrit une forte corrélation entre l'internalisation et l'efficacité de transfection des complexes chitosane/ADN (N:P 5) en fonction du pH [73]. À pH 6,5, les taux d'internalisation du chitosane et de l'ADN sont similaires (> 90%). En revanche, à pH 7,1, bien que le taux d'internalisation du chitosane reste élevé (> 70 %), celui de l'ADN est réduit par un facteur six. Lorsque le pH atteint 7,4, le taux d'internalisation du chitosane diminue légèrement (< 60%) alors celui de l'ADN devient presque nul (Figure 17.a). Ces résultats suggèrent qu'une dissociation des complexes se produit avant l'internalisation lorsque le pH dépasse 7,0. De plus, ils révèlent que le chitosane peut être internalisé même s'il n'est plus complexé avec l'ADN, mais plutôt sous forme d'agrégats de chaînes libres. Concernant les taux de transfection, en lien avec les taux d'internalisation de l'ADN, ils diminuent lorsque le pH augmente (Figure 17.b). Cependant, il apparaît que bien que le taux d'internalisation de l'ADN à pH 7,1 soit six fois inférieur à celui observé à pH 6,5, le taux de transfection à pH 7,1 n'est que 2,5 fois inférieur à celui à pH 6,5. Cela indique qu'à pH 7,1, peu de complexes sont internalisés, mais ceux-ci ont une meilleure capacité de dissociation par rapport aux complexes internalisés à pH 6,5, en lien avec une plus grande stabilité à pH légèrement acide.

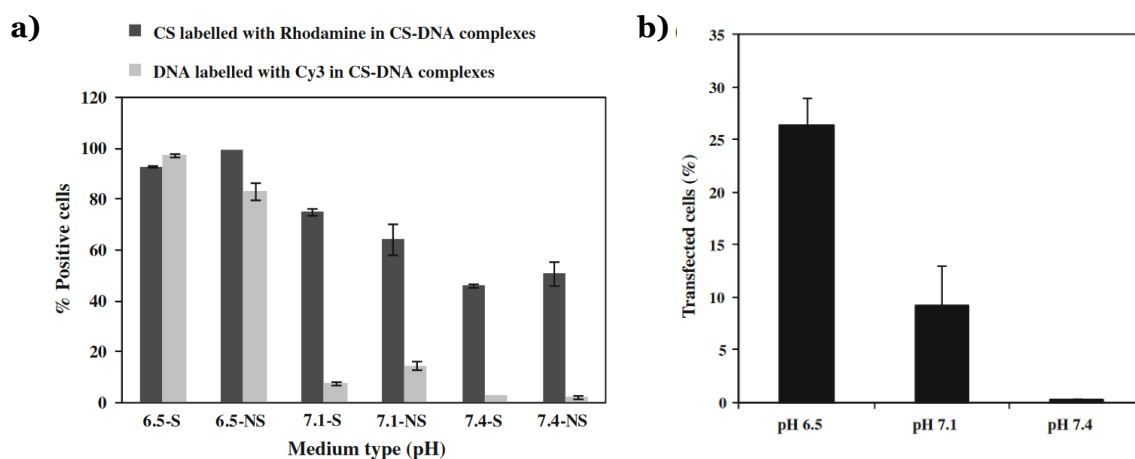


Figure 17. a) Comparaison des taux d'internalisation de complexes chitosane/ADN (N:P 5) après 8h de transfection en présence (S) ou non (NS) de sérum dans le milieu. Le chitosane a été marqué avec de la rhodamine et l'ADN avec de la Cy3. b) Efficacité de transfection de complexes chitosane/ADN à différents pHs [73].

Le rapport de charge N:P est également un facteur clé de l'efficacité de transfection des polyplexes à base de chitosane. Une augmentation de ce rapport améliore non seulement la stabilité des complexes en renforçant l'interaction entre le chitosane et les acides nucléiques [97], mais la présence d'un excès de chitosane joue aussi un rôle important. Le chitosane libre favorise la libération des polyplexes des vésicules endo-lysosomales en offrant une protection supplémentaire aux complexes contre les enzymes

lysosomales [98]. La formulation de polyplexes à base de chitosane s'effectue généralement à des N:P compris entre 3 et 10 voire très supérieurs afin de maximiser leur efficacité de transfection [70],[71].

2.3.3. Cytotoxicité

Parmi tous les polymères cationiques, la polyéthylèneimine (PEI) est le plus étudié pour la délivrance de gènes en raison de sa capacité à se complexer avec les acides nucléiques et de sa haute efficacité de transfection. Cependant, ses applications sont très limitées en raison de sa toxicité élevée [99]. Le chitosane étant un polymère cationique non toxique et biocompatible, il semble être une alternative non-toxique prometteuse à la PEI. La faible toxicité du chitosane par voie orale (LD_{50} de 16 g/kg, contre 3 g/kg pour le NaCl chez la souris) [89], lui a permis d'être approuvé pour des applications alimentaires dans plusieurs pays et a également été approuvé par la FDA pour son utilisation dans des pansements cicatrisants [82]. La toxicité du chitosane dépend également de la dose administrée ; la concentration inhibitrice 50 (IC_{50}) variant de 0,2 à 2 mg/mL [100]. Malgré cela, le chitosane n'est toujours pas autorisé pour des applications de délivrance de gènes ou de médicaments. Au-delà de la toxicité, l'origine majoritairement animale du chitosane pose un problème aux industriels souhaitant l'utiliser pour des applications biomédicales. Étant donné que ses propriétés dépendent étroitement de ses caractéristiques, telles que son DA et sa masse molaire, il serait nécessaire de réaliser une étude de cytotoxicité pour chaque type spécifique de chitosane dans des cellules pertinentes pour chaque application envisagée [35].

La cytotoxicité des polyplexes chitosane/AN étant équivalente à celle du chitosane seul, il est possible de dégager quelques conclusions générales concernant l'impact de la masse molaire et du DA du chitosane sur la cytotoxicité des polyplexes formés avec des acides nucléiques. Huang *et coll.* ont montré que la cytotoxicité des polyplexes augmente lorsque le DA diminue, tandis que la masse molaire du chitosane semble avoir un impact moindre sur leur cytotoxicité (Figure 18) [87].

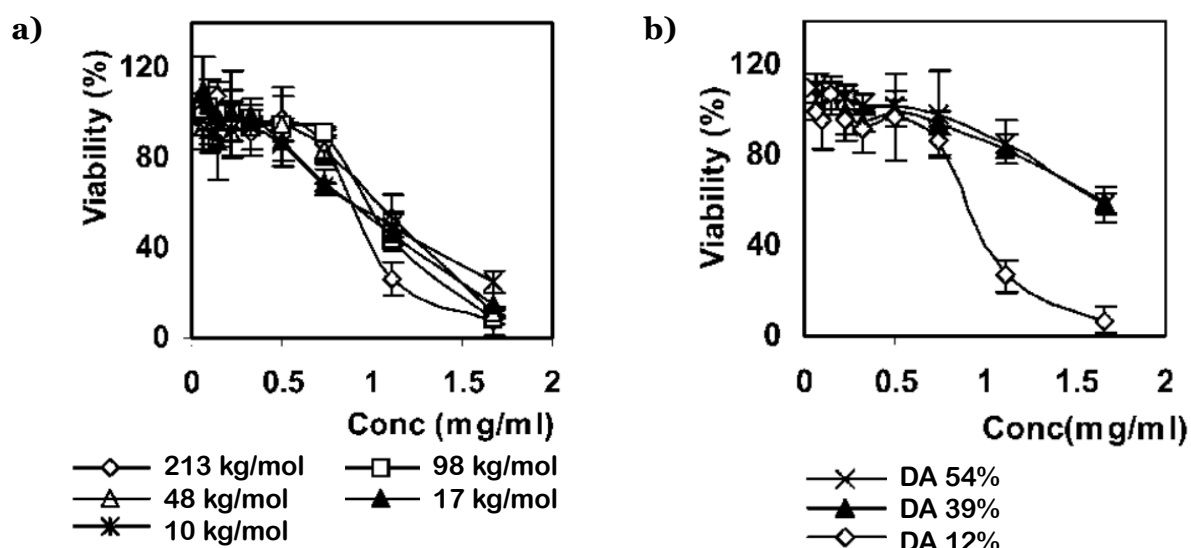


Figure 18. Viabilité des cellules A549 en fonction de la concentration en nanoparticules de chitosane. Influence a) de la masse molaire du chitosane (DA 12%) et b) du DA du chitosane (M_n 213 kg/mol) sur la viabilité cellulaire [87].

Ainsi, la cytotoxicité des complexes formés avec des chitosanes de faible DA peut s'expliquer par une augmentation de la densité de charge mais également par la plus faible biodégradabilité des chaînes de chitosane. Comme mentionné précédemment, la dégradation du chitosane *in vivo* est corrélée à son DA ; plusieurs études ont reporté une dégradation plus lente avec un DA plus faible [32],[33]. Enfin, la faible cationicité du chitosane à pH physiologique constitue son principal atout en réduisant sa cytotoxicité [7].

3. VERS UNE PLUS GRANDE STABILITE DES COMPLEXES A BASE DE CHITOSANE

Étant donné que les polyplexes à base de chitosane présentent une stabilité limitée en conditions physiologiques et une efficacité de transfection relativement faible, plusieurs stratégies ont été développées afin d'améliorer les propriétés du chitosane dans le but de favoriser la délivrance de gènes.

3.1. Modifications chimiques du chitosane

3.1.1. Amélioration de la stabilité des complexes

De nombreuses études ont démontré que les polyplexes chitosane/ADN sont particulièrement instables en conditions physiologiques [68],[101]. Par conséquent, plusieurs modifications du chitosane ont été proposées pour améliorer la stabilité des complexes, parmi lesquelles la quaternisation et la PEGylation sont les plus courantes.

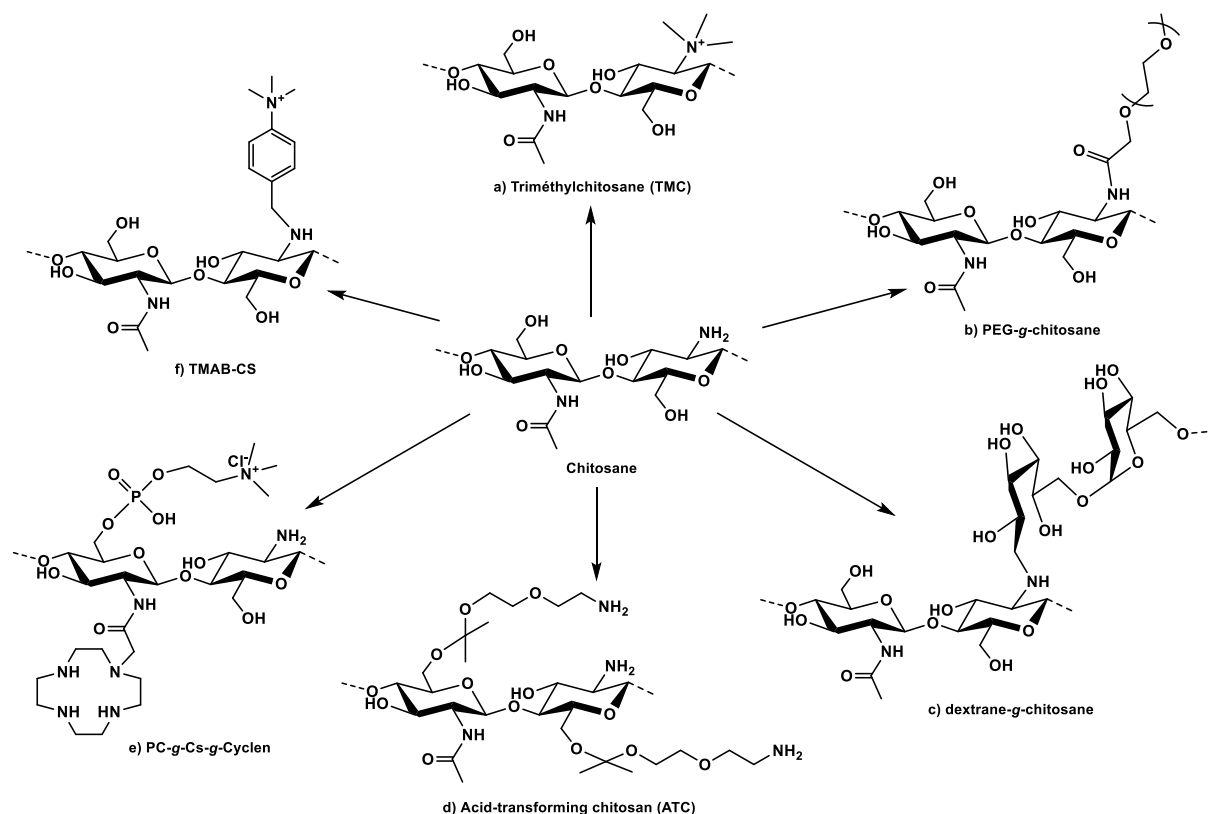


Figure 19. Modifications latérales du chitosane permettant d'améliorer sa solubilité et par extension la stabilité des complexes formés avec des acides nucléiques.

Le triméthylchitosane (TMC) est un dérivé hydrophile quaternisé du chitosane (Figure 19.a). La principale méthode de quaternisation du chitosane est l'alkylation des amines par action d'un

halogénure d'alkyle en présence d'un catalyseur ou d'une base pour faciliter la réaction [102],[103]. L'amélioration principale du TMC par rapport au chitosane est sa solubilité en milieux neutres et alcalins liée à la présence des ammoniums quaternaires qui le rendent moins sensible aux changements de pH. Jintapattanakit *et coll.* ont décrit une solubilité maximale du TMC à tout pH pour un degré de quaternisation (DQ) de 40% [104]. L'amélioration de la solubilité du TMC a conduit à une meilleure efficacité de transfection par rapport au chitosane. Toutefois, cette augmentation de solubilité s'accompagne également d'une hausse de la toxicité des complexes à base de TMC. Malgré cela, quel que soit son degré de quaternisation, le TMC demeure significativement moins toxique que la PEI [103].

Outre la quaternisation, la modification chimique du chitosane la plus répandue pour améliorer sa solubilité est la conjugaison du chitosane avec des chaînes de polyéthylène glycol (PEG) (Figure 19.b). Par ailleurs, le PEG permet d'améliorer la stabilité colloïdale des polyplexes et de limiter les interactions électrostatiques avec les protéines du plasma. En effet, grâce à leur grande flexibilité, les chaînes de PEG forment une barrière stérique autour des polyplexes, limitant ainsi l'adsorption de protéines plasmatiques. Cette couronne de PEG contribue également à stabiliser les complexes en limitant leur agrégation (Figure 20) [105],[106].

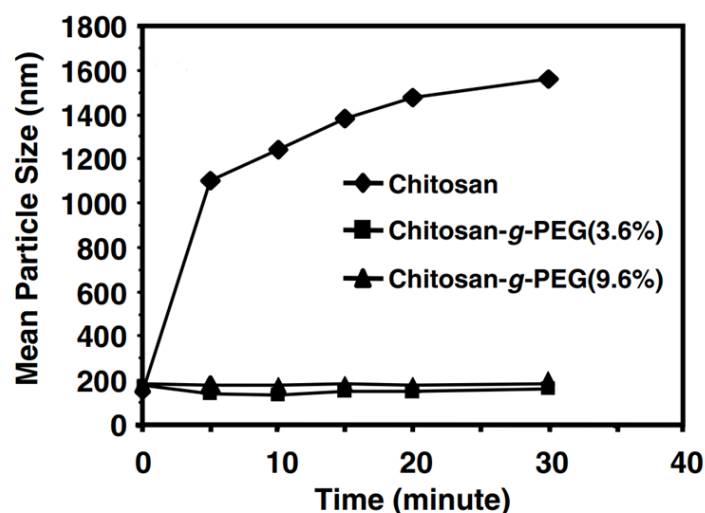


Figure 20. Evolution temporelle du diamètre hydrodynamique moyen des complexes chitosane/ADN et chitosane-g-PEG/ADN en présence de sérum [105].

Gutoaia *et coll.* [107] ont constaté que des degrés de PEGylation du chitosane supérieurs à 4% permettaient d'améliorer la solubilité du chitosane, de diminuer la taille et la charge des complexes. Cependant, la PEGylation du chitosane contribue également à réduire le taux d'internalisation et l'efficacité de transfection en masquant la charge cationique globale des polyplexes et en générant un encombrement stérique, ce qui limite la pénétration membranaire [107]. Par conséquent, il est essentiel de contrôler le degré de PEGylation pour générer des complexes stables avec une efficacité de transfection optimale.

Park *et coll.* [108] ont démontré que le greffage latéral de chaînes de dextrane (Figure 19.c), un polysaccharide neutre soluble à tout pH, permettait également d'améliorer la stabilité des complexes formés avec l'ADN d'une manière similaire à celle décrite avec le PEG (Figure 21.a). La taille des

complexes formés diminue avec l'augmentation du rapport molaire chitosane-*g*-dextrane:ADN (Figure 21.b). Le dextrane est greffé par réaction d'amination réductrice entre les amines latérales du chitosane et l'aldéhyde de l'extrémité réductrice du dextrane en présence de cyanoborohydrure de sodium [108].

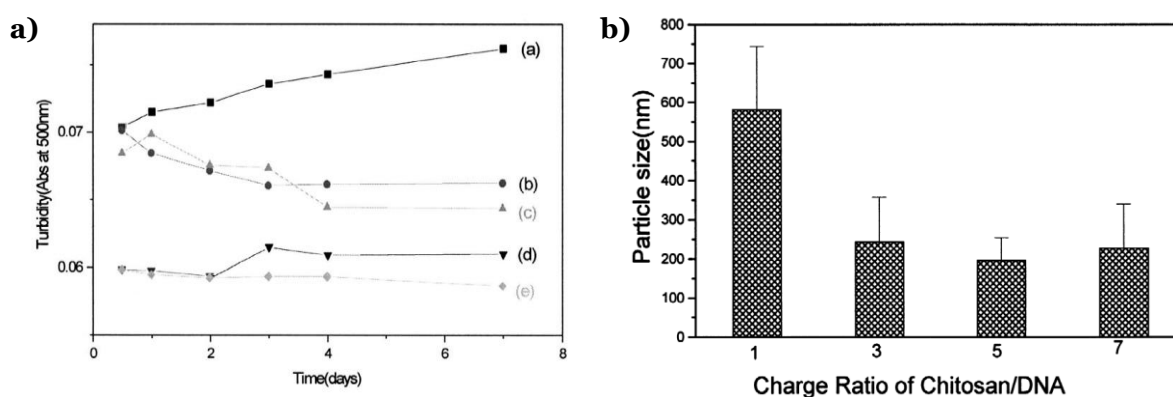


Figure 21. a) Turbidité des complexes chitosane/ADN (C:ADN) et chitosane-*g*-dextrane:ADN (CD:ADN) en fonction du rapport N:P. (a) C:ADN N:P 3, (b) CD:ADN N:P 1, (c) CD:ADN N:P 3, (d) CD:ADN N:P 5 et (e) CD:ADN N:P 7. b) Diamètres hydrodynamiques des complexes chitosane-*g*-dextrane:ADN en fonction du rapport N:P [108].

D'autres modifications chimiques du chitosane ont été proposées pour améliorer la solubilité du chitosane et par conséquent la stabilité des complexes. Récemment, Edson *et coll.* [109] ont greffé des amines primaires sur les hydroxyles en C-6 du chitosane via une liaison cétal clivable en milieu acide (*Acid-transforming chitosan/ATC*) (Figure 19.d). Les polyplexes formés à partir de ce dérivé et de siRNA sont stables en conditions physiologiques neutres. Cependant, lorsqu'ils sont exposés à un pH acide dans les endosomes/lysosomes, la liaison cétal est hydrolysée, permettant au chitosane de retrouver sa forme native ce qui vient diminuer les interactions avec les siRNA et faciliter la dissociation des complexes. Cette modification du chitosane a ainsi permis d'obtenir un dérivé soluble dans l'eau, une meilleure complexation avec les siRNA et une dégradabilité accrue en milieu acide [109]. Li *et coll.* [110] ont étudié l'influence du greffage de la phosphorylcholine et d'une polyamine macrocyclique sur du chitosane (*PC-g-Cs-g-Cyclen*) (Figure 19.e). Il s'est avéré que ces systèmes présentent une bonne solubilité dans l'eau ainsi qu'une efficacité de transfection 10 à 14 fois supérieure à celle des complexes chitosane/ADN dans des cellules HEK 293 [110]. Raik *et coll.* [111] ont proposé un nouveau dérivé du chitosane par réaction d'amination réductrice entre les amines latérales du chitosane et le iodure de 4-formyl-*N,N,N*-triméthylanilinium donnant ainsi la forme chlorure du *N*-[4-(*N,N,N*-triméthylammonium)benzyl] de chitosane (TMAB-CS) (Figure 19.f). Ce dérivé a montré une solubilité améliorée sur une large gamme de pH ainsi qu'une meilleure efficacité de transfection pour des degrés de substitution du TMAB-CS relativement faibles dans des cellules HEK 293 [111].

La plupart des conjugaisons covalentes décrites reposent sur la modification des groupes amine ce qui dénature la chaîne du chitosane et peut donc affecter l'efficacité de complexation avec les acides nucléiques lorsque le degré de substitution augmente.

3.1.2. Amélioration de la capacité de ciblage

Les surfaces des vecteurs à base de chitosane peuvent être modifiées avec des ligands afin d'optimiser leur internalisation et leur spécificité selon les récepteurs protéiques présents sur les cellules cibles.

Ainsi, ces vecteurs peuvent être internalisés non seulement par adsorption non spécifique, mais aussi par endocytose médiée par les récepteurs grâce à l'interaction entre les ligands et les récepteurs cellulaires [112].

Plusieurs études ont montré que la fonctionnalisation du chitosane avec des peptides ou des protéines permettait de cibler précisément certaines cellules. L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est une protéine transmembranaire surexprimée au niveau des cellules endothéliales et de certaines cellules tumorales. Le tripeptide Arg-Gly-Asp (RGD) pouvant se lier à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est souvent utilisé dans les systèmes de délivrance de médicaments ou de gènes comme ligand de ciblage [113],[114]. Kim *et coll.* [115] ont développé un système de délivrance de siRNA-hBCL2 ciblant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, composé de chitosane hydrosoluble, d'un peptide RGD et de PEI. Le niveau d'expression de la protéine BCL2 a été significativement réduit par rapport au groupe témoin, entraînant un arrêt de la croissance de la tumeur chez la souris. Le récepteur de la transferrine (TfR) est une protéine transmembranaire qui permet le transport du fer dans les cellules en croissance ; le fer étant un cofacteur dans le processus de synthèse de l'ADN. En raison de leur prolifération rapide, les cellules tumorales surexpriment le récepteur de la transferrine [116]. Par conséquent, la transferrine peut également être utilisée comme ligand de ciblage. Jeong *et coll.* [117] ont greffé de la transferrine sur les amines latérales de chitosane de faible masse molaire et ont observé une meilleure efficacité de transfection dans les cellules surexprimant le TfR (HCT119) que dans des cellules normales (HEK 293). Les lipoprotéines de basse densité (LDL) ciblent les récepteurs LDL qui sont fortement exprimés dans les tumeurs. Zhu *et coll.* ont conçu un système de co-administration de siRNA et de doxorubicine à base de chitosane *N*-succinylé présentant des ligands LDL [118]. Une étude *in vivo* a permis de mettre en avant des effets de ciblage supérieurs sur des tumeurs hépatiques avec des complexes de chitosane possédant des ligands LDL.

L'acide hyaluronique (HA) est un polysaccharide naturel composé d'acide glucuronique et de *N*-acétyl-D-glucosamine. Parmi les récepteurs de l'HA, le CD44 a été largement étudié en raison de son expression élevée sur les chondrocytes [119] et certaines cellules tumorales [120]. Les vecteurs d'acides nucléiques à base d'HA et de chitosane ont fait l'objet de nombreuses études, tirant parti de la capacité spécifique de liaison de l'HA au récepteur CD44. Cai *et coll.* ont préparé un hydrogel HA/chitosane par une méthode de gélification via une base de Schiff pour la délivrance d'oligonucléotides antisens dans des chondrocytes [119]. Pour un rapport HA:chitosane de 7:3, l'hydrogel a démontré une excellente capacité de liaison aux chondrocytes.

De petites molécules telles que le mannose, le galactose et l'acide folique peuvent également être greffées au chitosane afin de jouer le rôle de ligands de ciblage. Des récepteurs de mannose sont présents à la surface de plusieurs cellules du système immunitaire. Par conséquent, le chitosane mannosylé permet de concevoir des vecteurs de délivrance de gènes ciblant ce type cellulaire et ainsi d'augmenter l'efficacité de transfection par rapport à des systèmes à base de chitosane natif (Figure 22.a) [121]. La surface des hépatocytes possède des récepteurs de l'asialoglycoprotéine (ASGPR) capables de se lier au galactose. Les polyplexes à base de chitosane galactosylé (Figure 22.b) présentent une transfection sélective très efficace pour les hépatocytes avec des taux de transfection augmentant avec le degré de galactosylation [122]. L'acide folique est une vitamine B de faible masse molaire (vitamine B9) qui possède une forte affinité pour les récepteurs de l'acide folique. Ces récepteurs sont surexprimés sur

diverses cellules épithéliales cancéreuses [123]. Chan *et coll.* ont décrit la formulation de complexes pour la délivrance d'acides nucléiques à base de chitosane-*g*-PEG fonctionnalisés avec de l'acide folique (Figure 22.c) permettant une amélioration de la stabilité grâce au PEG et une meilleure capacité de ciblage grâce à l'acide folique [124].

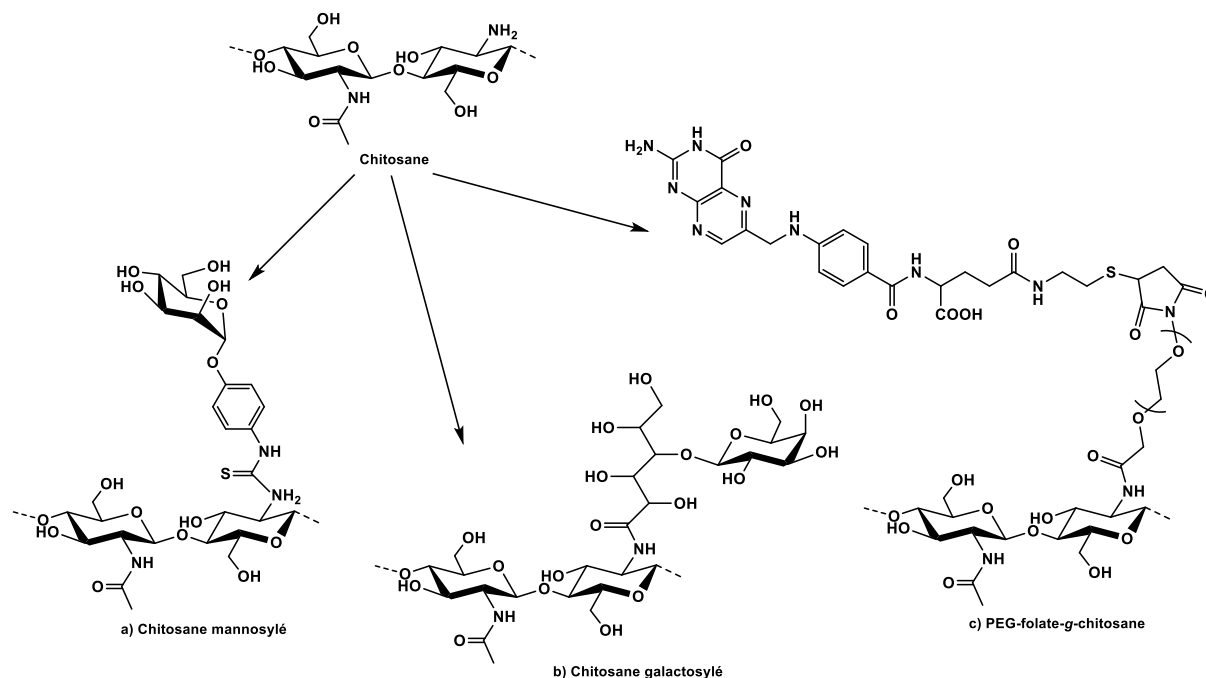


Figure 22. Modifications latérales du chitosane par des ligands de ciblage.

3.1.3. Amélioration de l'échappement endosomal

En plus de sa faible stabilité en conditions physiologiques et de son endocytose non spécifique, la faible capacité de transfection du chitosane est due à son efficacité limitée à s'échapper des endosomes vers le cytoplasme. Étant donné que l'échappement des polyplexes est une étape cruciale, plusieurs modifications des vecteurs à base de chitosane ont été proposées pour faciliter ce processus.

La polyéthylèneimine (PEI) est le vecteur non viral le plus efficace parmi les polymères cationiques. Son efficacité est en lien avec sa grande solubilité notamment à pH physiologique, sa densité de charge élevée et son fort pouvoir tampon. Malgré cela, son utilisation reste très limitée à cause de sa toxicité élevée [89]. Afin d'améliorer l'efficacité de transfection du chitosane et réduire la toxicité de la PEI, des conjugués chitosane/PEI ont été synthétisés par polymérisation cationique de l'aziridine avec des oligomères de chitosane (Figure 23.a). Ces systèmes ont démontré une grande capacité de complexation avec l'ADN, une faible toxicité et une efficacité de transfection élevée *in vitro* et *in vivo* [125]. La cytotoxicité des copolymères chitosane-*g*-PEI, bien qu'inférieure à celle de la PEI, reste néanmoins plus élevée que celle du chitosane. Pour remédier à ce problème, Zhang *et coll.* ont greffé de l'arginine sur le chitosane-*g*-PEI [126]. Cette modification a non seulement amélioré l'efficacité de transfection par rapport au chitosane-*g*-PEI, mais a également réduit la cytotoxicité à un niveau comparable à celui du chitosane non modifié.

D'autres modifications du chitosane ont été proposées afin d'améliorer son pouvoir tampon et ainsi de faciliter son échappement endosomal par le mécanisme d'éponge à protons. Garg *et coll.* ont préparé du chitosane couplé à la triphénylamine (TPAC) (pK_a 3) pour la délivrance de plasmide dans des cellules de mammifères (Figure 23.b) [127]. Les complexes formés ont permis d'obtenir une excellente efficacité de transfection, supérieure à celle de la PEI, en lien avec le fort pouvoir tampon du TPAC. Le couplage du chitosane avec de l'acide urocanique (Figure 23.c) améliore également son efficacité de transfection grâce à la présence de groupes imidazole (pK_a 7). Ces groupes peuvent agir comme des éponges à protons, ce qui facilite l'échappement endosomal et conduit à une efficacité de transfection accrue [128],[129]. De plus, les groupements imidazole, présents dans plusieurs biomolécules comme l'histidine, augmentent la capacité tampon du chitosane sans compromettre sa biocompatibilité [130].

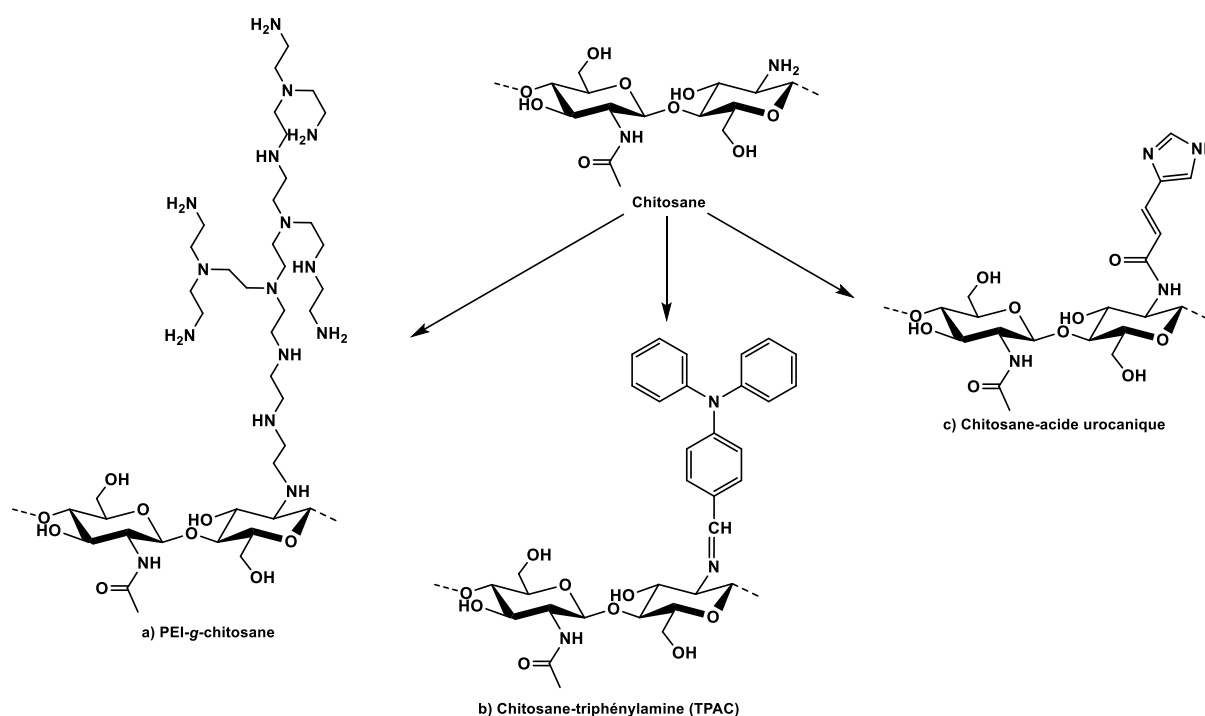


Figure 23. Modifications latérales du chitosane permettant de faciliter son échappement endosomal.

L'incorporation dans les formulations d'agents perturbant les endosomes tels que la chloroquine (pK_a 4,0 ; 8,4 ; 10,2) [131], les peptides fusogènes [132] ou encore des lipides sensibles au pH [133] dans des complexes polycation/AN a permis d'améliorer l'efficacité de transfection en facilitant l'échappement endosomal. Cependant, la cytotoxicité, l'immunogénicité et les effets secondaires causés par l'ajout d'agents exogènes, tels que la chloroquine, les rendent inutilisables pour la thérapie génique *in vivo* [134]. Les peptides fusogènes existent sous forme de pelote statistique à pH physiologique et présentent une structure amphiphile en hélice α à pH acide, ce qui facilite leur pénétration à travers la membrane endosomale et la déstabilisation des endosomes [132]. Les lipides neutres tels que la dioleoylphosphatidyléthanolamine (DOPE) interagissent avec la membrane endosomale et favorisent la fusion des complexes avec la membrane, facilitant ainsi l'échappement endosomal des complexes [133].

3.1.4. Amélioration de la dissociation des complexes

L'interaction forte entre le chitosane et l'ADN serait une des raisons empêchant la dissociation des complexes. L'incorporation d'unités hydrophobes sur le chitosane est un premier levier permettant de favoriser la dissociation des complexes chitosane/ADN, facilitant ainsi la libération de l'ADN. Chae *et coll.* [135] ont proposé une modification du chitosane avec de l'acide désoxycholique (DOCA) (Figure 24.a). Les complexes amphiphiles formés à partir de ce dérivé du chitosane ont montré une meilleure condensation de l'ADN et une efficacité de transfection supérieure par rapport aux complexes non modifiés par le DOCA. De façon générale, l'alkylation du chitosane permet d'augmenter l'efficacité de transfection des polyplexes proportionnellement à la longueur de la chaîne alkyle (Figure 24.b). Cependant, au-delà de huit carbones, l'efficacité diminue. Cette efficacité accrue s'explique par une internalisation facilitée par les interactions entre les groupes alkyles et la DPPC, principal phospholipide des membranes cellulaires, ainsi que par une meilleure dissociation des polyplexes, due à des interactions électrostatiques plus faibles entre le chitosane alkylé et l'ADN [136]. Une autre modification hydrophobe a été proposée par Hu *et coll.* en greffant de l'acide stéarique sur la chaîne du chitosane (Figure 24.c) [137]. Une fois de plus, cette modification du chitosane a permis d'améliorer significativement l'efficacité de transfection de ces systèmes ; en lien avec l'incorporation d'unités hydrophobes, favorisant une meilleure interaction et dissociation des complexes chitosane/ADN.

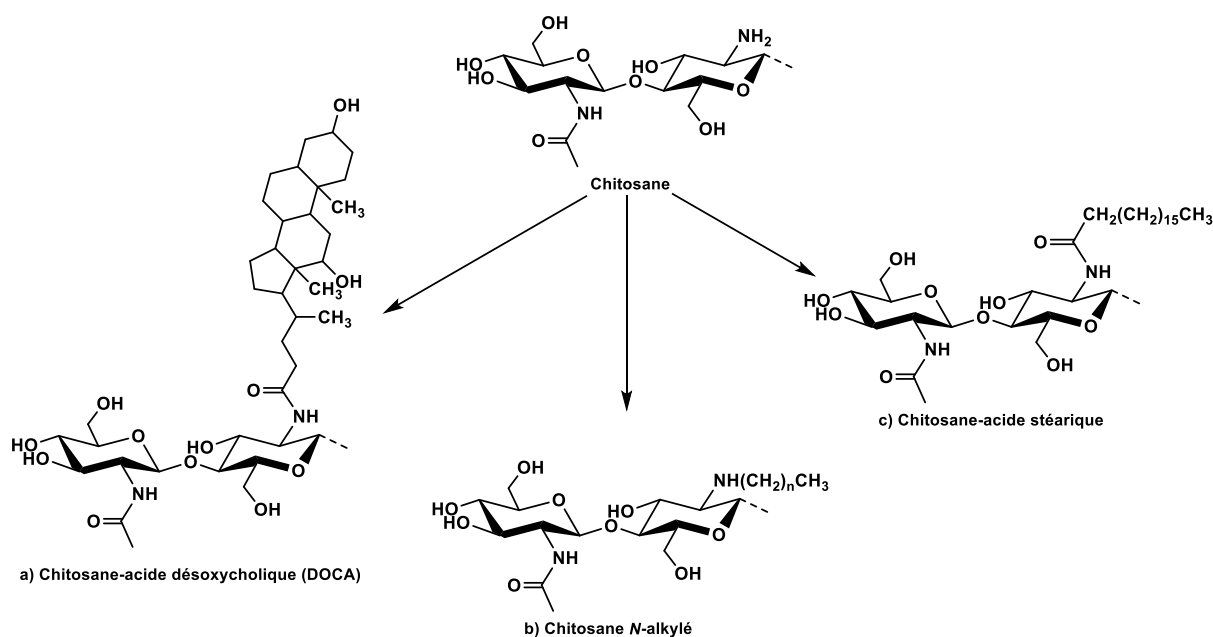


Figure 24. Modifications hydrophobes latérales du chitosane.

L'ajout d'unités hydrophobes n'est pas la seule méthode pour optimiser la dissociation des polyplexes ; plusieurs systèmes exploitant les répulsions électrostatiques au sein des complexes ont également été explorés. Kong *et coll.* ont greffé des petits peptides phosphorylables (pSP) sur des oligosaccharides de chitosane [138]. Après phosphorylation intracellulaire, par la kinase cytoplasmique Jak2 par exemple, les pSP deviennent chargés négativement modifiant ainsi les interactions électrostatiques au sein des complexes et facilitant leur dissociation. Selon le même principe, Han *et coll.* ont utilisé l'hydrochlorure de poly(allylamine)-anhydride citraconique (PAH-Cit) comme agent de réticulation dans des complexes

formés entre des siRNA et des conjugués de chitosane triméthyl galactosyl modifié par l'acide urocanique (UA-GT) [129]. À un pH supérieur à 6,0, le PAH-Cit est chargé négativement, ce qui renforce la stabilité des complexes UA-GT/siRNA en conditions physiologiques. Lorsque les complexes pénètrent dans les endosomes/lysosomes, l'environnement acide hydrolyse la chaîne latérale du PAH-Cit, provoquant une inversion de charge. Le PAH-Cit devient une poly(allylamine) cationique, entraînant une répulsion électrostatique avec le UA-GT également chargé positivement. Cette répulsion facilite le désassemblage des complexes et donc la libération des siRNA.

3.2. Modifications non-covalentes des complexes

Les divers dérivés du chitosane mentionnés précédemment mettent en jeu des modifications latérales de la chaîne du chitosane. Par conséquent, ces modifications restent limitées à de faibles degrés de substitution afin de ne pas compromettre la complexation du chitosane avec les acides nucléiques. De plus, ces modifications latérales dénaturent le chitosane et peuvent donc induire une augmentation de la cytotoxicité. Plusieurs alternatives non-covalentes ont été proposées afin d'améliorer la stabilité et l'efficacité de complexes à base de chitosane sans le dénaturer.

Costalat *et coll.* ont obtenus des complexes chitosane/dextrane sulfate (DS) par un processus d'assemblage contrôlé, basé sur l'écrantage des interactions électrostatiques entre des polysaccharides de charge opposée [139]. Tout d'abord, chaque polyélectrolyte est dissous séparément et une quantité appropriée de chlorure de sodium (NaCl) est ajoutée pour permettre l'écrantage des charges de chaque polymère. Les deux solutions sont ensuite mélangées à un rapport de charge (+/-) de 2. La solution résultante est ensuite dialysée contre de l'eau afin d'éliminer progressivement le chlorure de sodium et ainsi activer les interactions électrostatiques permettant la formation des complexes (Figure 25).

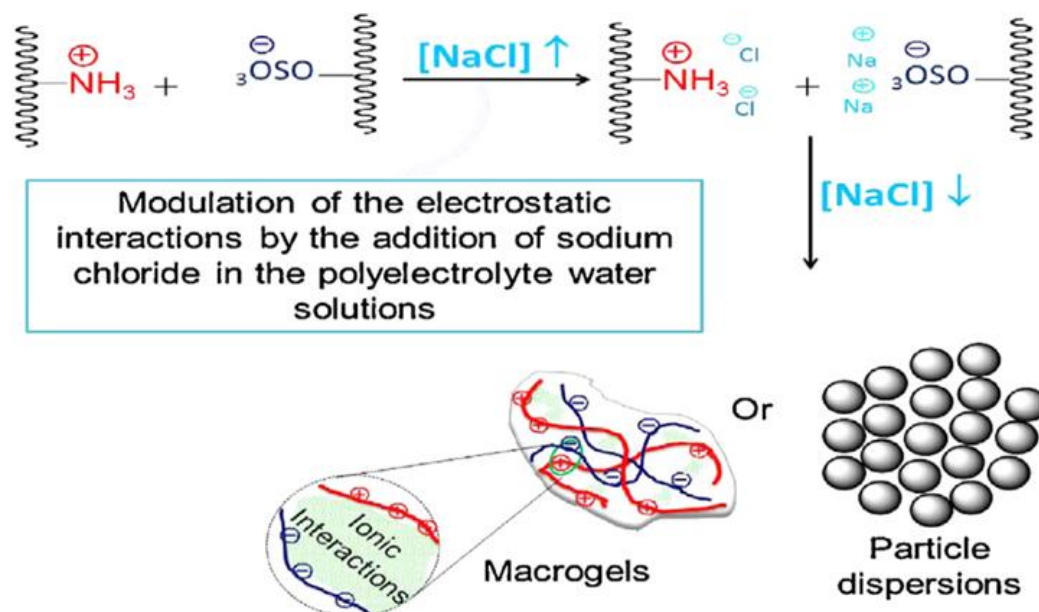


Figure 25. Processus de complexation de polyélectrolytes par association contrôlée en présence de sel [139].

Le DA du chitosane ainsi que la concentration en sel sont deux paramètres gouvernant ce processus d'assemblage contrôlé. Costalat *et coll.* ont démontré que le DA du chitosane devait être supérieur à 49%

afin que le polymère reste soluble indépendamment de la concentration en sel et que cette dernière devait être au moins égale à 2 mol/L afin de permettre un écrantage des charges suffisant pour éviter la réaction de complexation [139]. Les complexes obtenus par ce procédé d'assemblage contrôlé sont réversibles ; une ré-augmentation de la concentration en sels supérieure à 2 mol/L conduit à une redissolution des particules. La réversibilité de ces associations entraîne également des réarrangements macromoléculaires au fil du temps, rendant les complexes, obtenus par dialyse contre de l'eau pure, instables après 10 jours à 4°C. La procédure de formation des complexes a donc été modifiée en passant d'une étape dialyse contre de l'eau pure à une dialyse contre de l'eau contenant 0,5 mol/L de NaCl. Les complexes obtenus par cette méthode de dialyse « douce » ont montré une stabilité de plus de 2 ans à 4°C. L'intérêt majeur de ralentir l'élimination des sels par une dialyse contre un milieu légèrement salin est de diminuer le contrôle cinétique de la formation des particules au profit d'un contrôle thermodynamique [139].

Plus récemment, Genedy *et coll.* ont repris ce procédé de formulation par dialyse pour former des nanoparticules chitosane/dextrane sulfate et l'ont comparé à une addition « one-shot » de la solution de dextrane sulfate (DS) dans celle de chitosane [140]. Des chitosanes de DAs relativement élevés (DA 38% et 47%) ont été complexés avec des DS de masse molaire variable (9, 20 et 500 kg/mol). L'augmentation de la masse molaire du DS n'a que peu d'impact sur les particules obtenues par la méthode « one-shot ». La méthode par dialyse est quant à elle plus sensible à l'augmentation de la masse molaire du DS ; seul le DS de 9 kg/mol a permis d'obtenir des nanoparticules avec un PDI acceptable ($< 0,2$). Avec le DS de 9 kg/mol, la méthode de dialyse permet néanmoins l'obtention de particules plus petites (240 nm) que la méthode « one-shot » (330 nm). Finalement, ces deux méthodes ont permis l'obtention de particules chitosane/DS stables à 25°C à pH 4 pendant 4,5 mois pour la méthode de dialyse et pendant 1 an pour la méthode « one-shot » [140].

Wu et Delair ont proposé une autre méthode de stabilisation de complexes polyélectrolytes chitosane/hyaluronane par incorporation d'ions Zn(II) [141]. Dans un premier temps, les conditions optimales de formation des nanoparticules ont été déterminées. L'obtention de petites particules monodisperses est possible en utilisant du chitosane de masse molaire inférieure à 200 kg/mol et du hyaluronane de masse molaire autour de 39 kg/mol, à un faible rapport de charge (+/-) (1,5 ou 2), à un pH proche de 5 pour la solution de chitosane initiale et à de faibles concentrations en polyélectrolytes (0,1% m/v). Les PECs ainsi obtenus sont stables pendant 10-14 jours lorsqu'ils sont conservés dans de l'eau à pH acide à température ambiante, mais se déstabilisent très rapidement à pH et concentrations physiologiques. Tiyaboonchai et Limpeanchob ont précédemment étudié la capacité des ions zinc à stabiliser des particules chitosane/dextrane sulfate dans l'eau bien que n'ayant pas réussi à obtenir des particules stables dans l'HEPES 10m M à pH 7,4 [142]. Wu et Delair ont démontré qu'un ajout de ZnCl₂ au moment de la formulation des particules permettait d'obtenir des particules stables dans du PBS pendant 35 jours à température ambiante (Figure 26) [141]. La stabilisation par les ions zinc peut s'expliquer par la formation de liaisons de coordination entre des atomes riches en électrons, comme l'azote ou l'oxygène, et les orbitales vacantes du zinc, assurant ainsi une réticulation des chaînes du polysaccharide [141].

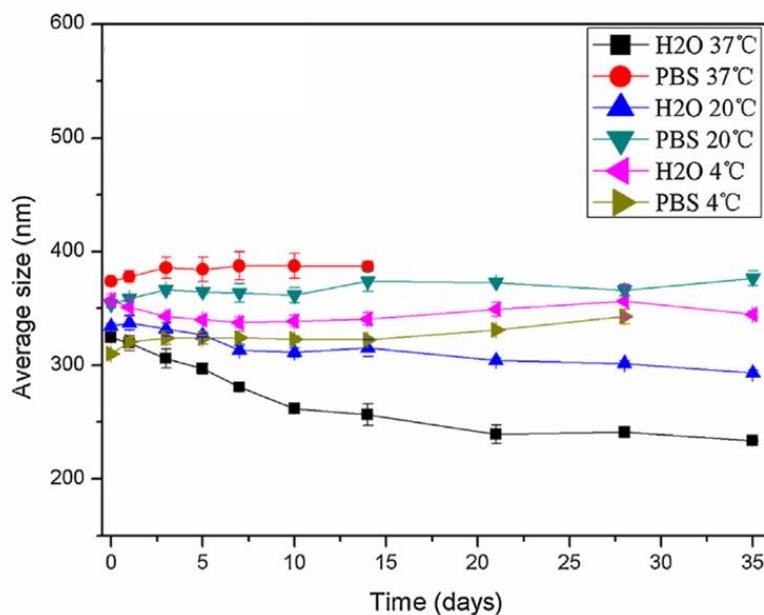


Figure 26. Etude de la stabilité des PECs dans l'eau et dans le PBS à 4°C, 20°C et 37°C. Suivi de l'évolution temporelle du diamètre des particules chitosane/hyaluronane [141].

Costamagna *et coll.* ont étudié l'influence de l'incorporation d'ions zinc et d'ions fer dans des nanogels de chitosane/adénosine triphosphate (ATP) sur leur stabilité en présence de NaCl 0.9% et en présence de protéines [143]. L'ajout de fer (20% m/m) dans les formulations a démontré une forte capacité de stabilisation des particules en présence de sels ou de protéines. Contrairement à ce qui avait été démontré par Wu et Delair [141], Costamagna *et coll.* n'ont pas retrouvé l'effet stabilisant du zinc sur des complexes polyélectrolytes à base de chitosane [143]. Ceci peut s'expliquer par l'utilisation de chitosane avec un DA de 16% qui a été décrit comme trop faible pour permettre une stabilisation optimale des complexes grâce aux ions zinc [141]. Costamagna *et coll.* ont également suggéré l'importance de l'élimination des chaînes libres de chitosane en excès afin d'obtenir une stabilité optimale en présence de sérum [143].

4. COPOLYMERES LINEAIRES A BASE DE CHITOSANE

Les modifications latérales des amines ou des hydroxyles dénaturant le chitosane et restant limitées à de faibles degrés de substitution afin de ne pas inhiber ses propriétés de complexation avec des acides nucléiques, il est alors pertinent de s'intéresser à la synthèse de copolymères à blocs linéaires à base de chitosane. L'avantage principal des copolymères diblocs de type AB est de préserver entièrement l'intégrité des deux chaînes polymères ; aucune de leurs fonctions latérales n'étant altérée par ce type de couplage. Ainsi, ces copolymères à blocs permettent de combiner les propriétés structurales et fonctionnelles des deux blocs de polymères [144].

Les premiers copolymères à blocs linéaires composés d'un bloc polysaccharide ont été décrits par Ceresa au début des années 1960 [145]. La synthèse de ces copolymères reposait sur une rupture mécanique de la chaîne principale du polysaccharide pour générer des radicaux libres, lesquels initiaient la copolymérisation d'un monomère vinylique. Cette méthode a été appliquée à des dérivés de cellulose de haute masse molaire et à de l'amidon en présence de monomères polymérisables tels que l'acrylonitrile,

le méthacrylate de méthyle, le styrène et l'acétate de vinyle [145]. Cependant, cette technique est limitée par le faible contrôle de la longueur des radicaux polymériques générés.

Trois méthodes principales permettent l'obtention de copolymères à blocs à partir d'un bloc polysaccharide. La première est la polymérisation enzymatique *in vitro* du bloc polysaccharide à partir d'un bloc de polymère synthétique fonctionnalisé à son extrémité. Des copolymères à blocs entre de l'amylose, polysaccharide linéaire constitué d'unités D-glucose liées en α -1,4, et des oligométhylènes, des oligo-oxydes d'éthylène, du poly(oxyde d'éthylène) ou encore du polystyrène ont été synthétisés par voie enzymatique [146],[147],[148]. La deuxième approche consiste à polymériser le bloc synthétique à partir du bloc polysaccharide adéquatement fonctionnalisé à son extrémité réductrice. La polymérisation par ouverture de cycle (ROP) de monomères cycliques tels que les lactones, les lactames ou les éthers cycliques est une méthode efficace pour synthétiser des blocs polymériques. De nombreuses ROP se déroulent comme des polymérisations vivantes, c'est-à-dire que la masse molaire du polymère augmente de manière linéaire avec la conversion du monomère permettant l'obtention de distributions de taille étroites. La première structure de copolymère à blocs linéaires synthétisée par ROP à partir d'un bloc de polysaccharide a été rapportée par Douy et Gallot en 1977 [149]. Ils ont décrit la synthèse d'un copolymère à blocs entre des fractions de polysaccharides obtenues par hydrolyse de l'ovomucoïde, protéine présente dans le blanc d'œuf, et le *N*-carboxyanhydride (NCA) de γ -benzyl L-glutamate (BLG). La ROP a également été utilisée pour obtenir des copolymères à blocs cellulose-*b*-poly(γ -benzyl L-glutamate) (PBLG) [150], triméthylcellulose-*b*-poly(tetrahydrofurane) [151], dextrane-*b*-polyamide [152] ou encore maltoheptaose-*b*-poly(ϵ -caprolactone) [153] (Figure 27).

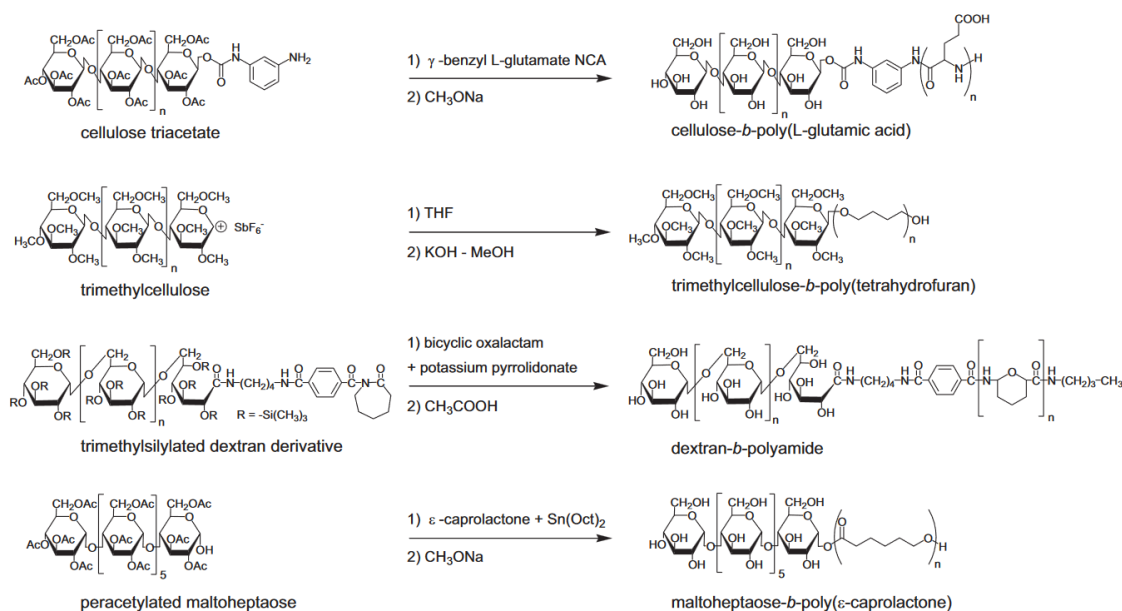


Figure 27. Polymérisations par ouverture de cycle (ROP) de polypeptides, polyéthers, polyamides et polyesters à partir de polysaccharides aux unités terminales modifiées [144].

Des voies de polymérisations radicalaires vivantes contrôlées telles que la polymérisation radicalaire par transfert d'atomes (ATRP), la polymérisation radicalaire contrôlée par nitroxyde (NMP) et le transfert de chaîne par addition-fragmentation réversible (RAFT) ou la conception macromoléculaire par interchange de xanthates (MADIX) ont été appliquées à la synthèse de copolymères à blocs linéaires à

base de polysaccharides. Des copolymères maltoheptaose-*b*-poly(méthylmétacrylate) [154], dextrane-*b*-polystyrène [155] ou encore cellulose-*b*-polystyrène [156] ont été obtenus par ATRP (Figure 28). La NMP a permis d'obtenir des copolymères maltohexaose-*b*-polystyrène [157] et la polymérisation MADIX du xyloglucane-*b*-poly(acrylamide) [158] (Figure 28). La dernière méthode implique une réaction de couplage entre deux blocs polymères préexistants et portant des fonctions complémentaires à leurs extrémités. Hernandez *et coll.* ont couplé un bloc dextrane dont l'extrémité réductrice a été préalablement oxydée en lactone à du PEG-NH₂ par une réaction d'aminolyse de lactone (Figure 29.a) [159]. Kamitakahara *et coll.* ont proposé une voie innovante de couplage entre du triacétate de cellulose et du nylon par élongation séquentielle d'un bloc hydrophobe de nylon [160]. Le triacétate de cellulose ayant une amine primaire à son extrémité réductrice a été amidé quatre fois avec du chlorure de 15-azidopentadécanoyle, le groupe terminal azoture étant réduit en une amine à chaque étape par hydrogénation avec un catalyseur de palladium sur carbone (Figure 29.b). La cycloaddition azoture-alcyne catalysée par le cuivre(I) a également été utilisée pour concevoir des structures de copolymères à blocs linéaires. Schatz *et coll.* ont synthétisé un copolymère dextrane-*b*-PBLG [161]. Un groupe alcyne a été introduit au niveau de l'extrémité réductrice du dextrane par une amination réductrice classique avec de la propargylamine en présence de cyanoborohydrure de sodium (NaBH₃CN) et le PBLG fonctionnalisé avec un groupe azoture (Figure 29.c) afin de permettre le couplage de ces deux blocs en présence de cuivre (I).

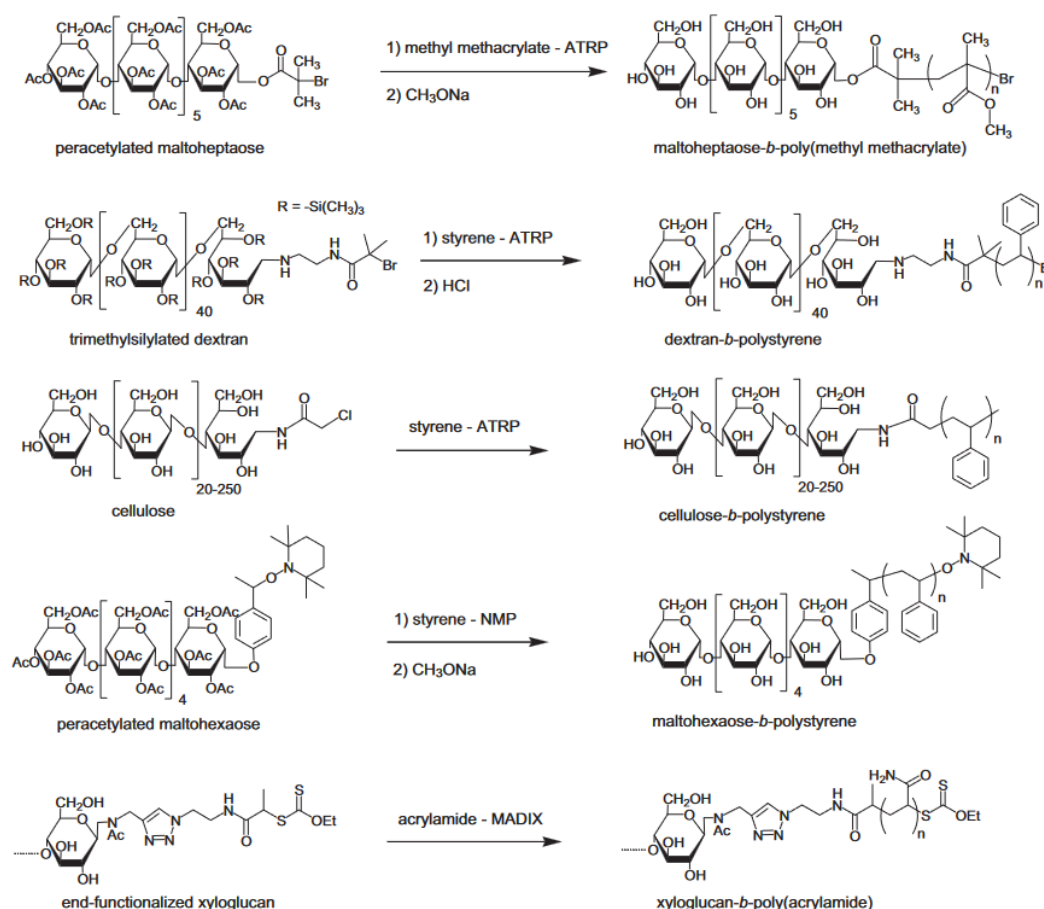


Figure 28. Polymérisations vivantes contrôlées de blocs vinyliques à partir de poly- ou oligosaccharides avec des unités terminales modifiées [144].

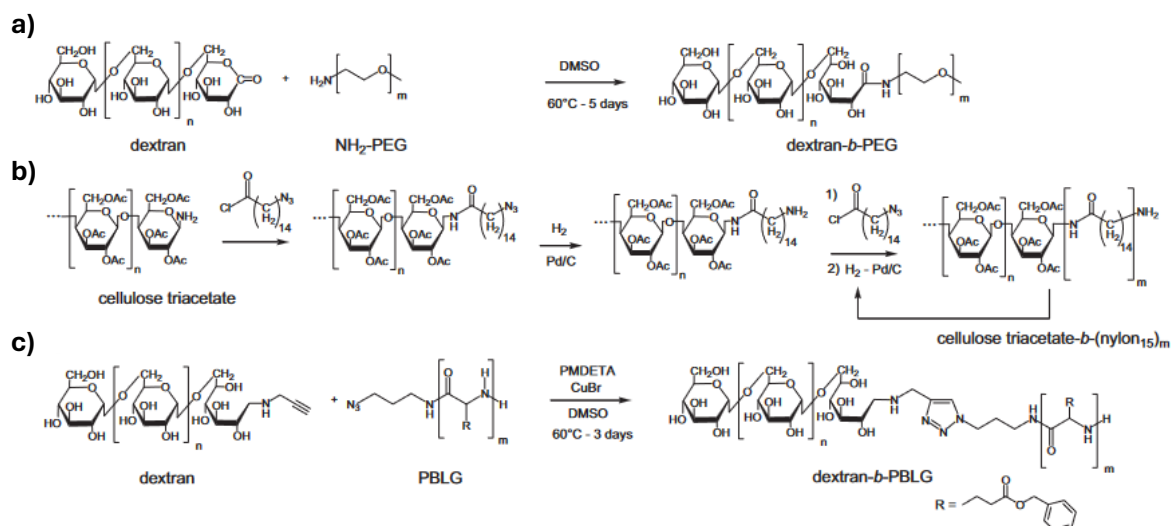


Figure 29. Diverses réactions de couplage à partir d'un bloc polysaccharide et d'un bloc synthétique : a) aminolyse d'une extrémité lactone d'un dextrane, b) élongation séquentielle d'un bloc nylon et c) cycloaddition azoture-alcyne catalysée par du cuivre(I) [144].

Toutes les méthodes mentionnées ci-dessus impliquent à un certain stade l'introduction d'une fonction réactive à l'extrémité réductrice native du polysaccharide. L'extrémité réductrice classique des polysaccharides est un hémicétal en équilibre avec un aldéhyde, ainsi, elle peut être modifiée par réaction avec certains nucléophiles. Parmi les différentes méthodes, l'amination réductrice en présence d'agent réducteur est couramment utilisée car elle permet la conversion directe de la forme aldéhyde de l'extrémité réductrice en une amine. L'amination réductrice se déroule en deux étapes : un équilibre initial entre l'aldéhyde et le groupe iminium résultant de l'addition nucléophile de l'amine sur le groupe carbonyle, suivi par la réduction rapide du groupe iminium en une amine stable correspondante (Figure 30) [162].

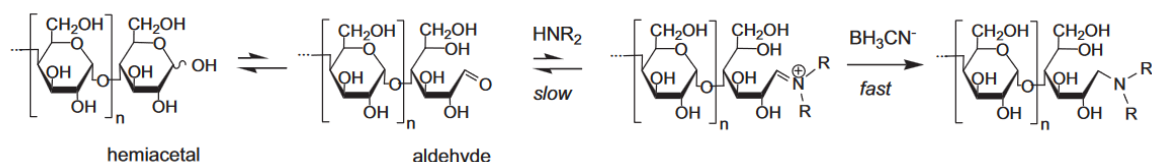


Figure 30. Réaction d'amination réductrice à l'extrémité réductrice d'un polysaccharide en présence de cyanoborohydride de sodium (NaBH_3CN) [144].

L'amination réductrice nécessite suffisamment de protons dans le milieu pour permettre la formation de l'ion iminium. A un pH de 3-4, la vitesse de réduction du carbonyle est trop rapide par rapport à celle de la réduction de l'iminium, et la protonation de l'amine rend son addition nucléophile moins favorable. Ainsi, selon Borch *et coll.*, le pH optimal de l'amination réductrice se situe entre 6 et 8 [163]. L'amination réductrice des saccharides et des polysaccharides est une réaction longue nécessitant généralement plusieurs jours, car la proportion de la forme aldéhyde libre à l'équilibre est très faible comparée à la forme cyclique hémicétal. Maple et Allerhand ont démontré que la proportion de D-glucose sous forme aldéhyde à 37°C et pH 4,8 n'est que de 0,0024% [164]. Concernant le choix de l'agent réducteur, le borohydride de sodium (NaBH_4), agent de réduction très commun, peut être utilisé mais présente

l'inconvénient majeur de ne pas être sélectif et d'également réduire les aldéhydes et les cétones. Ainsi, il est préférable d'utiliser un agent réducteur plus faible comme le cyanoborohydrure de sodium (NaBH_3CN). NaBH_3CN est un réducteur très soluble dans l'eau réduisant plus rapidement les imines que les aldéhydes ou les cétones [162]. Yang *et coll.* ont ainsi préparé un copolymère linéaire composé de hyaluronane de faible masse molaire et de poly(2-éthyl-2-oxazoline) fonctionnalisé par une amine en bout de chaîne (PEToz-NH₂) (Figure 31) [165] tandis que Bosker *et coll.* ont couplé du dextrane (DP < 40) à du polystyrène (PS) (DP 119) [166]. Belbekhouche *et coll.* ont quant à eux synthétisé un copolymère pullulane-*b*-polyétheramine par réaction entre l'extrémité réductrice du pullulane et l'amine terminale du polyétheramine introduit en excès [167]. Ces réactions de couplage par amination réductrice nécessitent de larges excès en polysaccharide (10-100 équivalents) ainsi que de longs temps de réaction (7-8 jours) pour atteindre des rendements de 75-95% [165],[166],[167]. Bosker *et coll.* ont constaté que la synthèse de copolymères diblocs à partir de dextrans de DP plus élevés (DP 58–123) avec le même bloc PS, dans les mêmes conditions, n'est pas concluante. Cela est attribué à une faible probabilité de rencontre des extrémités de chaînes et à une solubilité diminuée à mesure que le DP du polysaccharide augmente [166].

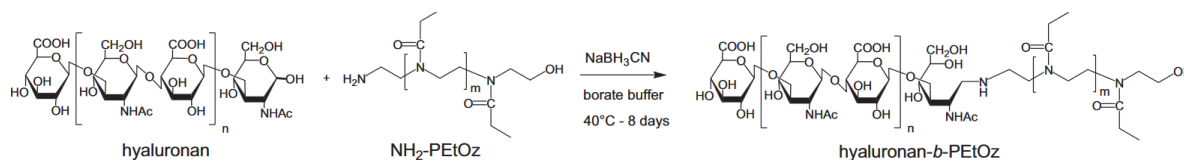


Figure 31. Synthèse de copolymères linéaires diblocs hyaluronane-*b*-PEToz par réaction d'amination réductrice en présence de NaBH_3CN [144].

Ganji et Abdekhodaie sont les premiers à avoir décrit la synthèse d'un copolymère linéaire à base de chitosane et de PEG [168]. Dans un premier temps, les liaisons glycosidiques de la chaîne principale du chitosane ont été dégradées à l'aide de persulfate de potassium, entraînant la formation de chaînes plus courtes avec un groupe carbonyle à une extrémité et un radical libre à l'autre. Les chaînes de chitosane contenant le radical libre ont ensuite réagi avec du PEG modifié par du chlorure d'acryloyle, aboutissant à la formation d'une structure linéaire à blocs (Figure 32) [168].

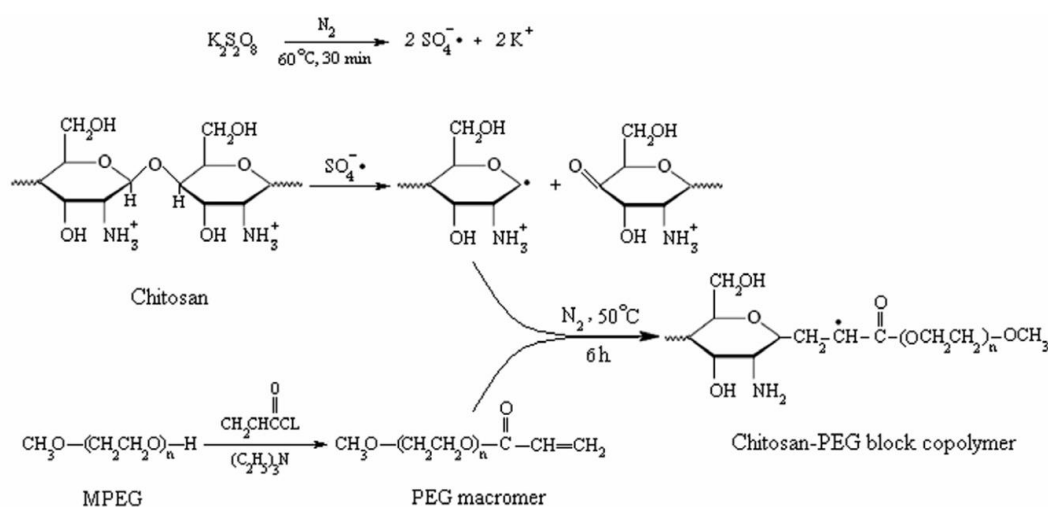


Figure 32. Schéma de la synthèse du chitosane-*b*-PEG proposée par Ganji et Abdekhodaie [168].

Cependant, cette réaction ne permet pas de contrôler la masse molaire du segment de chitosane. Novoa-Carballal et Müller ont couplé du PEG à différents polysaccharides (dextrane, hyaluronane et chitosane) par chimie « click » des oximes [169]. La réaction est une amination du PEG-NH₂ avec l'aldéhyde de l'extrémité réductrice des polysaccharides (Figure 33). Les liaisons oxime résistent bien à l'hydrolyse et ne se dégradent qu'en conditions fortement acides (95% d'hydrolyse en 24h à pH 2), ce qui de façon générale permet une bonne stabilité des copolymères formés sur une large gamme de pH [169]. Dans cette étude, le chitosane a été dépolymérisé par action du nitrite de sodium générant une unité 2,5-anhydro-D-mannose (unité M) à son extrémité réductrice, dont la fonction aldéhyde est bien plus réactive que celle du chitosane natif [169]. Cette méthode de couplage du chitosane par chimie « click » des oximes s'est également avérée efficace avec du chitosane non dépolymérisé ; présentant donc une extrémité réductrice classique des polysaccharides [169].

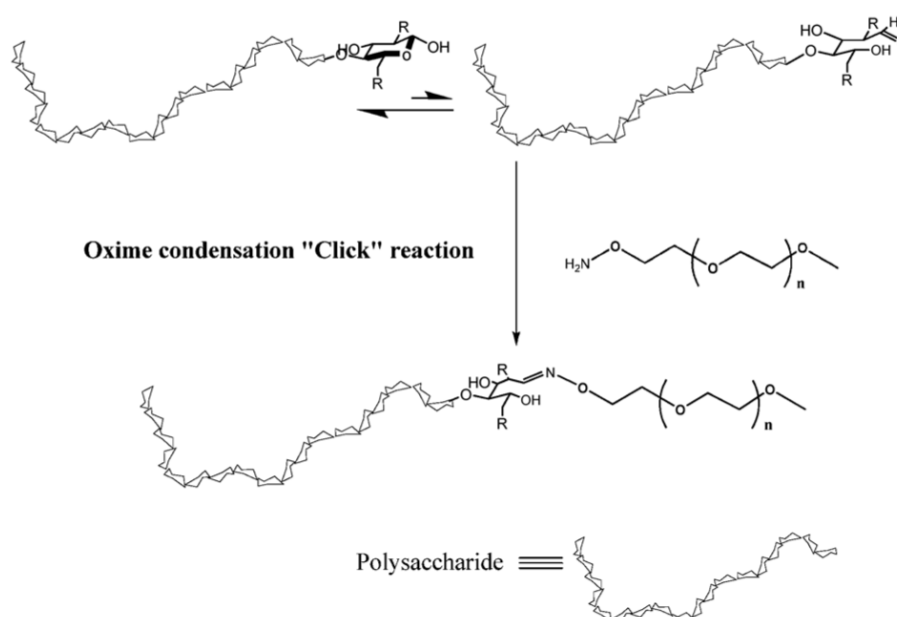


Figure 33. Approche proposée par Novoa-Carballal et Müller pour la synthèse de polysaccharide-*b*-PEG [169].

Moussa *et coll.* ont exploité la réactivité de l'unité M des oligosaccharides de chitosane (COS) à des fins de fonctionnalisation avec des dihydrazides par réaction d'amination réductrice [16]. Un large excès de dihydrazide est nécessaire afin d'éviter tout phénomène de dimérisation. La haute réactivité des COS vis-à-vis des hydrazides a permis à Delas *et coll.*, en collaboration avec l'IMP Lyon, de synthétiser du COS-*b*-PEG par amination réductrice entre l'unité M et du PEG-hydrazide en excès [170]. Dans un premier temps, une liaison hydrazone se forme puis est ensuite réduite par action de NaBH₃CN (Figure 34). Cette synthèse présente l'avantage principal d'être réalisée dans l'eau en conditions douces.

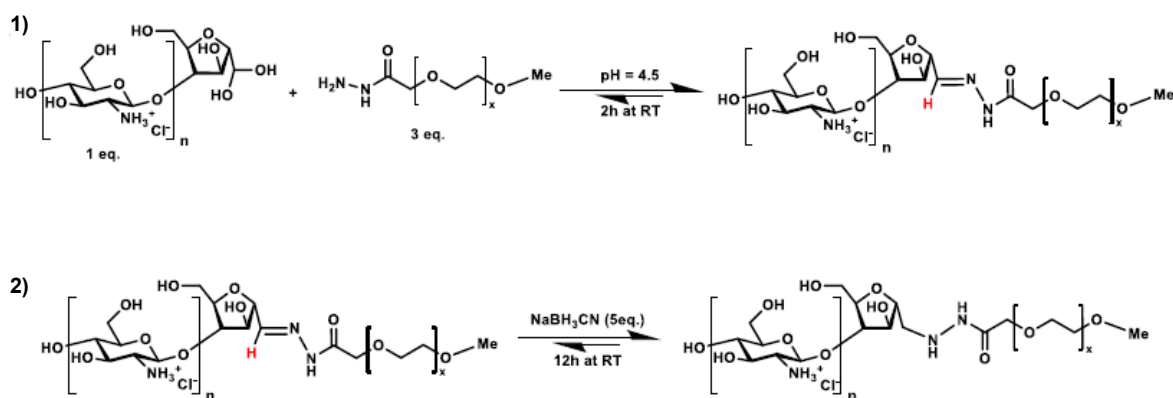


Figure 34. Voie de synthèse du copolymère COS-*b*-PEG. 1) Formation de l'hydrazone entre l'unité M des COS et l'hydrazide du PEG. 2) Réduction de l'hydrazone par action de NaBH₃CN [170].

Breitenbach *et coll.* sont les premiers à avoir décrit la synthèse d'un copolymère à bloc linéaire composé exclusivement de blocs polysaccharides [171]. Le copolysaccharide amphiphile obtenu résulte du couplage de dextrane hydrophile et de dextrane acétalisé hydrophobe (Figure 35). Cette réaction de chimie « click » entre un azoture et un alcyne est catalysée par le cuivre (I) or ce dernier, en tant que cation divalent, peut interagir avec certains polysaccharides anioniques comme les algines [172].

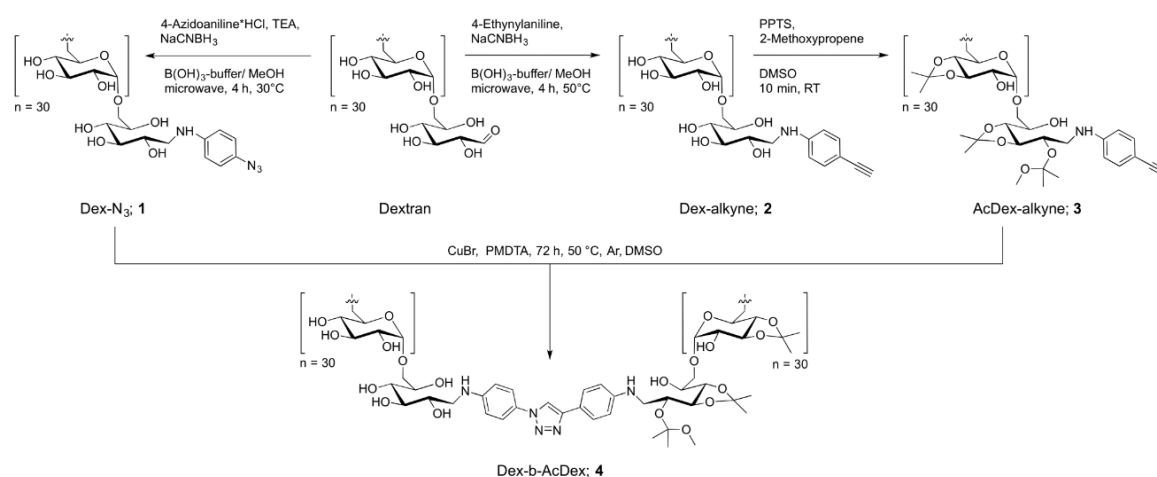


Figure 35. Synthèse d'un copolymère à blocs amphiphile Dex-*b*-AcDex (**4**) par réaction « click » catalysée par du Cu(I) entre un bloc de dextrane hydrophile fonctionnalisé avec un azoture (**1**) et un bloc de dextrane acétalisé hydrophobe fonctionnalisé avec un alcyne (**3**) [171].

Récemment, les réactions « click » de couplage de blocs d'oligosaccharides et de polysaccharides à base d'oxyamine et d'hydrazide ont suscité un intérêt grandissant. Les dihydrazides et les dioxyamines ont été spécifiquement choisis pour permettre un couplage rapide et quasiment quantitatif des polysaccharides via leurs extrémités réductrices. Le recours à ces molécules difonctionnelles offre plusieurs avantages par rapport à la méthode plus classique reposant sur la cycloaddition azoture-alcyne de Huisgen. Ces avantages incluent l'absence de catalyseur au cuivre, qui pourrait entraîner une dégradation des polysaccharides et des interactions indésirables avec certains polysaccharides anioniques. De plus, cette approche offre une voie de couplage simple en deux étapes : d'abord l'activation d'un bloc avec une dioxyamine ou un dihydrazide, suivie par le couplage du deuxième bloc [173]. Contrairement aux amines primaires, les hydrazides et les oximes réagissent relativement

rapidement avec les extrémités réductrices des carbohydrates bien qu'une concentration > 500 mM soit requise afin de déplacer l'équilibre vers la formation du conjugué [174]. Cette forte réactivité est due à la nucléophilie plus élevée des groupes oxyamine et hydrazide, qui résulte de « l'effet alpha » *i.e.* de l'augmentation de l'énergie de l'orbitale moléculaire occupée la plus haute (HOMO) en raison du recouvrement orbital des atomes voisins (en position alpha) possédant des paires d'électrons libres [175],[176]. De plus, la faible basicité des oxyamines et des hydrazides ($pK_a < 4-5$) permet de les utiliser dans des conditions légèrement acides, ce qui est particulièrement pertinent pour des systèmes à base de chitosane, insoluble à pH neutre. *Mo et coll.* ont étudié la conjugaison d'oligosaccharides de chitosane avec du dihydrazide adipique (ADH), et du dihydrochlorure d'O,O'-1,3-propanediylbishydroxylamine (PDHA) (Figure 36) [177].

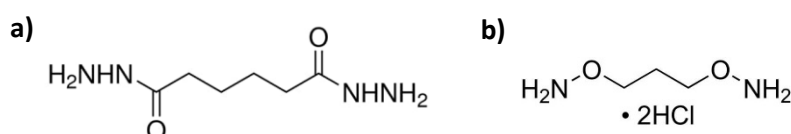


Figure 36. Structures chimiques de a) l'ADH et b) du PDHA.

L'ADH et le PDHA sont deux molécules présentant une nucléophilie élevée tout en étant très peu basiques, avec des pK_a respectifs de 3,1 pour l'ADH et de 4,2 pour le PDHA. En règle générale, plus une base est forte, plus elle est nucléophile ; l'ADH et le PDHA constituent donc une exception à cette règle. Comme mentionné précédemment, « l'effet alpha » est un premier argument permettant d'expliquer la forte nucléophilie de ces composés comparée à leur faible basicité. Dans le cas de l'ADH et du PDHA, les effets inductifs attracteurs viennent également diminuer la basicité de l'amine terminale et dans le cas de l'atome d'azote, sa basicité est également diminuée lors qu'il est π -donneur [178]. La fonctionnalisation des oligosaccharides de chitosane ($DP < 10$) avec le PDHA conduit à la formation d'oximes acycliques (E) et (Z) et de β -N-pyranosides cycliques tandis qu'avec l'ADH seule la forme cyclique est obtenue (Figure 37) [177].

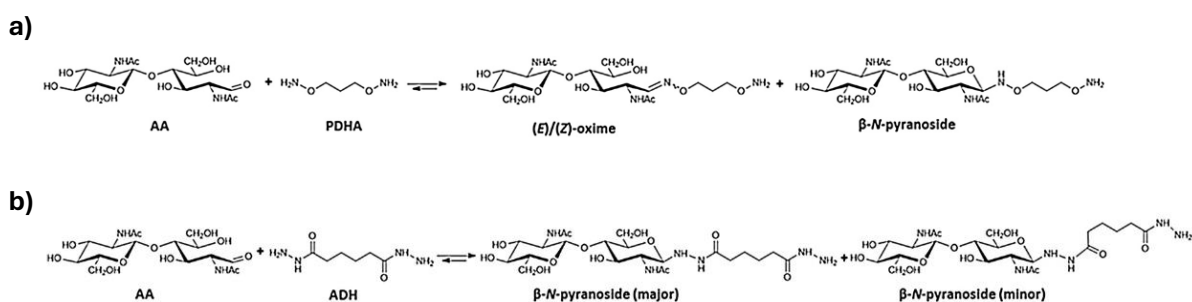


Figure 37. Conjugaison a) du PDHA et b) de l'ADH à un dimère de chitine (AA) [177].

L'agent réducteur classiquement utilisé pour les réactions d'amination réductrice, le cyanoborohydrure de sodium, a été remplacé par une alternative moins toxique le picoline borane. Le picoline borane est moins soluble que le $NaBH_3CBN$ en milieu aqueux à température ambiante, mais il se dégrade également plus lentement. Toutefois, plusieurs ajouts de picoline borane sont tout de même nécessaires pour obtenir une réduction complète des conjugués [173]. Comme évoqué précédemment, la dépolymérisation du chitosane par action du nitrite de sodium génère une nouvelle extrémité réductrice

hautement réactive, la 2,5-anhydro-D-mannose (unité M). *Mo et coll.* ont tiré parti de la haute réactivité de l'unité M afin de synthétiser des copolysaccharides à blocs à base d'oligomères de chitine (A_nM) [4]. La première étape consiste à activer les oligomères de chitine par fonctionnalisation avec l'ADH et le PDHA en conditions réductrices. Dans un deuxième temps, un second bloc d'oligosaccharides est couplé par réaction de son extrémité réductrice avec la chitine fonctionnalisée (Figure 38).

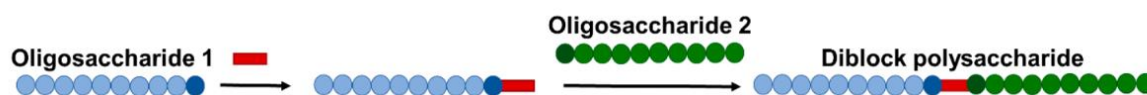


Figure 38. Schéma général de la préparation d'un copolysaccharide à blocs. Une molécule bifonctionnelle est couplée à l'extrémité réductrice de l'oligosaccharide 1 qui est ensuite couplé à l'oligosaccharide 2 [4].

Deux types de copolysaccharides ont été obtenus par cette méthode ; des copolymères à blocs symétriques de type $A-b-A$ par couplage entre deux oligomères de chitine ainsi que des copolymères asymétriques de type $A-b-B$ par couplage entre un oligomère de chitine et un oligomère de dextrane. Les taux de conversion plus faibles observés pour le couplage $A_5M-b-Dext_6$ comparé au couplage $A_4M-b-MA_4$ soulignent la disponibilité réduite de l'aldéhyde à l'extrémité réductrice du dextrane par rapport à l'aldéhyde de l'unité M des oligomères de chitine [4]. Pour le couplage avec le dextrane, il est préférable de le fonctionnaliser d'abord avec un large excès d'ADH ou de PDHA afin de compenser sa faible réactivité, puis d'ajouter les oligomères de chitine dont l'unité M terminale est beaucoup plus réactive. Cependant, la forte réactivité de l'unité M la rend également très sensible à la réduction, ce qui entraînera inévitablement des problèmes de rendement dans le cadre d'un processus « *one-pot* » d'amination réductrice. Solberg *et coll.* ont étudié le couplage d'oligogulonates avec plusieurs blocs polysaccharides comme le dextrane démontrant une nouvelle fois la versatilité de cette méthode de couplage de polysaccharides [179]. Jusqu'à présent cette méthode de couplage appliqué au chitosane se limite aux oligomères pour des raisons de solubilité, de réactivité ainsi que de facilité de suivi des réactions par RMN 1H . Dans le cas spécifique du chitosane et plus encore lorsque celui-ci présente une unité M en bout de chaîne, une réaction secondaire peut venir interférer lors du couplage avec un autre polysaccharide. En effet, en présence de réducteur, l'extrémité réductrice du chitosane peut également venir réagir avec ses propres amines latérales ; réaction connue sous le nom de « *self-branching* » du chitosane (Figure 39) [180]. L'intérêt d'utiliser des dihydrazides et dioxyamines très réactifs devient d'autant plus crucial pour minimiser cette réaction de *self-branching*, indésirable lors de la synthèse de copolysaccharides à blocs linéaires.

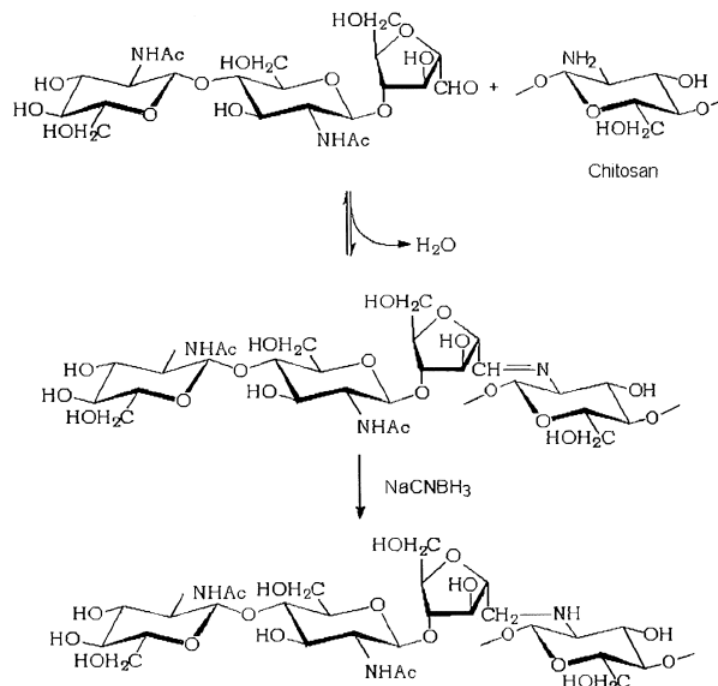


Figure 39. Mécanisme de *self-branching* du chitosane proposé par Tømmeraas *et coll.* [180].

5. CONCLUSION

Ce chapitre bibliographique a permis de mettre en évidence les propriétés chimiques et biologiques du chitosane et notamment sa capacité à former des complexes électrostatiques avec les acides nucléiques. Les complexes à base de chitosane sont particulièrement intéressants en raison de leur biocompatibilité, leur biodégradabilité et bioactivité mais surtout de leur faible toxicité en lien avec la faible cationicité du chitosane. Cependant, les taux de transfection des systèmes à base de chitosane restent relativement faibles principalement à cause de l'instabilité des complexes à pH physiologique. De nombreuses modifications du chitosane ont été proposées pour améliorer sa solubilité et donc la stabilité des complexes mais également pour faciliter leur internalisation et leur dissociation dans les cellules. La majorité des modifications chimiques du chitosane impliquent des substitutions latérales de sa chaîne principale, ce qui affecte ses propriétés intrinsèques. Par conséquent, la synthèse de copolymères à blocs linéaires à partir de chitosane devient pertinente, cette structure permettant de préserver les propriétés structurales et fonctionnelles des deux blocs. Dans un contexte de délivrance de gènes ou de médicaments, il est d'autant plus pertinent de s'intéresser à la synthèse de copolymères à blocs linéaires constitués exclusivement de blocs polysaccharides. L'amination réductrice en présence de dihydrazides ou de dioxyamines est une méthode éprouvée pour le couplage de deux blocs d'oligosaccharides. Ce travail de thèse vise donc à appliquer cette méthode pour la synthèse de copolysaccharides chitosane-*b*-dextrane à partir de polysaccharides présentant différents degrés de polymérisation. Ces copolysaccharides seront ensuite évalués comme vecteurs d'acides nucléiques, le dextrane jouant ici un rôle similaire à celui du PEG en améliorant la solubilité des copolysaccharides à pH physiologique, en stabilisant les complexes et en protégeant les acides nucléiques contre la dégradation par les nucléases.

REFERENCES

- [1] J. Desbrières, « Chitine et chitosane », *L'Actualité Chimique*, n° 261, p. 39-44, 2002.
- [2] M. Revathi, R. Saravanan, et A. Shanmugam, « Production and characterization of chitinase from *Vibrio* species, a head waste of shrimp *Metapenaeus dobsonii* (Miers, 1878) and chitin of *Sepiella inermis* Orbigny, 1848 », *ABB*, vol. 03, n° 04, p. 392-397, 2012, doi: 10.4236/abb.2012.34056.
- [3] I. Younes et M. Rinaudo, « Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications », *Marine Drugs*, vol. 13, n° 3, p. 1133-1174, mars 2015, doi: 10.3390/md13031133.
- [4] I. V. Mo, M. Ø. Dalheim, F. L. Aachmann, C. Schatz, et B. E. Christensen, « 2,5-Anhydro-D-Mannose End-Functionalized Chitin Oligomers Activated by Dioxamines or Dihydrazides as Precursors of Diblock Oligosaccharides », *Biomacromolecules*, vol. 21, n° 7, p. 2884-2895, juill. 2020, doi: 10.1021/acs.biomac.0c00620.
- [5] G. Roberts, « Structure of chitin and chitosan », in *Chitin Chemistry*, Palgrave Macmillan., London, UK, 1992, p. 85-91.
- [6] K. M. Vårum, M. H. Ottøy, et O. Smidsrød, « Water-solubility of partially N-acetylated chitosans as a function of pH: effect of chemical composition and depolymerisation », *Carbohydrate Polymers*, vol. 25, n° 2, p. 65-70, janv. 1994, doi: 10.1016/0144-8617(94)90140-6.
- [7] C. Schatz et T. Delas, « Fundamental and Practical Aspects in the Formulation of Colloidal Polyelectrolyte Complexes of Chitosan and siRNA », in *Design and Delivery of siRNA Therapeutics*, vol. 2282, H. J. Ditzel, M. Tuttolomondo, et S. Kauppinen, Éd., in *Methods in Molecular Biology*, vol. 2282., New York, NY: Springer US, 2021, p. 297-327. doi: 10.1007/978-1-0716-1298-9_17.
- [8] K. Kurita, K. Tomita, T. Tada, S. Ishii, S. Nishimura, et K. Shimoda, « Squid chitin as a potential alternative chitin source: Deacetylation behavior and characteristic properties », *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.*, vol. 31, n° 2, p. 485-491, févr. 1993, doi: 10.1002/pola.1993.080310220.
- [9] G. Lamarque, M. Cretenet, C. Viton, et A. Domard, « New Route of Deacetylation of α - and β -Chitins by Means of Freeze-Pump Out-Thaw Cycles », *Biomacromolecules*, vol. 6, n° 3, p. 1380-1388, mai 2005, doi: 10.1021/bm049322b.
- [10] L. Vachoud, N. Zydowicz, et A. Domard, « Formation and characterisation of a physical chitin gel », *Carbohydrate Research*, vol. 302, n° 3-4, p. 169-177, août 1997, doi: 10.1016/S0008-6215(97)00126-2.
- [11] N. D. Aljbour, M. D. H. Beg, et J. Gimbut, « Acid Hydrolysis of Chitosan to Oligomers Using Hydrochloric Acid », *Chem. Eng. Technol.*, vol. 42, n° 9, p. 1741-1746, sept. 2019, doi: 10.1002/ceat.201800527.
- [12] S. N. Hamer, B. M. Moerschbacher, et S. Kolkenbrock, « Enzymatic sequencing of partially acetylated chitosan oligomers », *Carbohydrate Research*, vol. 392, p. 16-20, juin 2014, doi: 10.1016/j.carres.2014.04.006.
- [13] J. M. Wasikiewicz et S. G. Yeates, « “Green” molecular weight degradation of chitosan using microwave irradiation », *Polymer Degradation and Stability*, vol. 98, n° 4, p. 863-867, avr. 2013, doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2012.12.028.
- [14] E. Savitri, S. R. Juliastuti, A. Handaratri, Sumarno, et A. Roesyadi, « Degradation of chitosan by sonication in very-low-concentration acetic acid », *Polymer Degradation and Stability*, vol. 110, p. 344-352, déc. 2014, doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2014.09.010.
- [15] G. G. Allan et M. Peyron, « Molecular weight manipulation of chitosan II: prediction and control of extent of depolymerization by nitrous acid », *Carbohydrate Research*, vol. 277, n° 2, p. 273-282, nov. 1995, doi: 10.1016/0008-6215(95)00208-B.
- [16] A. Moussa, A. Crépet, C. Ladavière, et S. Trombotto, « Reducing-end “clickable” functionalizations of chitosan oligomers for the synthesis of chitosan-based diblock copolymers », *Carbohydrate Polymers*, vol. 219, p. 387-394, sept. 2019, doi: 10.1016/j.carbpol.2019.04.078.
- [17] K. Tømmeraas, K. M. Vårum, B. E. Christensen, et O. Smidsrød, « Preparation and characterisation of oligosaccharides produced by nitrous acid depolymerisation of chitosans », *Carbohydrate Research*, vol. 333, n° 2, p. 137-144, juill. 2001, doi: 10.1016/S0008-6215(01)00130-6.
- [18] A. Pernet-Poil-Chevrier, « Nouvelle méthode de préparation de chitoooligosaccharides possédant une structure et une architecture contrôlées », PhD Thesis, 2009. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.theses.fr/2009LYO10031/document>
- [19] E. A. Bezrodnykh, I. V. Blagodatskikh, S. N. Kulikov, P. V. Zelenikhin, I. A. Yamskov, et V. E. Tikhonov, « Consequences of chitosan decomposition by nitrous acid: Approach to non-branched oligochitosan oxime », *Carbohydrate Polymers*, vol. 195, p. 551-557, sept. 2018, doi: 10.1016/j.carbpol.2018.05.007.

- [20] A. Domard, « pH and c.d. measurements on a fully deacetylated chitosan: application to CuII–polymer interactions », *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 9, n° 2, p. 98-104, avr. 1987, doi: 10.1016/0141-8130(87)90033-X.
- [21] C. Schatz, C. Pichot, T. Delair, C. Viton, et A. Domard, « Static Light Scattering Studies on Chitosan Solutions: From Macromolecular Chains to Colloidal Dispersions », *Langmuir*, vol. 19, n° 23, p. 9896-9903, nov. 2003, doi: 10.1021/la034410n.
- [22] T. Delas *et al.*, « Effects of Chain Length of Chitosan Oligosaccharides on Solution Properties and Complexation with siRNA », *Polymers*, vol. 11, n° 8, p. 1236, juill. 2019, doi: 10.3390/polym11081236.
- [23] S. Aiba, « Studies on chitosan: 3. Evidence for the presence of random and block copolymer structures in partially N-acetylated chitosans », *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 13, n° 1, p. 40-44, févr. 1991, doi: 10.1016/0141-8130(91)90008-I.
- [24] M. X. Weinhold, J. C. M. Sauvageau, J. Kumirska, et J. Thöming, « Studies on acetylation patterns of different chitosan preparations », *Carbohydrate Polymers*, vol. 78, n° 4, p. 678-684, nov. 2009, doi: 10.1016/j.carbpol.2009.06.001.
- [25] P. Sorlier, A. Denuzière, C. Viton, et A. Domard, « Relation between the Degree of Acetylation and the Electrostatic Properties of Chitin and Chitosan », *Biomacromolecules*, vol. 2, n° 3, p. 765-772, sept. 2001, doi: 10.1021/bm015531+.
- [26] T. D. Andreeva, H. Hartmann, S. G. Taneva, et R. Krastev, « Regulation of the growth, morphology, mechanical properties and biocompatibility of natural polysaccharide-based multilayers by Hofmeister anions », *J. Mater. Chem. B*, vol. 4, n° 44, p. 7092-7100, 2016, doi: 10.1039/C6TB01638C.
- [27] A. Domard, « A perspective on 30 years research on chitin and chitosan », *Carbohydrate Polymers*, vol. 84, n° 2, p. 696-703, mars 2011, doi: 10.1016/j.carbpol.2010.04.083.
- [28] R. Sadeghi et F. Jahani, « Salting-In and Salting-Out of Water-Soluble Polymers in Aqueous Salt Solutions », *J. Phys. Chem. B*, vol. 116, n° 17, p. 5234-5241, mai 2012, doi: 10.1021/jp300665b.
- [29] C. Schatz, P. Sorlier, C. Viton, et A. Domard, « Relation Between the Cationicity of Glucosamine Residues and the Interactions Involving Chitin and Chitosan », *ChemInform*, vol. 34, n° 39, p. chin.200339268, sept. 2003, doi: 10.1002/chin.200339268.
- [30] C. J. B. Van Treslong et A. J. Staverman, « Poly(ethylenimine) II. Potentiometric titration behaviour in comparison with other weak polyelectrolytes », *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, vol. 93, n° 6, p. 171-178, janv. 1974, doi: 10.1002/recl.19740930612.
- [31] C. Schatz, C. Viton, T. Delair, C. Pichot, et A. Domard, « Typical Physicochemical Behaviors of Chitosan in Aqueous Solution », *Biomacromolecules*, vol. 4, n° 3, p. 641-648, mai 2003, doi: 10.1021/bm025724c.
- [32] H. Sashiwa, H. Saimoto, Y. Shigemasa, R. Ogawa, et S. Tokura, « Lysozyme susceptibility of partially deacetylated chitin », *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 12, n° 5, p. 295-296, oct. 1990, doi: 10.1016/0141-8130(90)90016-4.
- [33] K. Y. Lee, W. S. Ha, et W. H. Park, « Blood compatibility and biodegradability of partially N-acetylated chitosan derivatives », *Biomaterials*, vol. 16, n° 16, p. 1211-1216, janv. 1995, doi: 10.1016/0142-9612(95)98126-Y.
- [34] S. Richardson, « Potential of low molecular mass chitosan as a DNA delivery system: biocompatibility, body distribution and ability to complex and protect DNA », *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 178, n° 2, p. 231-243, févr. 1999, doi: 10.1016/S0378-5173(98)00378-0.
- [35] M. D. Buschmann, A. Merzouki, M. Lavertu, M. Thibault, M. Jean, et V. Darras, « Chitosans for delivery of nucleic acids », *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 65, n° 9, p. 1234-1270, août 2013, doi: 10.1016/j.addr.2013.07.005.
- [36] Y. Okamoto, R. Yano, K. Miyatake, I. Tomohiro, Y. Shigemasa, et S. Minami, « Effects of chitin and chitosan on blood coagulation », *Carbohydrate Polymers*, vol. 53, n° 3, p. 337-342, août 2003, doi: 10.1016/S0144-8617(03)00076-6.
- [37] G. I. Howling, P. W. Dettmar, P. A. Goddard, F. C. Hampson, M. Dornish, et E. J. Wood, « The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human skin fibroblasts and keratinocytes in vitro », *Biomaterials*, vol. 22, n° 22, p. 2959-2966, nov. 2001, doi: 10.1016/S0142-9612(01)00042-4.
- [38] T. Mori *et al.*, « Effects of chitin and its derivatives on the proliferation and cytokine production of fibroblasts in vitro », *Biomaterials*, vol. 18, n° 13, p. 947-951, juill. 1997, doi: 10.1016/S0142-9612(97)00017-3.
- [39] Y. Chung *et al.*, « Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall », *Acta Pharmacol Sin*, vol. 25, n° 7, p. 932-936, juill. 2004.
- [40] I. Younes, S. Sellimi, M. Rinaudo, K. Jellouli, et M. Nasri, « Influence of acetylation degree and molecular weight of homogeneous chitosans on antibacterial and antifungal activities »,

- International Journal of Food Microbiology*, vol. 185, p. 57-63, août 2014, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.029.
- [41] A. El-Ghaouth, J. Arul, A. Asselin, et N. Benhamou, « Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits », *Phytopathology*, n° 82, p. 398-402, 1992.
- [42] P.-J. Park, J.-Y. Je, et S.-K. Kim, « Free Radical Scavenging Activity of Chitooligosaccharides by Electron Spin Resonance Spectrometry », *J. Agric. Food Chem.*, vol. 51, n° 16, p. 4624-4627, juill. 2003, doi: 10.1021/jf034039+.
- [43] J.-Y. Je, P.-J. Park, et S.-K. Kim, « Free radical scavenging properties of hetero-chitooligosaccharides using an ESR spectroscopy », *Food and Chemical Toxicology*, vol. 42, n° 3, p. 381-387, mars 2004, doi: 10.1016/j.fct.2003.10.001.
- [44] D. Zhao, J. Wang, L. Tan, C. Sun, et J. Dong, « Synthesis of N-furoyl chitosan and chitooligosaccharides and evaluation of their antioxidant activity in vitro », *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 59, p. 391-395, août 2013, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2013.04.072.
- [45] T. Sun, W. Xie, et P. Xu, « Superoxide anion scavenging activity of graft chitosan derivatives », *Carbohydrate Polymers*, vol. 58, n° 4, p. 379-382, déc. 2004, doi: 10.1016/j.carbpol.2004.06.042.
- [46] C. R. Dass et P. F. M. Choong, « The use of chitosan formulations in cancer therapy », *Journal of Microencapsulation*, vol. 25, n° 4, p. 275-279, janv. 2008, doi: 10.1080/02652040801970461.
- [47] M. Hasegawa, K. Yagi, S. Iwakawa, et M. Hirai, « Chitosan Induces Apoptosis via Caspase-3 Activation in Bladder Tumor Cells », *Japanese Journal of Cancer Research*, vol. 92, n° 4, p. 459-466, avr. 2001, doi: 10.1111/j.1349-7006.2001.tb01116.x.
- [48] C. Xiong *et al.*, « Potent angiogenic inhibition effects of deacetylated chitohexaose separated from chitooligosaccharides and its mechanism of action in vitro », *Carbohydrate Research*, vol. 344, n° 15, p. 1975-1983, oct. 2009, doi: 10.1016/j.carres.2009.06.036.
- [49] X. Li *et al.*, « Effect of chitooligosaccharides on cyclin D1, bcl-xl and bcl-2 mRNA expression in A549 cells using quantitative PCR », *Chin. Sci. Bull.*, vol. 56, n° 15, p. 1629-1632, mai 2011, doi: 10.1007/s11434-010-4501-9.
- [50] L. Huang *et al.*, « Anti-Obese Effect of Glucosamine and Chitosan Oligosaccharide in High-Fat Diet-Induced Obese Rats », *Marine Drugs*, vol. 13, n° 5, p. 2732-2756, avr. 2015, doi: 10.3390/md13052732.
- [51] E. H. Choi, H. P. Yang, et H. S. Chun, « Chitooligosaccharide ameliorates diet-induced obesity in mice and affects adipose gene expression involved in adipogenesis and inflammation », *Nutrition Research*, vol. 32, n° 3, p. 218-228, mars 2012, doi: 10.1016/j.nutres.2012.02.004.
- [52] N.-H. Kang *et al.*, « Modulation of lipid metabolism by mixtures of protamine and chitooligosaccharide through pancreatic lipase inhibitory activity in a rat model », *Lab Anim Res*, vol. 28, n° 1, p. 31, 2012, doi: 10.5625/lar.2012.28.1.31.
- [53] H. Y. Nam, J. H. Park, K. Kim, I. C. Kwon, et S. Y. Jeong, « Lipid-based emulsion system as non-viral gene carriers », *Arch. Pharm. Res.*, vol. 32, n° 5, p. 639-646, mai 2009, doi: 10.1007/s12272-009-1500-y.
- [54] H. Dautzenberg et W. Jaeger, « Effect of charge density on the formation and salt stability of polyelectrolyte complexes », *Macromol. Chem. Phys.*, vol. 203, n° 14, p. 2095-2102, oct. 2002, doi: 10.1002/1521-3935(200210)203:14<2095::AID-MACP2095>3.0.CO;2-9.
- [55] L. Xu et T. Anchordoquy, « CLINICAL TRIALS AND TRANSLATIONAL MEDICINE COMMENTARY: Drug Delivery Trends in Clinical Trials and Translational Medicine: Challenges and Opportunities in the Delivery of Nucleic Acid-Based Therapeutics », *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 100, n° 1, p. 38-52, janv. 2011, doi: 10.1002/jps.22243.
- [56] G. Dalwadi et V. B. Sunderland, « Purification of PEGylated Nanoparticles Using Tangential Flow Filtration (TFF) », *Drug Development and Industrial Pharmacy*, vol. 33, n° 9, p. 1030-1039, janv. 2007, doi: 10.1080/03639040601180143.
- [57] K. N. Bakeev, V. A. Izumrudov, A. B. Zezin, et V. A. Kabanov, « Kinetics and mechanism of reactions of the formation of polyelectrolytic complexes », *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, n° 299, p. 1405-1408, 1988.
- [58] M. Müller, B. Keßler, J. Fröhlich, S. Poeschla, et B. Torger, « Polyelectrolyte Complex Nanoparticles of Poly(ethyleneimine) and Poly(acrylic acid): Preparation and Applications », *Polymers*, vol. 3, n° 2, p. 762-778, avr. 2011, doi: 10.3390/polym3020762.
- [59] H.-Q. Mao *et al.*, « Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency », *Journal of Controlled Release*, vol. 70, n° 3, p. 399-421, févr. 2001, doi: 10.1016/S0168-3659(00)00361-8.
- [60] J. Malmo, H. Sörgård, K. M. Vårum, et S. P. Strand, « siRNA delivery with chitosan nanoparticles: Molecular properties favoring efficient gene silencing », *Journal of Controlled Release*, vol. 158, n° 2, p. 261-268, mars 2012, doi: 10.1016/j.jconrel.2011.11.012.

- [61] M. Huang, C.-W. Fong, E. Khor, et L.-Y. Lim, « Transfection efficiency of chitosan vectors: Effect of polymer molecular weight and degree of deacetylation », *Journal of Controlled Release*, vol. 106, n° 3, p. 391-406, sept. 2005, doi: 10.1016/j.jconrel.2005.05.004.
- [62] B. Lu, X.-D. Xu, X.-Z. Zhang, S.-X. Cheng, et R.-X. Zhuo, « Low Molecular Weight Polyethylenimine Grafted N -Maleated Chitosan for Gene Delivery: Properties and In Vitro Transfection Studies », *Biomacromolecules*, vol. 9, n° 10, p. 2594-2600, oct. 2008, doi: 10.1021/bm8004676.
- [63] J. C. Kasper, D. Schaffert, M. Ogris, E. Wagner, et W. Friess, « The establishment of an up-scaled micro-mixer method allows the standardized and reproducible preparation of well-defined plasmid/LPEI polyplexes », *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 77, n° 1, p. 182-185, janv. 2011, doi: 10.1016/j.ejpb.2010.11.012.
- [64] L. A. Davies *et al.*, « A Novel Mixing Device for the Reproducible Generation of Nonviral Gene Therapy Formulations », *BioTechniques*, vol. 49, n° 3, p. 666-668, sept. 2010, doi: 10.2144/000113498.
- [65] F. C. MacLaughlin *et al.*, « Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery », *Journal of Controlled Release*, vol. 56, n° 1-3, p. 259-272, déc. 1998, doi: 10.1016/S0168-3659(98)00097-2.
- [66] E. J. B. Nielsen *et al.*, « Pulmonary Gene Silencing in Transgenic EGFP Mice Using Aerosolised Chitosan/siRNA Nanoparticles », *Pharm Res*, vol. 27, n° 12, p. 2520-2527, déc. 2010, doi: 10.1007/s11095-010-0255-y.
- [67] J. F. A. Valente, P. Pereira, A. Sousa, J. A. Queiroz, et F. Sousa, « Effect of Plasmid DNA Size on Chitosan or Polyethyleneimine Polyplexes Formulation », *Polymers*, vol. 13, n° 5, p. 793, mars 2021, doi: 10.3390/polym13050793.
- [68] S. P. Strand, M. M. Issa, B. E. Christensen, K. M. Vårum, et P. Artursson, « Tailoring of Chitosans for Gene Delivery: Novel Self-Branched Glycosylated Chitosan Oligomers with Improved Functional Properties », *Biomacromolecules*, vol. 9, n° 11, p. 3268-3276, nov. 2008, doi: 10.1021/bm800832u.
- [69] E. A. Klausner, Z. Zhang, R. L. Chapman, R. F. Multack, et M. V. Volin, « Ultrapure chitosan oligomers as carriers for corneal gene transfer », *Biomaterials*, vol. 31, n° 7, p. 1814-1820, mars 2010, doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.10.031.
- [70] M. Köping-Höggård *et al.*, « Chitosan as a nonviral gene delivery system. Structure–property relationships and characteristics compared with polyethyleneimine in vitro and after lung administration in vivo », *Gene Ther*, vol. 8, n° 14, p. 1108-1121, juill. 2001, doi: 10.1038/sj.gt.3301492.
- [71] M. Lavertu, S. Méthot, N. Tran-Khanh, et M. D. Buschmann, « High efficiency gene transfer using chitosan/DNA nanoparticles with specific combinations of molecular weight and degree of deacetylation », *Biomaterials*, vol. 27, n° 27, p. 4815-4824, sept. 2006, doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.04.029.
- [72] S. P. Strand, S. Danielsen, B. E. Christensen, et K. M. Vårum, « Influence of Chitosan Structure on the Formation and Stability of DNA–Chitosan Polyelectrolyte Complexes », *Biomacromolecules*, vol. 6, n° 6, p. 3357-3366, nov. 2005, doi: 10.1021/bm0503726.
- [73] S. Nimesh, M. M. Thibault, M. Lavertu, et M. D. Buschmann, « Enhanced Gene Delivery Mediated by Low Molecular Weight Chitosan/DNA Complexes: Effect of pH and Serum », *Mol Biotechnol*, vol. 46, n° 2, p. 182-196, oct. 2010, doi: 10.1007/s12033-010-9286-1.
- [74] S. P. Strand, S. Lelu, N. K. Reitan, C. De Lange Davies, P. Artursson, et K. M. Vårum, « Molecular design of chitosan gene delivery systems with an optimized balance between polyplex stability and polyplex unpacking », *Biomaterials*, vol. 31, n° 5, p. 975-987, févr. 2010, doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.09.102.
- [75] M. Köping-Höggård *et al.*, « Improved chitosan-mediated gene delivery based on easily dissociated chitosan polyplexes of highly defined chitosan oligomers », *Gene Ther*, vol. 11, n° 19, p. 1441-1452, oct. 2004, doi: 10.1038/sj.gt.3302312.
- [76] P. L. Ma, M. Lavertu, F. M. Winnik, et M. D. Buschmann, « New Insights into Chitosan–DNA Interactions Using Isothermal Titration Microcalorimetry », *Biomacromolecules*, vol. 10, n° 6, p. 1490-1499, juin 2009, doi: 10.1021/bm900097s.
- [77] C. Zandanel, M. Noiray, et C. Vauthier, « Counterion of Chitosan Influences Thermodynamics of Association of siRNA with a Chitosan-Based siRNA Carrier », *Pharm Res*, vol. 37, n° 2, p. 22, févr. 2020, doi: 10.1007/s11095-019-2751-z.
- [78] J.-P. Behr, « The Proton Sponge: a Trick to Enter Cells the Viruses Did Not Exploit », *CHIMIA*, vol. 51, n° 1-2, Art. n° 1-2, févr. 1997, doi: 10.2533/chimia.1997.34.
- [79] R. Rattan, S. Vaidyanathan, G. S.-H. Wu, A. Shakya, B. G. Orr, et M. M. Banaszak Holl, « Polyplex-Induced Cytosolic Nuclease Activation Leads to Differential Transgene Expression », *Mol. Pharmaceutics*, vol. 10, n° 8, p. 3013-3022, août 2013, doi: 10.1021/mp400103f.

- [80] O. Zelphati et F. C. Szoka, « Mechanism of Oligonucleotide Release from Cationic Liposomes », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 93, n° 21, p. 11493-11498, 1996.
- [81] P. Paramasivam *et al.*, « Endosomal escape of delivered mRNA from endosomal recycling tubules visualized at the nanoscale », *Journal of Cell Biology*, vol. 221, n° 2, p. e202110137, févr. 2022, doi: 10.1083/jcb.202110137.
- [82] M. J. Mehta, H. J. Kim, S. B. Lim, M. Naito, et K. Miyata, « Recent Progress in the Endosomal Escape Mechanism and Chemical Structures of Polycations for Nucleic Acid Delivery », *Macromolecular Bioscience*, vol. 24, n° 4, p. 2300366, avr. 2024, doi: 10.1002/mabi.202300366.
- [83] Z.-T. Li *et al.*, « Chitosan-graft-polyethylenimine with improved properties as a potential gene vector », *Carbohydrate Polymers*, vol. 80, n° 1, p. 254-259, mars 2010, doi: 10.1016/j.carbpol.2009.11.021.
- [84] I. Richard, M. Thibault, G. De Crescenzo, M. D. Buschmann, et M. Lavertu, « Ionization Behavior of Chitosan and Chitosan–DNA Polyplexes Indicate That Chitosan Has a Similar Capability to Induce a Proton-Sponge Effect as PEI », *Biomacromolecules*, vol. 14, n° 6, p. 1732-1740, juin 2013, doi: 10.1021/bm4000713.
- [85] L. M. Bravo-Anaya, K. G. Fernández-Solís, J. Rosselgong, J. L. E. Nano-Rodríguez, F. Carvajal, et M. Rinaudo, « Chitosan-DNA polyelectrolyte complex: Influence of chitosan characteristics and mechanism of complex formation », *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 126, p. 1037-1049, avr. 2019, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.01.008.
- [86] S. Mao, O. Germershaus, D. Fischer, T. Linn, R. Schnepf, et T. Kissel, « Uptake and Transport of PEG-Graft-Trimethyl-Chitosan Copolymer–Insulin Nanocomplexes by Epithelial Cells », *Pharm Res*, vol. 22, n° 12, p. 2058-2068, déc. 2005, doi: 10.1007/s11095-005-8175-y.
- [87] M. Huang, E. Khor, et L.-Y. Lim, « Uptake and Cytotoxicity of Chitosan Molecules and Nanoparticles: Effects of Molecular Weight and Degree of Deacetylation », *Pharm Res*, vol. 21, n° 2, p. 344-353, févr. 2004, doi: 10.1023/B:PHAM.0000016249.52831.a5.
- [88] W. Liu *et al.*, « An investigation on the physicochemical properties of chitosan/DNA polyelectrolyte complexes », *Biomaterials*, vol. 26, n° 15, p. 2705-2711, mai 2005, doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.07.038.
- [89] A. S. Kritchenkov, S. Andranovits, et Y. A. Skorik, « Chitosan and its derivatives: vectors in gene therapy », *Russ. Chem. Rev.*, vol. 86, n° 3, p. 231-239, mars 2017, doi: 10.1070/RCR4636.
- [90] K. Bowman et K. W. Leong, « Chitosan nanoparticles for oral drug and gene delivery », *Int J Nanomedicine*, vol. 1, n° 2, p. 117-128, juin 2006.
- [91] W. T. Godbey, K. K. Wu, et A. G. Mikos, « Poly(ethylenimine)-mediated gene delivery affects endothelial cell function and viability », *Biomaterials*, vol. 22, n° 5, p. 471-480, mars 2001, doi: 10.1016/S0142-9612(00)00203-9.
- [92] F. Labat-Moleur *et al.*, « An electron microscopy study into the mechanism of gene transfer with lipopolyamines », *Gene Therapy*, vol. 3, n° 11, p. 1010-7, 1996.
- [93] P. L. Ma, M. Lavertu, F. M. Winnik, et M. D. Buschmann, « Stability and binding affinity of DNA/chitosan complexes by polyanion competition », *Carbohydrate Polymers*, vol. 176, p. 167-176, nov. 2017, doi: 10.1016/j.carbpol.2017.08.002.
- [94] V. Y. Grinberg *et al.*, « Chitosan polyplexes: Energetics of formation and conformational changes in DNA upon binding and release », *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 250, p. 126265, oct. 2023, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.126265.
- [95] T. Sato, T. Ishii, et Y. Okahata, « In vitro gene delivery mediated by chitosan. Effect of pH, serum, and molecular mass of chitosan on the transfection efficiency », *Biomaterials*, vol. 22, n° 15, p. 2075-2080, août 2001, doi: 10.1016/S0142-9612(00)00385-9.
- [96] P. Erbacher, S. Zou, T. Bettinger, A. Steffan, et J. Remy, « Chitosan-based vector/DNA complexes for gene delivery: biophysical characteristics and transfection ability », *Pharmaceutical Research*, vol. 15, n° 9, p. 1332-1339, 1998, doi: 10.1023/A:1011981000671.
- [97] B. Dos Santos Rodrigues, S. Lakkadwala, D. Sharma, et J. Singh, « Chitosan for gene, DNA vaccines, and drug delivery », in *Materials for Biomedical Engineering*, Elsevier, 2019, p. 515-550. doi: 10.1016/B978-0-12-818433-2.00015-7.
- [98] M. Thibault *et al.*, « Excess polycation mediates efficient chitosan-based gene transfer by promoting lysosomal release of the polyplexes », *Biomaterials*, vol. 32, n° 20, p. 4639-4646, juill. 2011, doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.03.010.
- [99] H. Yin, R. L. Kanasty, A. A. Eltoukhy, A. J. Vegas, J. R. Dorkin, et D. G. Anderson, « Non-viral vectors for gene-based therapy », *Nat Rev Genet*, vol. 15, n° 8, p. 541-555, août 2014, doi: 10.1038/nrg3763.

- [100] M. Garcia-Fuentes et M. J. Alonso, « Chitosan-based drug nanocarriers: Where do we stand? », *Journal of Controlled Release*, vol. 161, n° 2, p. 496-504, juill. 2012, doi: 10.1016/j.jconrel.2012.03.017.
- [101] B. Wang, C. He, C. Tang, et C. Yin, « Effects of hydrophobic and hydrophilic modifications on gene delivery of amphiphilic chitosan based nanocarriers », *Biomaterials*, vol. 32, n° 20, p. 4630-4638, juill. 2011, doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.03.003.
- [102] A. Domard, M. Rinaudo, et C. Terrassin, « New method for the quaternization of chitosan », *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 8, n° 2, p. 105-107, avr. 1986, doi: 10.1016/0141-8130(86)90007-3.
- [103] T. Kean, S. Roth, et M. Thanou, « Trimethylated chitosans as non-viral gene delivery vectors: Cytotoxicity and transfection efficiency », *Journal of Controlled Release*, vol. 103, n° 3, p. 643-653, avr. 2005, doi: 10.1016/j.jconrel.2005.01.001.
- [104] A. Jintapattanakit, S. Mao, T. Kissel, et V. B. Junyaprasert, « Physicochemical properties and biocompatibility of N-trimethyl chitosan: Effect of quaternization and dimethylation », *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 70, n° 2, p. 563-571, oct. 2008, doi: 10.1016/j.ejpb.2008.06.002.
- [105] X. Jiang, H. Dai, K. W. Leong, S. Goh, H. Mao, et Y. Yang, « Chitosan-g-PEG/DNA complexes deliver gene to the rat liver via intrabiliary and intraportal infusions », *The Journal of Gene Medicine*, vol. 8, n° 4, p. 477-487, avr. 2006, doi: 10.1002/jgm.868.
- [106] G. Maurstad, B. T. Stokke, K. M. Vårum, et S. P. Strand, « PEGylated chitosan complexes DNA while improving polyplex colloidal stability and gene transfection efficiency », *Carbohydrate Polymers*, vol. 94, n° 1, p. 436-443, avr. 2013, doi: 10.1016/j.carbpol.2013.01.015.
- [107] A. Guţoia et al., « Fine-tuned PEGylation of chitosan to maintain optimal siRNA-nanoplex bioactivity », *Carbohydrate Polymers*, vol. 143, p. 25-34, juin 2016, doi: 10.1016/j.carbpol.2016.01.010.
- [108] Y. K. Park et al., « Galactosylated chitosan-graft-dextran as hepatocyte-targeting DNA carrier », *Journal of Controlled Release*, vol. 69, n° 1, p. 97-108, oct. 2000, doi: 10.1016/S0168-3659(00)00298-4.
- [109] J. A. Edson, D. Ingato, S. Wu, B. Lee, et Y. J. Kwon, « Aqueous-Soluble, Acid-Transforming Chitosan for Efficient and Stimuli-Responsive Gene Silencing », *Biomacromolecules*, vol. 19, n° 5, p. 1508-1516, mai 2018, doi: 10.1021/acs.biomac.8b00170.
- [110] L. Li, F. Zhao, B. Zhao, J. Zhang, C. Li, et R. Qiao, « Chitosan Grafted with Phosphorylcholine and Macrocyclic Polyamine as an Effective Gene Delivery Vector: Preparation, Characterization and In Vitro Transfection », *Macromolecular Bioscience*, vol. 15, n° 7, p. 912-926, juill. 2015, doi: 10.1002/mabi.201400518.
- [111] S. V. Raik et al., « N-[4-(N,N,N-trimethylammonium)benzyl]chitosan chloride: Synthesis, interaction with DNA and evaluation of transfection efficiency », *Carbohydrate Polymers*, vol. 181, p. 693-700, févr. 2018, doi: 10.1016/j.carbpol.2017.11.093.
- [112] Y. Cao, Y. F. Tan, Y. S. Wong, M. W. J. Liew, et S. Venkatraman, « Recent Advances in Chitosan-Based Carriers for Gene Delivery », *Marine Drugs*, vol. 17, n° 6, p. 381, juin 2019, doi: 10.3390/md17060381.
- [113] H. A. Kim, K. Nam, et S. W. Kim, « Tumor targeting RGD conjugated bio-reducible polymer for VEGF siRNA expressing plasmid delivery », *Biomaterials*, vol. 35, n° 26, p. 7543-7552, août 2014, doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.05.021.
- [114] R. Fan et al., « Self-Assembled Bifunctional Peptide as Effective Drug Delivery Vector with Powerful Antitumor Activity », *Advanced Science*, vol. 4, n° 4, p. 1600285, avr. 2017, doi: 10.1002/advs.201600285.
- [115] Y.-M. Kim, S.-C. Park, et M.-K. Jang, « Targeted gene delivery of polyethyleneimine-grafted chitosan with RGD dendrimer peptide in $\alpha\beta 3$ integrin-overexpressing tumor cells », *Carbohydrate Polymers*, vol. 174, p. 1059-1068, oct. 2017, doi: 10.1016/j.carbpol.2017.07.035.
- [116] A. Jhaveri, P. Deshpande, B. Pattni, et V. Torchilin, « Transferrin-targeted, resveratrol-loaded liposomes for the treatment of glioblastoma », *Journal of Controlled Release*, vol. 277, p. 89-101, mai 2018, doi: 10.1016/j.jconrel.2018.03.006.
- [117] G.-W. Jeong et al., « Anticancer effect of gene/peptide co-delivery system using transferrin-grafted LMWSC », *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 488, n° 1-2, p. 165-173, juill. 2015, doi: 10.1016/j.ijpharm.2015.04.057.
- [118] Q. Zhu et al., « Low-density lipoprotein-coupled N-succinyl chitosan nanoparticles co-delivering siRNA and doxorubicin for hepatocyte-targeted therapy », *Biomaterials*, vol. 35, n° 22, p. 5965-5976, juill. 2014, doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.03.088.
- [119] Y. Cai, E. López-Ruiz, J. Wengel, L. B. Creemers, et K. A. Howard, « A hyaluronic acid-based hydrogel enabling CD44-mediated chondrocyte binding and gapmer oligonucleotide release for

- modulation of gene expression in osteoarthritis », *Journal of Controlled Release*, vol. 253, p. 153-159, mai 2017, doi: 10.1016/j.jconrel.2017.03.004.
- [120] E. Lallana *et al.*, « Chitosan/Hyaluronic Acid Nanoparticles: Rational Design Revisited for RNA Delivery », *Mol. Pharmaceutics*, vol. 14, n° 7, p. 2422-2436, juill. 2017, doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.7b00320.
- [121] T. H. Kim, J. W. Nah, M.-H. Cho, T. G. Park, et C. S. Cho, « Receptor-Mediated Gene Delivery into Antigen Presenting Cells Using Mannosylated Chitosan/DNA Nanoparticles », *J. nanosci nanotechnol*, vol. 6, n° 9, p. 2796-2803, sept. 2006, doi: 10.1166/jnn.2006.434.
- [122] S. Gao *et al.*, « Galactosylated low molecular weight chitosan as DNA carrier for hepatocyte-targeting », *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 255, n° 1-2, p. 57-68, avr. 2003, doi: 10.1016/S0378-5173(03)00082-6.
- [123] D. Chuan, T. Jin, R. Fan, L. Zhou, et G. Guo, « Chitosan for gene delivery: Methods for improvement and applications », *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 268, p. 25-38, juin 2019, doi: 10.1016/j.cis.2019.03.007.
- [124] P. Chan, M. Kurisawa, J. E. Chung, et Y.-Y. Yang, « Synthesis and characterization of chitosan-g-poly(ethylene glycol)-folate as a non-viral carrier for tumor-targeted gene delivery », *Biomaterials*, vol. 28, n° 3, p. 540-549, janv. 2007, doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.08.046.
- [125] K. Wong *et al.*, « PEI-g-chitosan, a Novel Gene Delivery System with Transfection Efficiency Comparable to Polyethylenimine in Vitro and after Liver Administration in Vivo », *Bioconjugate Chem.*, vol. 17, n° 1, p. 152-158, janv. 2006, doi: 10.1021/bc0501597.
- [126] X. Zhang, Y. Duan, D. Wang, et F. Bian, « Preparation of arginine modified PEI-conjugated chitosan copolymer for DNA delivery », *Carbohydrate Polymers*, vol. 122, p. 53-59, mai 2015, doi: 10.1016/j.carbpol.2014.12.054.
- [127] P. Garg *et al.*, « Triphenylamine coupled chitosan with high buffering capacity and low viscosity for enhanced transfection in mammalian cells, in vitro and in vivo », *J. Mater. Chem. B*, vol. 1, n° 44, p. 6053, 2013, doi: 10.1039/c3tb20939c.
- [128] T. H. Kim, J. E. Ihm, Y. J. Choi, J. W. Nah, et C. S. Cho, « Efficient gene delivery by urocanic acid-modified chitosan », *Journal of Controlled Release*, vol. 93, n° 3, p. 389-402, déc. 2003, doi: 10.1016/j.jconrel.2003.08.017.
- [129] L. Han, C. Tang, et C. Yin, « Enhanced antitumor efficacies of multifunctional nanocomplexes through knocking down the barriers for siRNA delivery », *Biomaterials*, vol. 44, p. 111-121, mars 2015, doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.12.020.
- [130] B. Shi, H. Zhang, Z. Shen, J. Bi, et S. Dai, « Developing a chitosan supported imidazole Schiff-base for high-efficiency gene delivery », *Polym. Chem.*, vol. 4, n° 3, p. 840-850, 2013, doi: 10.1039/C2PY20494K.
- [131] M. Wolfert et L. Seymour, « Chloroquine and amphipathic peptide helices show synergistic transfection in vitro », *Gene Ther.*, vol. 5, n° 3, p. 409-414, mars 1998, doi: 10.1038/sj.gt.3300606.
- [132] E. Wagner, « Application of membrane-active peptides for nonviral gene delivery », *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 38, n° 3, p. 279-289, août 1999, doi: 10.1016/S0169-409X(99)00033-2.
- [133] A. El Ouahabi, M. Thiry, V. Pector, R. Fuks, JM. Ruyschaert, et M. Vandenbranden, « The role of endosome destabilizing activity in the gene transfer process mediated by cationic lipids », *FEBS Letters*, vol. 414, n° 2, p. 187-192, sept. 1997, doi: 10.1016/S0014-5793(97)00973-3.
- [134] S. Mao, W. Sun, et T. Kissel, « Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA », *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 62, n° 1, p. 12-27, janv. 2010, doi: 10.1016/j.addr.2009.08.004.
- [135] S. Y. Chae, S. Son, M. Lee, M.-K. Jang, et J.-W. Nah, « Deoxycholic acid-conjugated chitosan oligosaccharide nanoparticles for efficient gene carrier », *Journal of Controlled Release*, vol. 109, n° 1-3, p. 330-344, déc. 2005, doi: 10.1016/j.jconrel.2005.09.040.
- [136] W. G. Liu *et al.*, « N-Alkylated Chitosan as a Potential Nonviral Vector for Gene Transfection », *Bioconjugate Chem.*, vol. 14, n° 4, p. 782-789, juill. 2003, doi: 10.1021/bc020051g.
- [137] F.-Q. Hu, M.-D. Zhao, H. Yuan, J. You, Y.-Z. Du, et S. Zeng, « A novel chitosan oligosaccharide-stearic acid micelles for gene delivery: Properties and in vitro transfection studies », *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 315, n° 1-2, p. 158-166, juin 2006, doi: 10.1016/j.ijpharm.2006.02.026.
- [138] F. Kong *et al.*, « Phosphorylatable short peptide conjugated low molecular weight chitosan for efficient siRNA delivery and target gene silencing », *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 422, n° 1-2, p. 445-453, janv. 2012, doi: 10.1016/j.ijpharm.2011.10.041.
- [139] M. Costalat, L. David, et T. Delair, « Reversible controlled assembly of chitosan and dextran sulfate: A new method for nanoparticle elaboration », *Carbohydrate Polymers*, vol. 102, p. 717-726, févr. 2014, doi: 10.1016/j.carbpol.2013.10.098.

- [140] H. Genedy, « Chitosan based nanoparticles for the delivery of micro-RNA for regeneration of the cardiac muscle », Université Claude Bernard Lyon 1, 2023.
- [141] D. Wu et T. Delair, « Stabilization of chitosan/hyaluronan colloidal polyelectrolyte complexes in physiological conditions », *Carbohydrate Polymers*, vol. 119, p. 149-158, mars 2015, doi: 10.1016/j.carbpol.2014.11.042.
- [142] W. Tiyaboonchai et N. Limpeanchob, « Formulation and characterization of amphotericin B–chitosan–dextran sulfate nanoparticles », *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 329, n° 1-2, p. 142-149, févr. 2007, doi: 10.1016/j.ijpharm.2006.08.013.
- [143] F. Costamagna, « Colloidal stability, intracellular fate and toxicology of drug nanocarriers – Application to polymerized micelles and organometallic nanogels », Université Paris-Saclay, 2020.
- [144] C. Schatz et S. Lecommandoux, « Polysaccharide-Containing Block Copolymers: Synthesis, Properties and Applications of an Emerging Family of Glycoconjugates », *Macromol. Rapid Commun.*, vol. 31, n° 19, p. 1664-1684, oct. 2010, doi: 10.1002/marc.201000267.
- [145] R. J. Ceresa, « The synthesis of block and graft copolymers of cellulose and its derivatives », *Polymer*, vol. 2, p. 213-219, janv. 1961, doi: 10.1016/0032-3861(61)90024-6.
- [146] G. Ziegast et B. Pfannemüller, « Phosphorolytic syntheses with di-, oligo- and multi- functional primers11Linear and Star-Shaped Hybrid Polymers, Part IV. For Part III, see ref. 1. », *Carbohydrate Research*, vol. 160, p. 185-204, févr. 1987, doi: 10.1016/0008-6215(87)80311-7.
- [147] K. Akiyoshi, M. Kohara, K. Ito, S. Kitamura, et J. Sunamoto, « Enzymatic synthesis and characterization of amphiphilic block copolymers of poly(ethylene oxide) and amylose », *Macromol. Rapid Commun.*, vol. 20, n° 3, p. 112-115, mars 1999, doi: 10.1002/(SICI)1521-3927(19990301)20:3<112::AID-MARC112>3.0.CO;2-Q.
- [148] K. Loos et A. H. E. Müller, « New Routes to the Synthesis of Amylose- block -polystyrene Rod–Coil Block Copolymers », *Biomacromolecules*, vol. 3, n° 2, p. 368-373, mars 2002, doi: 10.1021/bm0156330.
- [149] A. Douy et B. Gallot, « A new class of mesomorphic copolymers: Copolymers with a saccharide block and a peptide block », *Makromol. Chem.*, vol. 178, n° 5, p. 1595-1599, mai 1977, doi: 10.1002/macp.1977.021780530.
- [150] S. V. Lonikar, R. D. Gilbert, R. E. Fornes, et E. Stejskal, « Block copolymers of polysaccharides and polyamino acids », *Polym. Prep.*, n° 31, p. 640-641, 1990.
- [151] C. Feger et H.-J. Cantow, « Cellulose containing block copolymers: 1. synthesis of trimethylcellulose-(b-poly(oxytetramethylene))-star block copolymers », *Polymer Bulletin*, vol. 3-3, n° 8-9, 1980, doi: 10.1007/BF00283814.
- [152] K. Hashimoto, S. Imanishi, M. Okada, et H. Sumitomo, « Synthesis of block copolymer containing dextran and polyamide sequences », *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.*, vol. 30, n° 2, p. 211-220, févr. 1992, doi: 10.1002/pola.1992.080300205.
- [153] B.-G. Li et L.-M. Zhang, « Synthesis and characterization of novel amphiphilic block copolymers based on maltoheptaose and poly(ϵ -caprolactone) », *Carbohydrate Polymers*, vol. 74, n° 3, p. 390-395, nov. 2008, doi: 10.1016/j.carbpol.2008.03.009.
- [154] D. M. Haddleton et K. Ohno, « Well-Defined Oligosaccharide-Terminated Polymers from Living Radical Polymerization », *Biomacromolecules*, vol. 1, n° 2, p. 152-156, juin 2000, doi: 10.1021/bm005531u.
- [155] C. Houga, J.-F. L. Meins, R. Borsali, D. Taton, et Y. Gnanou, « Synthesis of ATRP-induced dextran-b-polystyrene diblock copolymers and preliminary investigation of their self-assembly in water », *Chem. Commun.*, n° 29, p. 3063, 2007, doi: 10.1039/b706248f.
- [156] S. Yagi, N. Kasuya, et K. Fukuda, « Synthesis and characterization of cellulose-b-polystyrene », *Polym J*, vol. 42, n° 4, p. 342-348, avr. 2010, doi: 10.1038/pj.2009.342.
- [157] T. Kakuchi *et al.*, « Glycoconjugated Polymer. 4. Synthesis and Aggregation Property of Well-Defined End-Functionalized Polystyrene with β -Cyclodextrin », *Macromolecules*, vol. 36, n° 11, p. 3909-3913, juin 2003, doi: 10.1021/ma021295z.
- [158] J. Lohmann, « Copolymères à blocs “hybrides” à base de xyloglucane et de polymère vinylique en combinant modification chimio-enzymatique et polymérisation radicalaire contrôlée », Université Joseph-Fourier, Grenoble, 2009.
- [159] O. S. Hernandez, G. M. Soliman, et F. M. Winnik, « Synthesis, reactivity, and pH-responsive assembly of new double hydrophilic block copolymers of carboxymethyl-dextran and poly(ethylene glycol) », *Polymer*, vol. 48, n° 4, p. 921-930, févr. 2007, doi: 10.1016/j.polymer.2006.12.036.
- [160] H. Kamitakahara, Y. Enomoto, C. Hasegawa, et F. Nakatsubo, « Synthesis of Diblock Copolymers With Cellulose Derivatives. 2. Characterization and Thermal Properties of Cellulose Triacetate-Block-Oligoamide-15 », *Cellulose*, vol. 12, n° 5, p. 527-541, oct. 2005, doi: 10.1007/s10570-005-7135-3.

- [161] C. Schatz, S. Louguet, J. Le Meins, et S. Lecommandoux, « Polysaccharide- *block* -polypeptide Copolymer Vesicles: Towards Synthetic Viral Capsids », *Angew Chem Int Ed*, vol. 48, n° 14, p. 2572-2575, mars 2009, doi: 10.1002/anie.200805895.
- [162] J. Ashenurst, « Reductive Amination », Master Organic Chemistry. Consulté le: 20 mars 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.masterorganicchemistry.com/2017/09/01/reductive-amination/>
- [163] R. F. Borch, M. D. Bernstein, et H. D. Durst, « Cyanohydrinborate anion as a selective reducing agent », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 93, n° 12, p. 2897-2904, juin 1971, doi: 10.1021/ja00741a013.
- [164] S. R. Maple et A. Allerhand, « Detailed tautomeric equilibrium of aqueous D-glucose. Observation of six tautomers by ultrahigh resolution carbon-13 NMR », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 109, n° 10, p. 3168-3169, mai 1987, doi: 10.1021/ja00244a063.
- [165] Y. Yang, K. Kataoka, et F. M. Winnik, « Synthesis of Diblock Copolymers Consisting of Hyaluronan and Poly(2-ethyl-2-oxazoline) », *Macromolecules*, vol. 38, n° 6, p. 2043-2046, mars 2005, doi: 10.1021/ma047439m.
- [166] W. T. E. Bosker, K. Ágoston, M. A. Cohen Stuart, W. Norde, J. W. Timmermans, et T. M. Slaghek, « Synthesis and Interfacial Behavior of Polystyrene–Polysaccharide Diblock Copolymers », *Macromolecules*, vol. 36, n° 6, p. 1982-1987, mars 2003, doi: 10.1021/ma020925u.
- [167] S. Belbekhouche, G. Ali, V. Dulong, L. Picton, et D. Le Cerf, « Synthesis and characterization of thermosensitive and pH-sensitive block copolymers based on polyetheramine and pullulan with different length », *Carbohydrate Polymers*, vol. 86, n° 1, p. 304-312, août 2011, doi: 10.1016/j.carbpol.2011.04.053.
- [168] F. Ganji et M. J. Abdekhodaie, « Synthesis and characterization of a new thermosensitive chitosan–PEG diblock copolymer », *Carbohydrate Polymers*, vol. 74, n° 3, p. 435-441, nov. 2008, doi: 10.1016/j.carbpol.2008.03.017.
- [169] R. Novoa-Carballal et A. H. E. Müller, « Synthesis of polysaccharide-b-PEG block copolymers by oxime click », *Chem. Commun.*, vol. 48, n° 31, p. 3781, 2012, doi: 10.1039/c2cc30726j.
- [170] T. Delas, « Formulation and stabilization of colloidal polyelectrolyte complexes of chitosan and siRNA », p. 272.
- [171] B. B. Breitenbach, I. Schmid, et P. R. Wich, « Amphiphilic Polysaccharide Block Copolymers for pH-Responsive Micellar Nanoparticles », *Biomacromolecules*, vol. 18, n° 9, p. 2839-2848, sept. 2017, doi: 10.1021/acs.biomac.7b00771.
- [172] O. Smidsrød, « Molecular basis for some physical properties of alginates in the gel state », *Faraday Discuss. Chem. Soc.*, vol. 57, n° 0, p. 263-274, 1974, doi: 10.1039/DC9745700263.
- [173] A. Solberg *et al.*, « Click chemistry for block polysaccharides with dihydrazide and dioxyamine linkers - A review », *Carbohydrate Polymers*, vol. 278, p. 118840, févr. 2022, doi: 10.1016/j.carbpol.2021.118840.
- [174] Y. A. Kwase, M. Cochran, et M. Nitz, « Protecting-Group-Free Glycoconjugate Synthesis: Hydrazide and Oxyamine Derivatives in N-Glycoside Formation », in *Modern Synthetic Methods in Carbohydrate Chemistry*, 1^{re} éd., D. B. Werz et S. Vidal, Éd., Wiley, 2013, p. 67-96. doi: 10.1002/9783527658947.ch3.
- [175] J. O. Edwards et R. G. Pearson, « The Factors Determining Nucleophilic Reactivities », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 84, n° 1, p. 16-24, janv. 1962, doi: 10.1021/ja00860a005.
- [176] T. Hansen, P. Vermeeren, F. M. Bickelhaupt, et T. A. Hamlin, « Origin of the α -Effect in S_N2 Reactions », *Angew Chem Int Ed*, vol. 60, n° 38, p. 20840-20848, sept. 2021, doi: 10.1002/anie.202106053.
- [177] I. V. Mo *et al.*, « Activation of enzymatically produced chitoooligosaccharides by dioxyamines and dihydrazides », *Carbohydrate Polymers*, vol. 232, p. 115748, mars 2020, doi: 10.1016/j.carbpol.2019.115748.
- [178] J. Ashenurst, « Nucleophilicity of Amines », Master Organic Chemistry. Consulté le: 20 mars 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.masterorganicchemistry.com/2018/05/07/nucleophilicity-of-amines/>
- [179] A. Solberg, I. V. Mo, F. L. Aachmann, C. Schatz, et B. E. Christensen, « Alginate-based diblock polymers: preparation, characterization and Ca-induced self-assembly », *Polym. Chem.*, vol. 12, n° 38, p. 5412-5425, 2021, doi: 10.1039/D1PY00727K.
- [180] K. Tømmeraas, M. Köping-Höggård, K. M. Vårum, B. E. Christensen, P. Artursson, et O. Smidsrød, « Preparation and characterisation of chitosans with oligosaccharide branches », *Carbohydrate Research*, vol. 337, n° 24, p. 2455-2462, nov. 2002, doi: 10.1016/S0008-6215(02)00334-8.

Chapitre 2 : Synthèse de copolysaccharides à blocs chitosane-*b*-dextrane

1. INTRODUCTION

Le chitosane et le dextrane sont deux polysaccharides couramment utilisés pour des applications biomédicales [1]. Le chitosane, biopolymère dérivé de la chitine, est composé d'unités 2-amino-2-désoxy-D-glucane (GlcN) et 2-acétamido-2-désoxy-D-glucane (GlcNAc) liées par des liaisons β -(1 \rightarrow 4). Le chitosane est connu pour sa biocompatibilité, sa biodégradabilité et sa bioactivité. Il a été largement utilisé dans des systèmes de délivrance de médicaments et de gènes, pour la cicatrisation des plaies cutanées, l'ingénierie tissulaire ainsi que comme revêtement pour des implants biomédicaux. Le chitosane se comporte en solution aqueuse comme une polybase faible avec une valeur de pK_a intrinsèque (pK_o) variant de 6,5 à 7,3, en fonction du degré d'acétylation (DA) [2]. A pH inférieur à 6, le chitosane est chargé positivement et possède donc des propriétés complexantes avec des polymères, des particules et des surfaces chargés négativement. Le dextrane, quant à lui, est un polysaccharide neutre de type PEG qui présente une excellente solubilité en milieu aqueux et une faible toxicité. Il s'agit d'un polymère linéaire composé d'unités D-glucose reliées par des liaisons α -(1 \rightarrow 6), avec un petit nombre de chaînes latérales composées de 1 ou 2 unités D-glucose principalement reliées par des liaisons α -(1 \rightarrow 3) aux unités de la chaîne principale. Le dextrane est souvent utilisé comme vecteur de médicaments, dans les applications d'imagerie ou encore comme expanseur de volume plasmatique. Les deux polysaccharides ont une conformation de chaîne différente. Le dextrane a une conformation de pelote en raison de ses liaisons glycosidiques α -(1 \rightarrow 6) flexibles. Cependant, il a été rapporté que dans les gammes de masses molaires faibles ($M < 2\ 000$ g/mol), les oligosaccharides de dextrane adoptent une conformation rigide [3]. Le chitosane est une molécule relativement rigide, principalement en raison des liaisons glycosidiques diéquatoriales dans sa conformation 4C_1 , qui restreignent la rotation des unités saccharidiques. De plus, sa rigidité est accentuée par les répulsions électrostatiques entre les unités chargées. Des longueurs de persistance de 0,4-1,8 nm ont été obtenues pour le dextrane [4],[5] et de 5-9 nm pour le chitosane [6],[7],[8].

L'objectif de ce travail est de synthétiser des copolymères à blocs linéaires à partir de chitosane et de dextrane afin de combiner les propriétés des deux blocs de polysaccharides au sein d'une seule chaîne polymère [9],[10]. La synthèse des copolysaccharides à blocs linéaires est difficile à réaliser en raison de la très faible disponibilité de la forme aldéhyde réactive de l'extrémité réductrice en équilibre avec sa forme hémiacétal cyclique ($< 0,005\%$ pour le glucose) [11],[12]. L'amination est une approche efficace pour modifier l'extrémité réductrice et donc pour fonctionnaliser l'extrémité de la chaîne des polysaccharides mais les taux d'amination généralement obtenus sont faibles. La stabilisation de l'intermédiaire imine par réduction permet cependant de déplacer la réaction dans le sens de l'amination, augmentant ainsi le rendement global de la réaction. Un agent réducteur couramment utilisé est le cyanoborohydrure de sodium ($NaBH_3CN$), qui est plus doux et sélectif que le borohydrure de sodium ($NaBH_4$). La vitesse de réduction des ions iminium avec $NaBH_3CN$ étant plus rapide que celle des aldéhydes, l'amination peut être réalisée en utilisant une approche "one-pot" dans laquelle l'agent réducteur est introduit au début de la réaction [13]. Cette approche, connue sous le nom d'amination réductrice, est efficace pour conjuguer de petits ligands aminés aux extrémités réductrices des polysaccharides, mais est moins efficace pour le couplage de blocs de polymères en raison de la faible probabilité de rencontre des extrémités des chaînes [14]. À cet égard, la chimie click basée sur la réaction

azoture-alcyne [15] ou la formation d'oximes [16] se sont révélées être bien plus efficaces que la simple amination pour la synthèse de copolymères à blocs contenant des polysaccharides.

Les dihydrazides et dioxyamines ont récemment été proposés comme agents de couplage efficaces pour lier des oligosaccharides tels que la chitine, le chitosane, le dextrane ou des oligogulonates via leurs extrémités réductrices [17],[18],[19],[20],[21]. Le dihydrazide adipique (ADH) et le dihydrochlorure d'O,O'-1,3-propanediylbishydroxylamine (PDHA), qui sont tous deux des réactifs commerciaux, ont été testés et comparés dans diverses réactions de couplage. Ces réactions ont été menées en conditions non réductrices, entraînant la formation de liaisons hydrazone et oxime mais également en présence d'un agent réducteur tel que NaBH_3CN ou le picoline borane pour obtenir des amines secondaires stables. La forte réactivité de l'hydrazide et de l'oxyamine avec les glucides réducteurs contraste avec celle de la plupart des amines primaires [22],[23],[24],[25]. Ceci est en lien avec la forte nucléophilie des groupes oxyamine et hydrazide qui résulte de « l'effet alpha » - une augmentation de l'énergie de la plus haute orbitale moléculaire occupée (HOMO) due à un recouvrement des orbitales des atomes voisins (en position alpha) ayant des paires d'électrons libres [26],[27]. En outre, la faible basicité de l'hydrazide et de l'oxyamine (pK_a entre 3 et 4) contribue à la formation d'imines plus stables en conditions acides [28]. Ceci est particulièrement intéressant dans le cas du chitosane, qui n'est soluble qu'en conditions légèrement acides. Contrairement à la chimie click azoture-alcyne comportant trois étapes car nécessitant préalablement la fonctionnalisation terminale de chaque bloc polysaccharide, la réaction de couplage avec l'ADH et le PDHA est réalisée en seulement deux étapes (Figure 1). De plus, cette chimie élimine la nécessité d'un catalyseur au cuivre, qui pourrait potentiellement interagir avec certains polysaccharides anioniques.

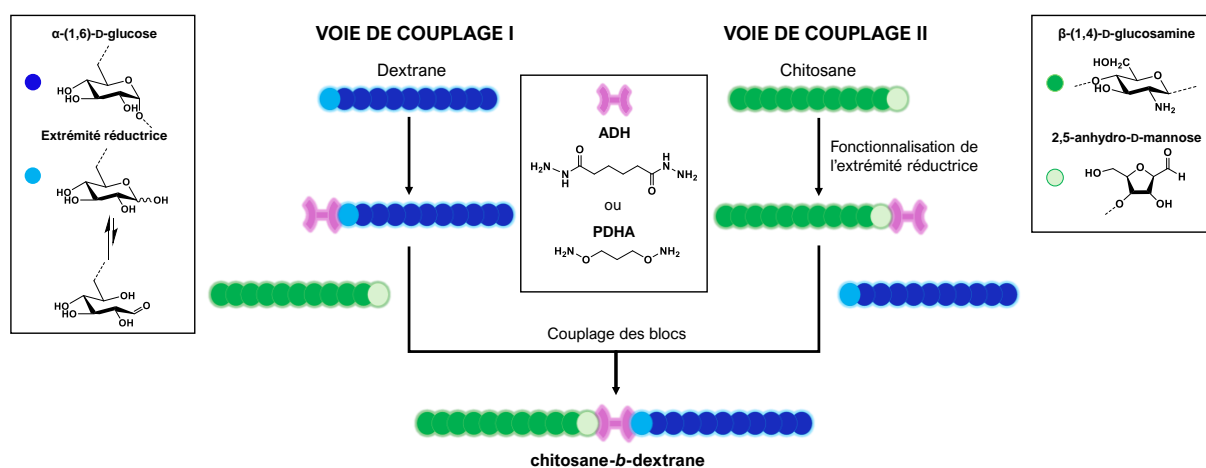


Figure 1. Schéma de la synthèse en deux étapes des copolysaccharides linéaires de type chitosane-*bloc*-dextrane.

Les études précédentes se sont principalement concentrées sur la fonctionnalisation terminale des oligomères de chitine avec l'ADH et le PDHA et les réactions de couplage ultérieures avec des oligosaccharides, tel que le dextrane, de faibles degrés de polymérisation ($\text{DP} \leq 5$), qui ont été préalablement fractionnés par chromatographie de filtration sur gel [18],[21]. Ceci a permis d'effectuer une caractérisation détaillée par RMN des divers copolymères synthétisés. Le but de ce chapitre est d'étendre cette méthode de couplage à des polysaccharides plus longs, en utilisant du chitosane et du dextrane de DP's relativement élevés. L'objectif est de définir la voie de synthèse optimale pour les

copolysaccharides chitosane-*b*-dextrane en termes de rendement et de pureté. Dans un premier temps, nous avons cherché à déterminer, entre l'ADH et le PDHA, la diamine la plus appropriée pour le couplage. Pour ce faire, la fonctionnalisation des extrémités réductrices des deux blocs de polysaccharides avec l'ADH et le PDHA a été étudiée, avec et sans agent réducteur. Ensuite, il s'agit de déterminer quel bloc de polysaccharide doit être préférentiellement pré-fonctionnalisé avec l'agent de couplage avant de le faire réagir avec le second bloc. Cela implique d'étudier individuellement chacune des quatre voies de couplage possibles présentées sur la Figure 1. Finalement, la voie de couplage la plus efficace a été appliquée à du chitosane et du dextrane avec des masses molaires relativement élevées - jusqu'à 14 000 g/mol pour le chitosane et 40 000 g/mol pour le dextrane. Après purification, les propriétés de solubilité des copolysaccharides à blocs ont été évaluées à différents pHs, ainsi que leur capacité à former des nanoparticules dans des conditions spécifiques.

2. SECTION EXPERIMENTALE

2.1. Matériels

Le chitosane (41 kg/mol, degré d'acétylation (DA) de 4%) a été obtenu auprès de Stellar Biosol (Gujarat, Inde, lot 144/090605) (Annexe S1 - Chapitre 2). Des dextrans de différentes masses molaires (5, 10, 20 kg/mol) ont été achetés chez Pharmacosmos. Le dextrane de 40 kg/mol provient de Fluka. Le dihydrazide adipique (ADH), le dihydrochlorure d'O,O'-1,3-propanediylbishydroxylamine (PDHA) et le cyanoborohydrure de sodium (NaBH_3CN) ont été achetés chez Sigma-Aldrich. Tous les autres produits chimiques ont été obtenus à partir de sources commerciales et étaient de qualité analytique.

2.2. Dépolymérisation du chitosane

Le chitosane de départ a été dépolymérisé par action du nitrite de sodium (NaNO_2) pour obtenir des chitosanes de plus faibles degrés de polymérisation (DP). La dépolymérisation a été effectuée selon des protocoles préétablis auxquels quelques modifications ont été apportées [17],[21],[29],[30],[31]. En résumé, du chitosane (41 kg/mol, DA 4%) a été dissous à une concentration de 2,5 g/L dans de l'eau milli-Q à laquelle a été ajoutée la quantité stœchiométrique de HCl par rapport aux fonctions amines. Un excès de 10% a été ajouté pour assurer la protonation complète des unités glucosamine. La solution est agitée pendant une nuit. Diverses quantités de NaNO_2 ont été ajoutées de sorte que le rapport molaire $[\text{GlcN}]/[\text{NaNO}_2]$ varie de 7 à 57. La solution est restée sous agitation une nuit à température ambiante puis, a été filtrée sur une membrane en fibre de verre de 1 μm de porosité pour éliminer les particules insolubles. Le chitosane a ensuite été précipité par addition d'un volume de mélange $\text{MeOH}:\text{NH}_3$ (1:1) à 2,5 volumes de solution de chitosane. Le milieu a été centrifugé (15 min, 6 000 x g) à température ambiante et les culots ont été lavés à l'eau. Cette procédure a été répétée plusieurs fois jusqu'à ce que le pH du surnageant soit neutre. À ce stade, certaines fractions de chitosane de faible DP (< 20) ont pu être perdues en raison de leur solubilité à pH neutre [29]. Le chitosane dépolymérisé a finalement été récupéré par lyophilisation. Les valeurs de DP mentionnées incluent toujours l'unité terminale 2,5-anhydro-D-mannose (unité M).

2.3. Fonctionnalisation terminale du dextrane par l'ADH et le PDHA

Le dextrane a été dissous à une concentration de 60 g/L en tampon acétate 500 mM pH 4,0 et laissé au moins 2 heures sous agitation à température ambiante. 20 équivalents d'ADH ou de PDHA par rapport au nombre de moles de l'extrémité réductrice du dextrane ont été dissous dans un volume minimal de tampon. Le pH a été vérifié et ajusté à 4,0 si nécessaire. La solution d'ADH ou de PDHA a ensuite été ajoutée à la solution de dextrane et la réaction laissée sous agitation pendant 12 heures à température ambiante. Pour l'étape de réduction (si nécessaire), 10 eq. de cyanoborohydrure de sodium (NaBH_3CN) ont été dissous dans un volume minimal de tampon et ajoutés à la solution de dextrane/ADH. La réaction est effectuée sous agitation pendant une nuit à température ambiante. Pour le dextrane/PDHA, 2 x 10 eq. de NaBH_3CN ont été ajoutés à des intervalles de 12 heures. Les dextrans fonctionnalisés, réduits ou non, ont été précipités dans un excès (x 20) d'éthanol technique à température ambiante. Les solutions ont été centrifugées (15 minutes, 6 000 x g) à température ambiante. Les surnageants ont été éliminés et les culots ont été séchés sous vide dynamique pendant 4 heures à température ambiante. Les culots secs ont ensuite été dissous dans de l'eau milli-Q et ultrafiltrés 3 fois consécutives avec 300 mL d'eau à l'aide d'une cellule Amicon avec une membrane en cellulose de seuil de coupure de 1 kDa. Finalement, les dextrans fonctionnalisés ont été récupérés par lyophilisation.

2.4. Fonctionnalisation terminale du chitosane par l'ADH et le PDHA

Le chitosane a été dissous à une concentration de 20 g/L dans de l'eau milli-Q contenant la quantité stœchiométrique de HCl par rapport aux fonctions amine et laissé sous agitation pendant une nuit. Le pH a ensuite été vérifié et ajusté à 4,0. 20 équivalents d'ADH ou de PDHA, par rapport au nombre de moles de l'extrémité réductrice du chitosane, ont été dissous dans un volume minimal d'eau. Le pH a été vérifié et ajusté à 4,0, si nécessaire, avant d'être ajouté à la solution de chitosane. La réaction est effectuée sous agitation pendant 12 heures à température ambiante. Pour l'étape de réduction (si nécessaire), 10 eq. de NaBH_3CN dissous dans un minimum d'eau ont été ajoutés à la solution de chitosane/ADH et laissés sous agitation pendant une nuit à température ambiante. Pour le chitosane/PDHA, 3 x 10 eq. de NaBH_3CN ont été ajoutés à des intervalles de 12 heures. Le chitosane fonctionnalisé a été précipité par addition d'un volume de mélange $\text{MeOH}:\text{NH}_3$ (1:1) à 5 volumes de solution de chitosane. Le milieu a été centrifugé (15 min, 6 000 x g) à température ambiante et les culots ont été lavés à l'eau puis à nouveau centrifugés. La procédure a été répétée jusqu'à ce que le pH du surnageant soit neutre. Le chitosane fonctionnalisé a été récupéré par lyophilisation.

2.5. Synthèse de copolysaccharides à blocs linéaires chitosane-b-dextrane

Les réactions de couplage ont été réalisées en faisant réagir le dextrane fonctionnalisé avec le chitosane ou en faisant réagir le chitosane fonctionnalisé avec le dextrane. Dans les deux cas, le chitosane (ou le chitosane-ADH/PDHA) a été dissous à une concentration de 20 g/L dans de l'eau milli-Q avec la quantité stœchiométrique de HCl par rapport aux fonctions amine et agité pendant une nuit. Le pH de la solution a été vérifié et ajusté à 4,0. Ensuite, 3 équivalents de dextrane-ADH/PDHA (ou dextrane) ont été dissous dans l'eau et le pH également ajusté à 4,0 avant d'être ajoutés à la solution de chitosane et laissés sous agitation pendant 12 heures à température ambiante. Pour l'étape de réduction (si nécessaire), 10 eq. de NaBH_3CN ont été dissous dans un volume minimal d'eau et ajoutés au mélange

réactionnel. La réaction est effectuée sous agitation pendant une nuit à température ambiante. Pour les réactions de couplage impliquant le PDHA, 5 x 10 eq. de NaBH₃CN ont été ajoutés à des intervalles de 24 heures. Les copolysaccharides ont été précipités par augmentation du pH au-delà de 10 avec du NaOH 1 M. Les solutions ont été centrifugées (30 minutes, 10 000 x g) à température ambiante. Le surnageant contenant l'excès de dextrane-ADH/PDHA (ou de dextrane) a été éliminé et les culots contenant les copolysaccharides ont été lavés une fois avec de l'eau puis à nouveau centrifugés. Il n'est pas recommandé de laver plusieurs fois les culots pour éviter l'extraction des copolymères dans le surnageant (Figure S4 – Chapitre 2). Les copolysaccharides ont finalement été récupérés par lyophilisation. Concernant le copolysaccharide obtenu à partir des plus longs blocs de polysaccharides testés (Chit₉₀ et Dext₁₅₂), l'étape de couplage a été réalisée dans des conditions similaires mais à une température plus élevée en raison de la viscosité relativement élevée du mélange réactionnel. Trois équivalents de Dext₁₅₂-PDHA sous sa forme réduite ont été ajoutés à un équivalent de Chit₉₀ et la réaction conduite une nuit à 50°C. L'étape de réduction a été réalisée à température ambiante en ajoutant 5 x 10 équivalents de NaBH₃CN à des intervalles de 24 heures.

2.6. Purification des copolysaccharides à blocs linéaires

L'excès de chitosane libre a été séparé des copolysaccharides à blocs par précipitation sélective à un pH défini. Les copolysaccharides de composition variable en chitosane et en dextrane ont été dispersés à une concentration de 5 g/L dans de l'eau milli-Q. Le pH a ensuite été ajusté à 6,5 ± 0,1. Les solutions ont été agitées à température ambiante pendant au moins 24 heures. Le pH a été vérifié et réajusté à 6,5 ± 0,1 si nécessaire. Les solutions ont été centrifugées (30 min, 10 000 x g) à température ambiante. Les culots contenant principalement du chitosane libre ont été éliminés. Les surnageants ont été recueillis et lyophilisés afin de récupérer les copolysaccharides purifiés.

2.7. Synthèse de copolysaccharides greffés dextrane-*g*-chitosane

Le chitosane (41 kg/mol, DA 4%) a été dissous à 5 g/L en tampon d'acétate (500 mM, pH 4,0) et laissé sous agitation pendant une nuit. Du dextrane (10 kg/mol) a été ajouté à la solution de chitosane et la réaction effectuée sous agitation pendant 2 heures. Le nombre d'équivalents de dextrane par rapport aux fonctions amines du chitosane a été ajusté, variant de 1:12 à 1:3. 10 eq. de NaBH₃CN ont été quotidiennement ajoutés pendant 15 jours. La solution finale a été dialysée contre l'eau à l'aide d'une membrane de cellulose régénérée avec un seuil de coupure de 3,5 kDa. Les copolysaccharides greffés ont été récupérés par lyophilisation.

2.8. Chromatographie d'exclusion stérique (SEC)

Les analyses par SEC ont été effectuées à 25°C à l'aide d'un système Ultimate 3000 de chez ThermoFisher Scientific équipé d'un détecteur à barrettes de diodes (DAD). Le système comprend un détecteur à diffusion de lumière multi-angles (MALS) (HELEOS II, Wyatt) et un réfractomètre différentiel (Optilab T-rEX, Wyatt). Les polysaccharides fonctionnalisés en bout de chaîne et les copolysaccharides à blocs linéaires ont été séparés sur des colonnes TSKgel G3000PWXL et TSKgel G4000PWXL (300 mm × 7,8 mm) de chez TOSOH, couvrant une gamme de masses molaires allant de 200 g/mol à 300 000 g/mol. Les copolysaccharides greffés ont été séparés sur des colonnes TSKgel

G5000PWXL et TSKgel G6000PWXL (300 mm × 7,8 mm), couvrant une gamme de 4 000 g/mol à 8 000 000 g/mol. Pour la purification des copolysaccharides à blocs par SEC, une colonne semi-préparative Shodex OHpak SB-2003 (300 mm x 20 mm) couvrant une gamme de 1 000 à 100 000 g/mol a été utilisée et les fractions ont été collectées à l'aide d'un collecteur de fractions Ultimate 3000 (conditions expérimentales décrites Annexe S6 – Chapitre 2). Un tampon acétate de sodium (0,2 M AcOH/0,15 M AcONa, pH 4,5) a été systématiquement utilisé comme éluant à un débit de 0,6 mL/min. Toutefois, pour réduire les interactions potentielles avec la phase stationnaire en conditions acides, les conjugués dextrane-ADH/PDHA ont également été analysés en tampon phosphate 0,01 M à pH 9 + 0,1 M NaNO₃ à un débit de 0,6 ml/min, en utilisant les colonnes SHODEX OHpak SB-803 et SB-804 (300 mm × 8 mm) couvrant une gamme de masses molaires de 1 000 g/mol à 400 000 g/mol. Tous les échantillons ont été systématiquement filtrés sur une membrane d'acétate de cellulose de 0,45 µm de porosité avant injection. Les chromatogrammes ont été acquis avec le logiciel Chromeleon 7.2. Les données ont été analysées avec le logiciel Astra 7.1.0. Les valeurs d'indice de réfraction (dn/dc en mL/g) ont été déterminées pour chaque bloc de polysaccharide et copolysaccharide à partir d'une gamme de six concentrations en utilisant le même réfractomètre différentiel Optilab reX que celui utilisé pour la SEC. Les mesures ont été effectuées dans les mêmes conditions que pour la SEC-MALS, à l'exception du fait que le tampon n'a pas été dégazé et que les échantillons n'ont pas été filtrés avant l'analyse.

2.9. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

La caractérisation structurale des conjugués chitosane/dextrane et des copolymères a été réalisée par spectroscopie RMN ¹H à 298 K sur un spectromètre Bruker AVANCE III HD 400 MHz en utilisant une sonde directe multinucléaire Bruker à gradient z de 5 mm. Le copolymère basé sur les blocs de chitosane et de dextrane les plus longs a été analysé sur un spectromètre Bruker AVANCE NEO 400 MHz (voir ci-dessous). Les échantillons ont été dissous à 10 mg/mL dans le D₂O et ajustés à différents pHs avec du DCl 1,17 M. Le pH-mètre ayant été étalonné avec des tampons non deutérés, la valeur lue sur le pH-mètre (pH*) a été convertie en pD, c'est-à-dire en pH réel, à l'aide de la formule suivante : $pD = pH^* + 0,4$ [32]. Les spectres RMN ¹H ont été calibrés à partir du signal de HOD à 4,81 ppm. Les études cinétiques de fonctionnalisation du dextrane et du chitosane ont été réalisées dans des solvants deutérés à 298 K sur un spectromètre Bruker AVANCE NEO 400 MHz, équipé d'une cryosonde Bruker BBO Prodigy de 5 mm. Le dextrane a été solubilisé dans 500 mM d'acide acétique-d₄ et la solution a été ajustée à pH 4 avec du NaOD. Le chitosane a été solubilisé dans du D₂O et la solution a été ajustée à un pH de 4 avec du DCl. La concentration en polymère a été fixée à 20 g/L dans les deux cas. Les acquisitions ont débuté immédiatement après l'ajout de l'ADH/PDHA dans la solution de dextrane ou de chitosane dans les conditions décrites ci-dessus. Les réactions ont ensuite été suivies dans le même tube RMN pendant 24 heures, par acquisition de spectres toutes les heures. Les données ont été modélisées à partir d'un modèle cinétique de pseudo-premier ordre décrit dans la littérature [18],[21]. Les analyses DOSY (Diffusion Ordered Spectroscopy) ont été effectuées à 298K sur un spectromètre Bruker Avance III 400 fonctionnant à 400,33 MHz et équipé d'une tête de cryosonde directe à gradient z multinucléaire Bruker de 5 mm capable de produire des gradients dans la direction z avec une force de 53,5 G cm⁻¹. Chaque échantillon a été dissous dans 0,4 mL d'eau deutérée et la rotation a été utilisée pour minimiser les effets de convection. Les spectres DOSY ont été acquis avec le programme

d'impulsion ledbpgp2s du logiciel Bruker Topspin. La durée des gradients d'impulsion et le temps de diffusion ont été ajustés afin d'obtenir une atténuation complète des signaux à 95% de l'intensité maximale du gradient. Les valeurs étaient de 3,6 ms pour la durée des impulsions de gradient et de 100 ms pour le temps de diffusion. L'intensité du gradient a été augmentée linéairement en 16 étapes de 5% à 95% de l'intensité maximale du gradient. Un délai de 3 s entre les échos a été utilisé. Les données ont été traitées en utilisant 8 192 points dans la dimension F2 et 128 points dans la dimension F1 avec le logiciel Bruker Topspin. L'étalonnage du gradient de champ a été réalisé à 25°C en utilisant le coefficient d'autodiffusion de H₂O + D₂O à $19,0 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$.

2.10. Analyse thermogravimétrique (ATG)

Les analyses thermogravimétriques ont été effectuées à l'aide d'un instrument Q50 (TA Instruments) afin d'évaluer la stabilité en température des chitosanes et de déterminer leur teneur en eau. Les analyses ont été effectuées de 25 à 150°C avec une rampe de température de 2°C/min sous un flux d'azote.

2.11. Analyse de diffusion de la lumière

La solubilité du chitosane et des copolysaccharides dans l'eau à différents pHs a été évaluée par des mesures de diffusion de la lumière (LS). Des solutions de chitosane et de copolysaccharides préparées à 2 g/L dans de l'eau milli-Q ont été ajustées à différents pHs avec du NaOH 0,1 M. L'intensité diffusée (DCR, en kcps) a été déterminée à 25°C à l'aide d'un ZetaSizer Nano ZS (Malvern Panalytical Ltd, Malvern, UK) fonctionnant à $\lambda = 632,8 \text{ nm}$ avec le détecteur placé à 173° (rétro-diffusion).

2.12. Formation de nanoparticules de copolysaccharides par nanopréciipitation

Les copolysaccharides ont été dissous à 1 g/L dans de l'eau milli-Q et les solutions ont été ajustées à pH 4,0. 50 μL de la solution de copolysaccharides ont été ajoutés à 450 μL de tampon MOPS 50 mM, pH 7,4 contenant 100 mM de NaCl. L'ajout a été effectué en conditions de mélange rapide. La solution est agitée pendant une heure, puis analysée par diffusion dynamique de la lumière à 25°C à l'aide d'un ZetaSizer Nano ZS, comme décrit ci-dessus. 10 mesures de 10 secondes ont été effectuées pour chaque échantillon et l'analyse répétée trois fois. L'évolution de la taille des particules a été suivie pendant 72 heures.

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Préparation et caractérisation du chitosane

Les chitosanes de différents DPs ont été obtenus par dépolymérisation d'un chitosane faiblement acétylé (DA 4%) par action du nitrite de sodium selon la méthode d'Allan et Peyron (Figure 2) [33]. L'acide nitreux initie le clivage des liaisons 2-amino-2-désoxy-D-glucosidiques par nitrosation des groupes aminés, ce qui entraîne l'élimination de diazote avec la contraction du cycle de la D-glucosamine en unité 2,5-anhydro-D-mannose, désignée comme l'unité M ci-après [34]. Après précipitation en conditions alcalines et purification, les chitosanes ont été récupérés avec de bons rendements massiques (> 70 %) sous leur forme neutre.

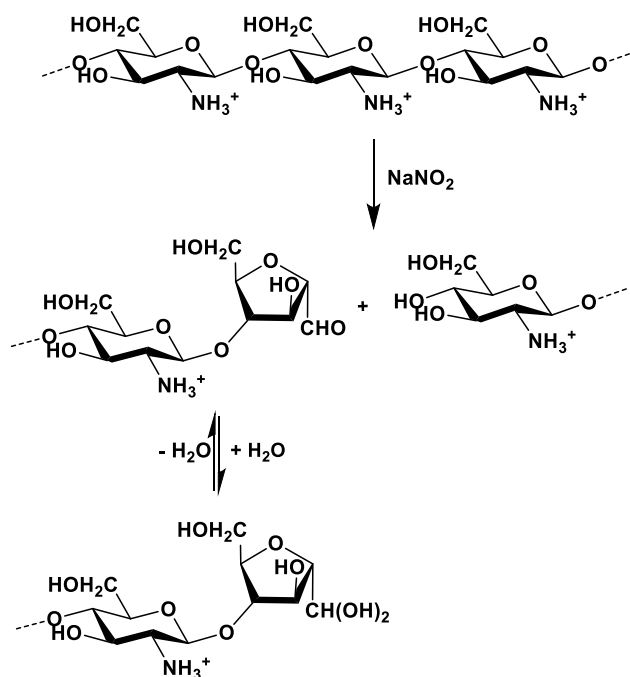


Figure 2. Dépolymérisation d'une chaîne de chitosane par action du nitrite de sodium. L'aldéhyde de l'extrémité réductrice 2,5-anhydro-D-mannose (unité M) est principalement sous sa forme hydratée (diol géminé).

La structure du chitosane a été analysée par RMN ^1H (Figure 3). Le DP a été déterminé à partir du rapport de l'intégral des protons H_2 des unités GlcN et des protons $\text{H}_{3\text{M}}$ de l'unité M terminale situés, respectivement, à 3,20 ppm et 4,46 ppm. Les valeurs de DP ont été ajustées d'une unité pour tenir compte de l'unité M.

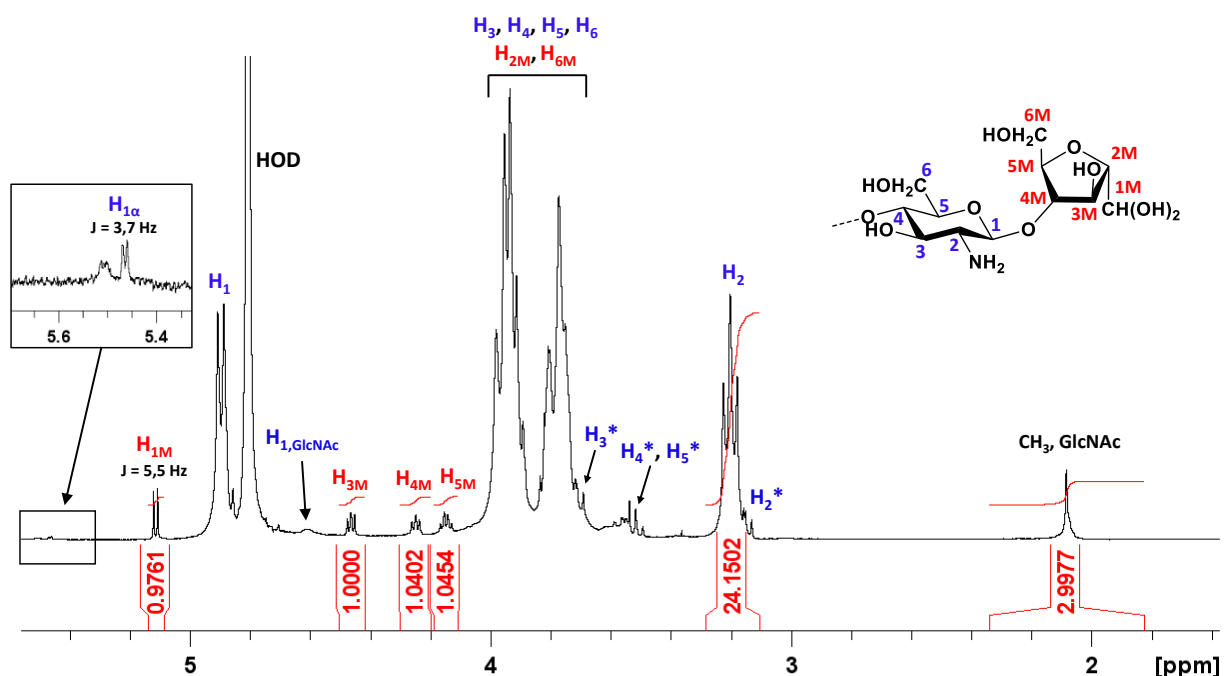


Figure 3. Spectre RMN ^1H du Chit₂₅ dans le D₂O à pH 4,0 (H* : protons de l'unité GlcN à l'extrémité non réductrice). Voir Coudurier *et coll.* [17] et Tømmerås *et coll.* [31] pour l'attribution des pics.

L'analyse par SEC-MALS a montré que les chitosanes obtenus ont des distributions de masse molaire relativement étroites associées à des dispersités (\mathfrak{D}) inférieures à 1,5 (Figure 4). Dans l'ensemble, il y a une bonne concordance entre les valeurs de DP déterminées par SEC-MALS et par RMN dans la gamme étudiée (Tableau 1). Ci-après, les blocs de chitosane seront abrégés Chit_n, *n* représentant la valeur du DP obtenu par RMN.

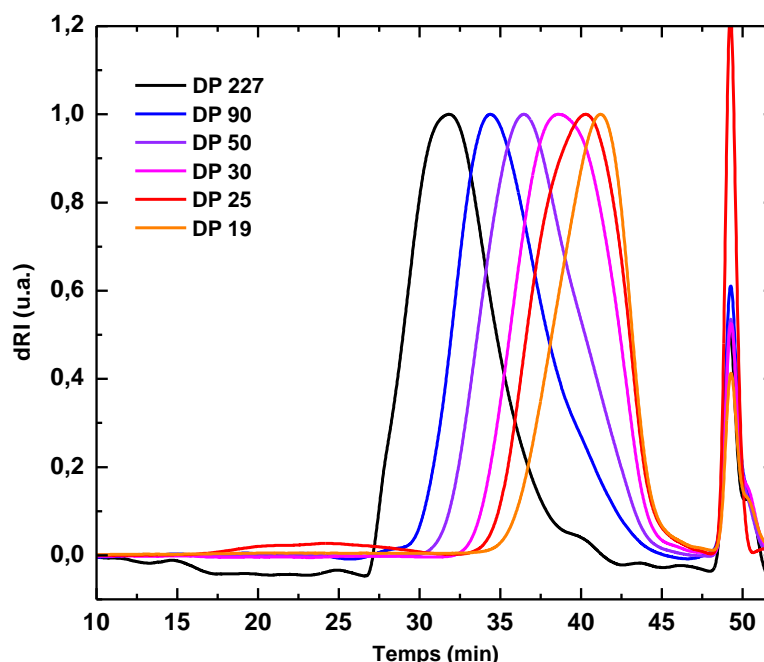


Figure 4. Chromatogrammes SEC (signal dRI) des chitosanes de différents DP en tampon acétate pH 4,5. Les chromatogrammes ont été normalisés par leur intensité maximale.

Tableau 1. Caractérisation des chitosanes par RMN ^1H , SEC-MALS et ATG.

Nom	M_n (g/mol)	M_w (g/mol)	\mathfrak{D}	dn/dc ^a	DP	DP	Teneur en eau
	(SEC)	(SEC)					
Chit ₂₅₂	41 000	68 600	1,64	0,1876	252	-	7,9
Chit ₉₀	15 000	23 100	1,54	0,1873	92	90	7,6
Chit ₅₀	7 800	10 100	1,30	0,1858	48	50	10,2
Chit ₃₀	5 100	6 500	1,27	0,1890	31	30	4,5
Chit ₂₅	4 300	5 600	1,31	0,1912	23	25	5,0
Chit ₁₉	3 200	3 700	1,17	-	20	19	9,8

^a analyse en tampon d'acétate pH 4,5

^b déterminé par TGA à 150°C

La représentation du DP en fonction du rapport molaire GlcN/NaNO₂ est linéaire, ce qui indique que la réaction de dépolymérisation est stœchiométrique par rapport à la quantité de NaNO₂ (Figure 5). L'analyse thermogravimétrique des chitosanes a révélé que la dégradation thermique, qui procède par clivage des liaisons glycosidiques [35] se produit à des températures d'autant plus basses que le DP est faible (Figure 6). La température de dégradation, même pour le chitosane ayant le DP le plus bas (Chit₁₉), est toujours supérieure à 150°C et donc compatible avec la plupart des applications.

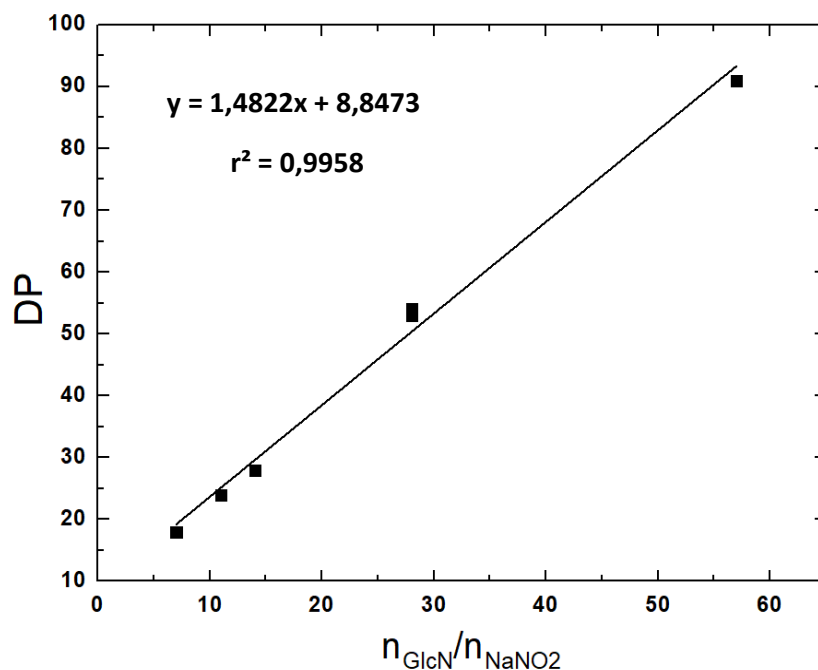


Figure 5. Degrés de polymérisation (DP) des chitosanes déterminés par RMN ^1H en fonction du rapport molaire initial GlcN/NaNO₂.

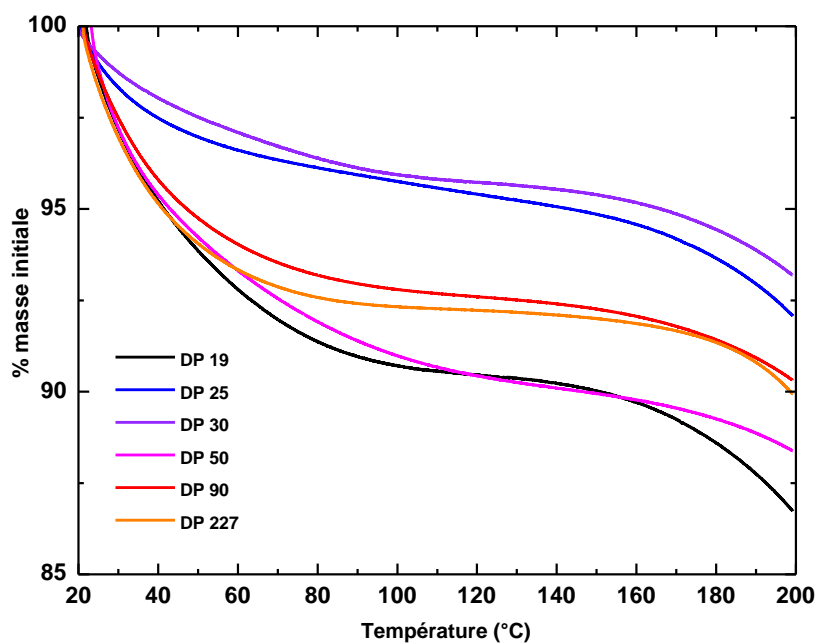


Figure 6. Analyses thermogravimétriques des chitosanes de différents DPs à 2°C/min sous flux d'azote.

L'unité M, générée par dépolymérisation du chitosane avec du nitrite de sodium, est particulièrement intéressante pour la formation d'hydrazones et d'oximes, car le groupe aldéhyde n'est pas impliqué dans les hémiacétals intramoléculaires comme c'est le cas pour une extrémité réductrice normale. Seule la forme hydratée de l'aldéhyde, le diol géminé, a pu être détectée sur les spectres RMN dans le D₂O à 5,11 ppm ($J = 5,5$ Hz) (Figure 3). En raison de sa grande réactivité face aux attaques nucléophiles, l'unité M est susceptible de former une base de Schiff avec les fonctions amine primaire des glucosamines, donnant lieu à des structures *self-branchées* [36],[37]. La base de Schiff peut également initier un

mécanisme de dégradation conduisant au clivage de la chaîne avec la formation de 5-hydroxyméthylfurfural (HMF) [31]. La formation de la base de Schiff est favorisée en conditions neutres/basiques, tandis que la dégradation en HMF est catalysée en milieu acide. L'analyse RMN ^1H du Chit₂₅ à pH 5,5 a révélé la présence de quantités infimes de protons imino (-CH=N-) à 8,1 ppm [31], qui résultent probablement de l'étape de purification lorsque le chitosane a été précipité en conditions alcalines (Figure 7). A un pH inférieur à 4,0, les groupes imine n'ont plus été détectés, mais la formation de HMF a pu être observée (Figure 7) [29],[31]. Cependant, même à pH 1,0, la quantité de HMF était négligeable (< 2%), ce qui indique que l'unité M est presque totalement disponible pour les réactions de couplage ultérieures. La précipitation du chitosane en conditions alcalines ayant été effectuée rapidement, il est probable que cela ait empêché de manière significative la formation de bases de Schiff et leur dégradation ultérieure en HMF en conditions acides.

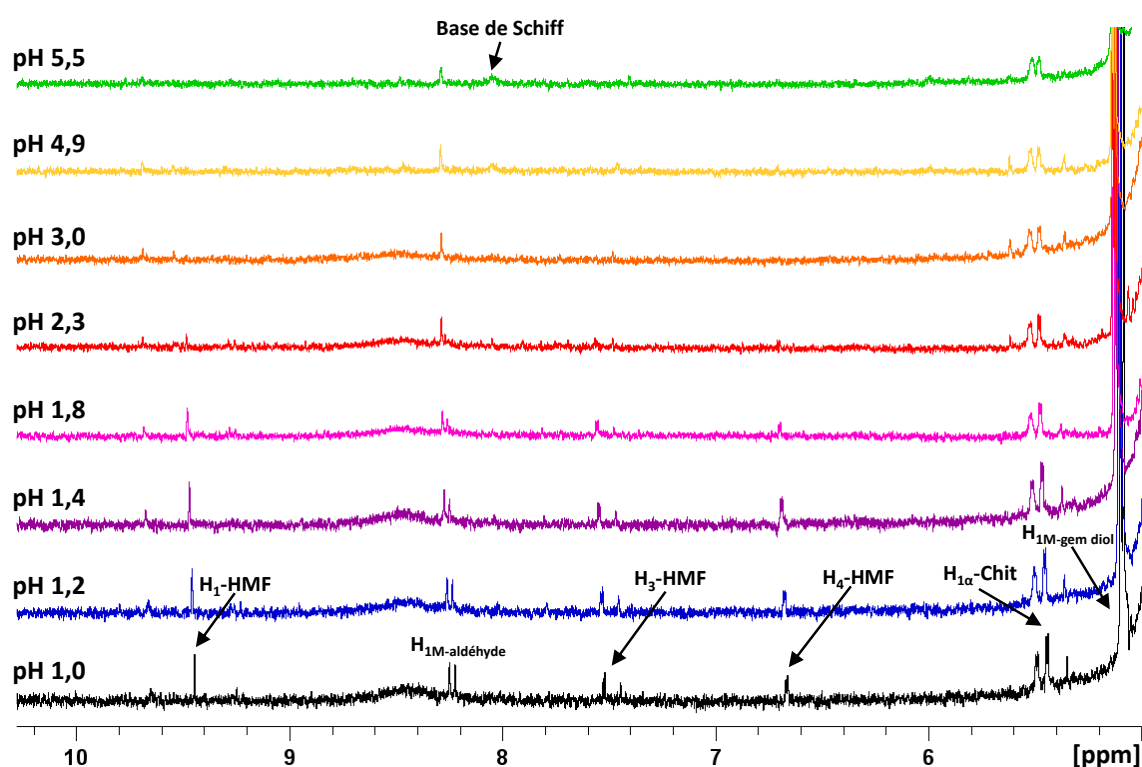


Figure 7. Analyse RMN ^1H du chitosane à différents pHs. Une solution de Chit₂₅ à 10 g/L dans le D₂O a été acidifiée par ajouts successifs de DCl. Les pics de faible intensité à ~ 8.2 ppm ont été attribués à la forme aldéhyde de l'unité M qui peut également être présente en faible quantité [29].

Il est également important de noter que la stabilité du chitosane dépend des conditions de stockage. L'analyse RMN à pH 4,5 révèle une libération significative de HMF (6%) dans le chitosane stocké 6 mois à température ambiante ou à 4°C (Figure 8). Cependant, aucun changement observable n'est noté pour le chitosane stocké 2 ans à -20°C.

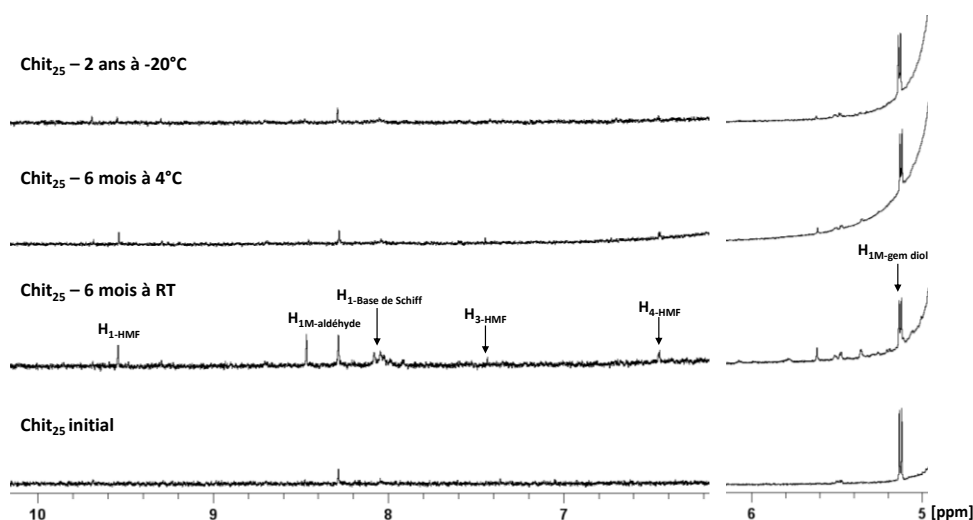


Figure 8. Analyse RMN ^1H du Chit₂₅ lyophilisé et conservé dans diverses conditions de temps et de température. Le Chit₂₅ a été dissous à 10 g/L dans le D₂O et la solution ajustée à pH 4,5.

3.2. Caractérisation des dextranses

Quatre échantillons de dextrane avec des masses molaires de 5 kg/mol, 10 kg/mol, 20 kg/mol et 40 kg/mol (valeurs communiquées par les fournisseurs), correspondant à des DP_n théoriques de 31, 62, 123 et 246 ont été sélectionnés pour le couplage avec du chitosane. Bosker *et coll.* ont rapporté des tentatives de couplage infructueuses entre du polystyrène et du dextrane fonctionnalisé par une amine lorsque le bloc de dextrane devenait trop long (DP 58-123) [14]. Ici, il est attendu que la réactivité supérieure des groupes hydrazide et oxyamine avec l'extrémité réductrice du dextrane par rapport aux amines facilite le couplage de blocs de dextrane relativement longs. Les dextranses ont été caractérisés par RMN ^1H (Figure 9 et Tableau 2) dans du D₂O et par SEC-MALS en tampon phosphate (Figure 10 et Tableau 2).

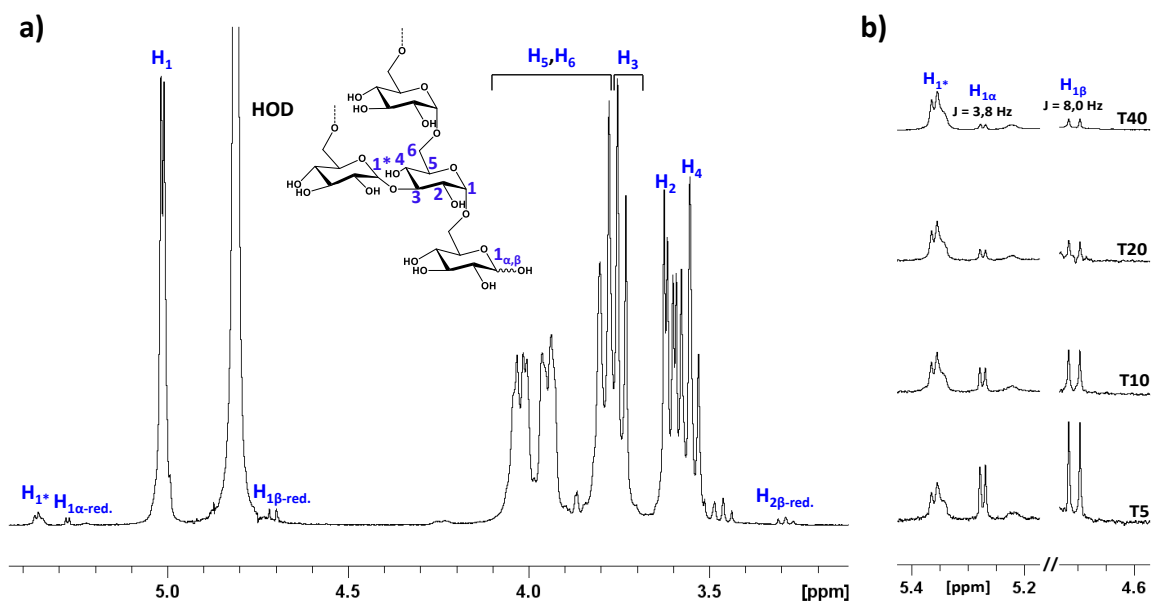


Figure 9. a) Spectre RMN ^1H du dextrane T10 dans le D₂O. Voir Cheetham *et coll.* [38] et Gagnaire et Vignon [39] pour l'attribution des pics. b) Signaux RMN des protons H_{1,α/β} à l'extrémité réductrice des dextranses T5, T10, T20 et T40.

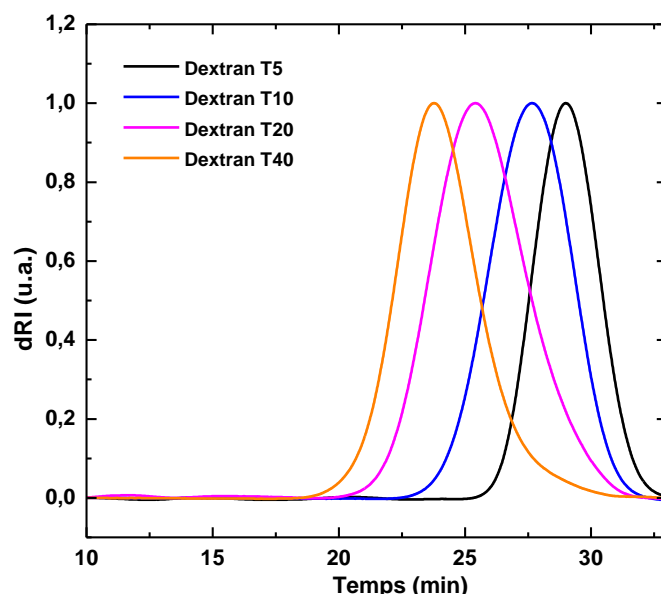


Figure 10. Chromatogrammes SEC (signal dRI) des dextrans commerciaux de différentes masses molaires en tampon phosphate à pH 9. Les chromatogrammes ont été normalisés par leur intensité maximale.

Tableau 2. Caractérisation des dextrans par RMN ^1H et par SEC-MALS.

Nom	Nom commercial	M_n (g/mol) (SEC)	M_w (g/mol) (SEC)	\mathfrak{D} (SEC)	dn/dc (mL/g)	DP (SEC)	DP (RMN ^1H) ^a	DB (%) (RMN ^1H) ^b
Dext ₂₀	Dextrane T5	4 400	5 200	1,19	0,1311	27	20	1,8
Dext ₄₁	Dextrane T10	8 100	10 600	1,30	0,1354	50	41	2,5
Dext ₈₆	Dextrane T20	16 600	23 900	1,44	0,1373	102	86	3,5
Dext ₁₅₂	Dextrane T40	37 800	42 200	1,11	0,1321	233	152	3,5

^a Degré de polymérisation, $DP = (I_{H1^*} + I_{H1,\alpha/\beta} + I_{H1}) / I_{H1,\alpha/\beta}$

^b Degré de branchement, $DB = I_{H1^*} / (I_{H1^*} + I_{H1,\alpha/\beta} + I_{H1})$

L'extrémité réductrice du dextrane est un α/β -D-glucopyranose en équilibre avec sa forme aldéhyde ouverte ; cette dernière ne représentant qu'une très petite fraction, moins de 0,005 % pour le glucose en solution aqueuse [11]. Aucun pic d'aldéhyde n'a été identifié par RMN dans les échantillons de dextrane. Les protons anomériques α et β de l'extrémité réductrice étaient quant à eux bien visibles à 5,26 et 4,69 ppm, même sur le dextrane le plus long (T40) (Figure 9.b). Le pic à 5,34 ppm correspond aux protons des unités glycosyles liées en $\alpha(1 \rightarrow 3)$ aux unités glycosyles $\alpha(1 \rightarrow 6)$ de la chaîne principale. Les degrés de branchement (DB) ont été déterminés à partir du rapport des intégrales des protons $\alpha(1 \rightarrow 3)$ et de la totalité des anomères [38]. Les valeurs de DB augmentent légèrement de 1,8 % à 3,5 % à mesure que la masse molaire du dextrane augmente (Tableau 2). Bien que ces valeurs se situent dans la gamme typiquement obtenue pour les dextrans, la corrélation avec la masse molaire n'a pas été systématiquement observée [40]. L'analyse SEC-MALS a montré que tous les échantillons de dextrane ont des distributions de masse molaire relativement étroites avec des dispersités (\mathfrak{D}) inférieures à 1,5 (Figure 10 et Tableau 2). Les masses molaires moyennes en masse (M_w) correspondent bien aux masses molaires fournies par le fabricant. Cependant, les valeurs de DP obtenues par RMN sont inférieures à celles obtenues par SEC, probablement en raison des faibles intensités des pics des protons anomériques utilisés pour la détermination du DP. La RMN ayant été utilisée pour déterminer les rendements de la

conjugaison des polysaccharides avec l'ADH et le PDHA et les rendements du couplage des polysaccharides, les DP obtenus par RMN ont été préférentiellement utilisés par la suite, même s'ils sont sous-estimés. Ci-après, les blocs de dextrane seront abrégés Dext_m, *m* représentant la valeur du DP.

3.3. Fonctionnalisation terminale du dextrane et du chitosane avec l'ADH et le PDHA

Considérations générales. L'objectif final est de synthétiser des copolysaccharides à blocs linéaires comprenant un bloc chitosane et un bloc dextrane. L'une des extrémités réductrices d'un de ces blocs doit être préalablement fonctionnalisée pour permettre le couplage du second bloc. Quatre voies potentielles de synthèse des copolymères ont été identifiées : le dextrane fonctionnalisé par l'ADH/PDHA peut réagir avec le chitosane, ou le chitosane fonctionnalisé par l'ADH/PDHA peut réagir avec le dextrane (Figure 11). La fonctionnalisation terminale des blocs de chitosane et de dextrane avec l'ADH/PDHA est donc une condition préalable à l'étude du couplage lui-même.

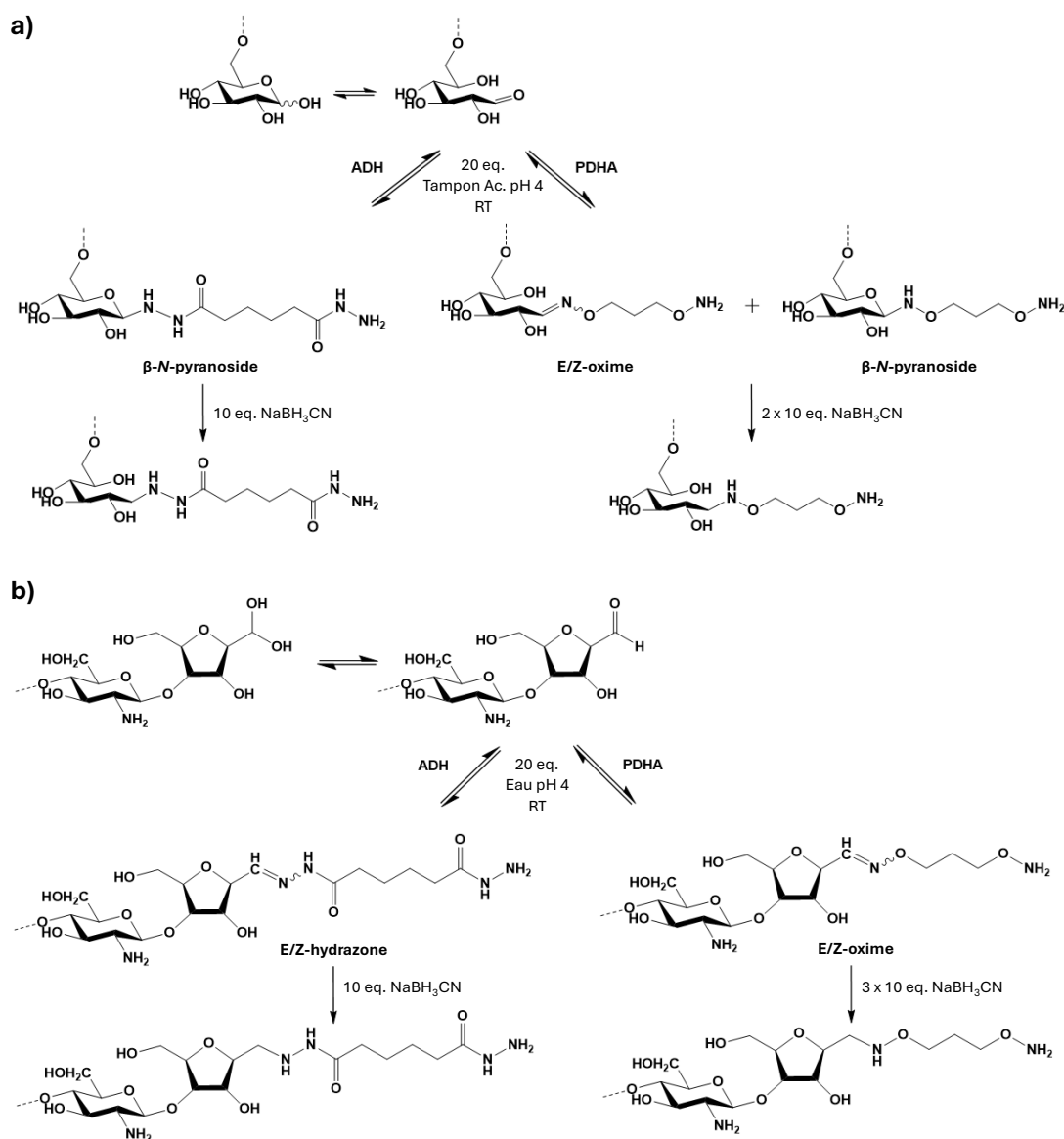


Figure 11. Fonctionnalisation terminale du dextrane (a) et du chitosane (b) avec l'ADH et le PDHA.

Des travaux de recherche antérieurs utilisant des blocs d'oligosaccharides ($DP < 5$) fractionnés par chromatographie de filtration sur gel ont permis d'étudier certains aspects importants des réactions de conjugaison avec l'ADH/PDHA [18],[21]. i) Les différentes formes tautomériques des *N*-glycosides : hydrazones (ou oximes) acycliques *E/Z*, α/β -*N*-pyranosides et α/β -*N*-furanosides cycliques ont été identifiées par RMN. ii) La vitesse de formation des liaisons oxime et hydrazone présente généralement une courbe en cloche en fonction du pH, avec un maximum à un pH de 4,0-5,0 [41]. Ces conditions permettent de préserver la forme basique de l'amine tout en maintenant des conditions légèrement acides pour permettre la déshydratation du carbinolamine intermédiaire, qui est une étape cinétiquement déterminante dans la formation de l'imine [41]. Il a été précédemment démontré qu'un pH de 4,0 permettait l'obtention de rendements et de vitesses de réaction élevés, tant pour la fonctionnalisation de l'extrémité réductrice avec l'ADH/PDHA que pour sa réduction ultérieure. Dans ces conditions de pH, les amines de l'ADH ($pK_a = 3,1$) et du PDHA ($pK_a = 4,2$) sont plus nucléophiles que les amines latérales du chitosane ($pK_a \sim 6,5$) [18] limitant ainsi les réactions de *self-branching*. Les hydrazides et les oxyamines sont donc bien adaptés à la modification de l'extrémité réductrice du chitosane. iii) Le cyanoborohydrure de sodium ($NaBH_3CN$) est un agent réducteur approprié pour former des amines secondaires stables avec de bons rendements. Le ligand cyano fait du $NaBH_3CN$ une source d'hydrure faible qui réagit avec la plupart des groupes fonctionnels facilement réductibles tels que les ions iminium, tout en réagissant plus lentement avec les cétones ou les aldéhydes [13],[42]. Même si le choix de cet agent réducteur est discutable en raison de sa toxicité, sa grande solubilité dans l'eau (212 g/100 g d'eau à 29°C [42]) assure son élimination complète lors des étapes de purification. Aucune trace de $NaBH_3CN$ n'a jamais été détectée par RMN après purification des conjugués réduits. Le picoline borane a déjà été utilisée comme agent réducteur, mais sa faible solubilité dans l'eau limite son utilisation à température ambiante [18],[21]. iv) La constante d'équilibre des réactions de condensation en milieu aqueux est généralement faible ($K \sim 10-100 M^{-1}$) [43], la concentration globale des réactifs doit donc être élevée pour obtenir de bons rendements [23]. Une concentration plus élevée en réactifs permet également d'augmenter les vitesses de réaction. Cependant, pour les polymères, il n'est pas conseillé d'utiliser des concentrations trop élevées afin d'éviter des problèmes de viscosité. Dans ce contexte, des concentrations en polymère de 20 g/L pour le chitosane et de 60 g/L pour le dextrane ont été utilisées. Étant donné qu'aucun problème de viscosité n'est associé aux concentrations élevées de réactifs de faible masse molaire, 20 équivalents d'ADH/PDHA par rapport à la concentration molaire des blocs de polysaccharides ont été systématiquement engagés afin de maximiser le rendement. Un nombre élevé d'équivalents d'ADH/PDHA participe également à la faible occurrence de réactions de dimérisation des blocs de polysaccharides, estimée autour 1% pour 20 équivalents d'après les calculs théoriques (Annexe S4 – Chapitre 2). Les autres paramètres expérimentaux des réactions de fonctionnalisation ont également été optimisés en amont (Annexe S3 – Chapitre 2). En ce qui concerne l'analyse des données RMN, il est important de mentionner que la résolution des spectres ne peut pas être aussi bonne que celle obtenue avec des oligosaccharides de faible DP [18],[22]. Cependant, les pics caractéristiques des conjugués ont toujours pu être bien identifiés, même avec le dextrane le plus long (T40), et les intégrales ont été évaluées de manière satisfaisante.

Conjugués non réduits. La modification des extrémités réductrices du dextrane et du chitosane a d'abord été étudiée en conditions non réductrices. Toutes les expériences ont été réalisées avec le Dext₄₁ et le Chit₂₅ comme références. La caractérisation structurale des conjugués a été réalisée par RMN ¹H. Le suivi cinétique des réactions de conjugaison a été effectué par analyse RMN des mélanges de polysaccharides avec un excès d'ADH/PDHA (Figure 12) [22],[18],[21]. Concernant la conjugaison du dextrane avec l'ADH, seule la forme β-*N*-pyranoside cyclique a pu être mise en évidence sur le conjugué purifié (Figure 12.a), comme pour la plupart des hydrazides glycosylés formés en solutions aqueuses [34],[23] et en particulier avec l'ADH [44]. La formation de l'hydrazide glycosylé passerait par l'hydrazone acyclique intermédiaire E/Z avant que le cycle ne se referme pour obtenir la configuration pyranose. La constante de couplage ($J = 9,1$ Hz) suggère une configuration β, probablement en raison de la préférence conformationnelle des substituants pour la position équatoriale. La conversion maximale, obtenue après 10 heures de réaction entre le dextrane et l'ADH, est d'environ 70 % ; valeur déterminée à partir des intégrales des protons β-*N*-pyranosides à 4,1 ppm ou de la somme des protons anomériques α/β n'ayant pas réagi (Figure 12.a et Figure 13.a). Le rendement de la réaction de conjugaison a également été confirmé par intégration des pics méthylène de l'ADH à 1,61 ppm et 2,25 ppm dans le conjugué purifié (Figure 12.a). Pour le PDHA, les signaux correspondant aux isomères E/Z de l'oxime et au β-*N*-pyranoside ont été observés dans un rapport de 7:1 dans le conjugué purifié (Figure 12.b), ce qui correspond aux résultats précédemment obtenus avec le dextrane de DP 5 [21]. Après 10 heures de réaction, la conversion maximale des liaisons oxime a atteint près de 90%. En tenant compte des intégrales obtenues pour les oximes et le pyranoside dans le conjugué purifié, la conversion totale approche 100%. En plus d'atteindre des taux de conversion plus élevés que l'ADH, le PDHA présente également une cinétique de conjugaison plus rapide, comme l'indiquent les valeurs de $t_{0,9}$ (Tableau 3).

Pour le chitosane, la configuration spécifique de l'unité M conduit à la formation exclusive d'hydrazones E/Z avec l'ADH et d'oximes E/Z avec le PDHA (Figure 12.c et d). Les taux de conversion sont proches de 100%, comme le montrent les analyses RMN des mélanges réactionnels contenant un excès d'ADH et de PDHA avec la disparition du pic du diol géminé à 5,1 ppm (Figure 13.c et d). Cependant, après purification des conjugués, le signal correspondant au diol géminé apparaît sur le spectre du conjugué chitosane-ADH (Figure 12.c). Cela suggère que la liaison hydrazone est instable en l'absence d'un excès d'ADH. En effet, un excès d'ADH permet de déplacer l'équilibre vers la formation complète du conjugué dans le mélange réactionnel, assurant la stabilité et la conversion élevée du produit final. En outre, le pH de la solution de chitosane peut également influencer la stabilité hydrolytique de l'hydrazone. Ici, le pH a été ajusté à 5,5 pour l'analyse RMN afin de minimiser l'hydrolyse tout en assurant la solubilisation du chitosane. Concernant les paramètres cinétiques de la réaction de conjugaison, les valeurs de $t_{0,5}$ et $t_{0,9}$ obtenues pour le chitosane dans les mélanges réactionnels avec un excès d'ADH/PDHA sont significativement inférieures à celles obtenues avec le dextrane, ce qui est cohérent avec la plus grande disponibilité de l'aldéhyde à l'extrémité réductrice du chitosane par rapport au dextrane. Les taux de conversion et les constantes cinétiques obtenus avec le Chit₂₅ et le Dext₄₁ sont cohérents avec ceux obtenus précédemment avec des blocs d'oligosaccharides de DP ≤ 5 [18],[21]. Cela suggère que la réaction de conjugaison avec l'ADH et le PDHA est majoritairement indépendante du DP du bloc polysaccharide dans la gamme de DP étudiée.

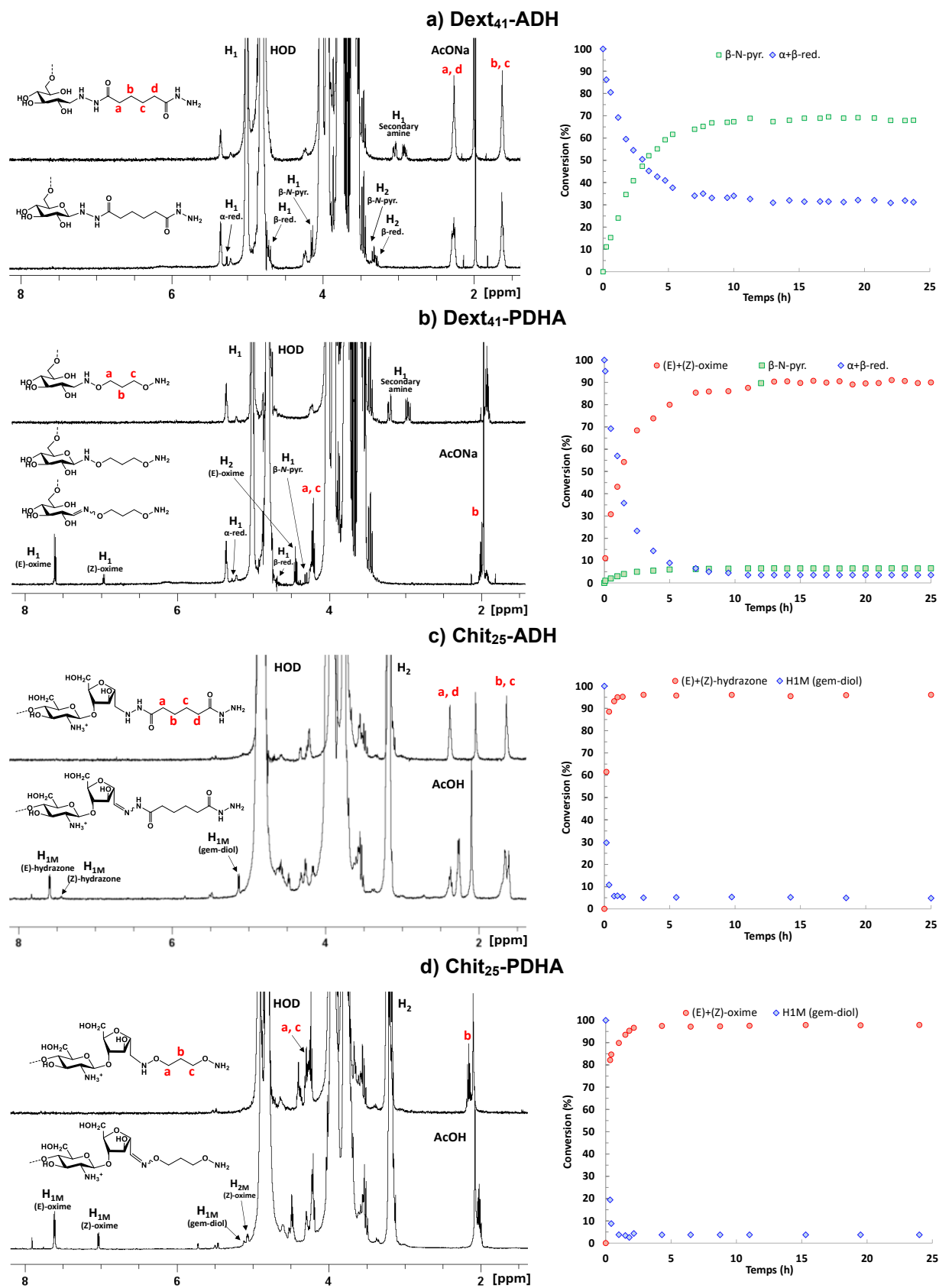


Figure 12. Analyse RMN ^1H des conjugués purifiés de Dext₄₁ et Chit₂₅ avec ADH/PDHA. (Gauche) Conjugués non réduits (bas) et réduits (haut). (Droite) Suivi cinétique de la conjugaison du Dext₄₁ et du Chit₂₅ avec l'ADH/PDHA en conditions non réductrices dans le D₂O à pH 4. Le dédoublement des pics de l'ADH observé dans les conjugués de chitosane non réduits est dépendant du pH (Figure 15).

Tableau 3. Taux de conversion et paramètres cinétiques des réactions de conjugaison du Chit₂₅ et du Dext₄₁ avec 20 équivalents d'ADH et de PDHA.

Conjugués	pH	t _{0,5} (h) ^a	t _{0,9} (h) ^a	Conversion (%)
Dext ₄₁ -ADH	4,0	1,72	5,75	69
Dext ₄₁ -PDHA	4,0	0,95	3,17	97
Chit ₂₅ -ADH	4,0	0,10	0,34	96
Chit ₂₅ -PDHA	4,0	0,12	0,41	97

^a t_{0,5} and t_{0,9}: temps nécessaire pour atteindre respectivement 50% et 90% de la conversion maximale.

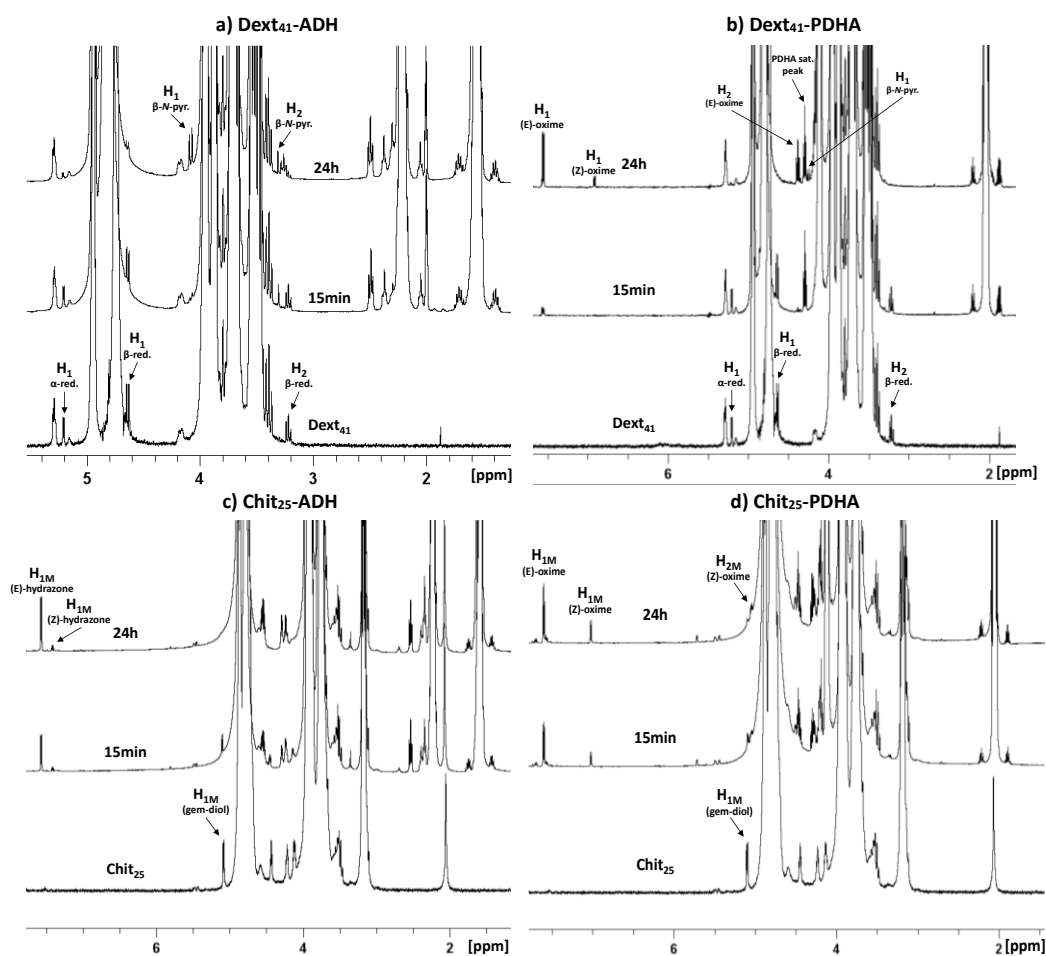


Figure 13. Analyses RMN ¹H des milieux réactionnels : Dext₄₁ ou Chit₂₅ en présence de 20 équivalents d'ADH ou de PDHA en conditions non réductrices après 15 minutes et 24 heures de réaction. Les réactions ont été réalisées à pH 4,0 (en tampon acétate deutéré pour le dextrane et dans le D₂O + DCl pour le chitosane). Les spectres RMN du Dext₄₁ et du Chit₂₅ sont utilisés comme références.

A titre de comparaison, la fonctionnalisation de l'extrémité réductrice du dextrane a été réalisée en utilisant le 1,4-diaminobutane dans des conditions similaires mais en faisant varier le pH du milieu réactionnel (Figure 14.a. et b). Les taux de conversion sont particulièrement faibles (~ 5%) à pH 4 et n'augmentent que légèrement (~ 15%) à pH 8 en raison du taux de protonation plus faible des groupes amine (pK_a diaminobutane = 10,8). Ceci démontre clairement l'incapacité d'une amine primaire avec un pK_a d'environ 10 à réagir efficacement avec l'extrémité réductrice du dextrane en conditions non réductrices. La fonctionnalisation du dextrane avec le diaminobutane a également été testée en tampon borate à pH

8,5, qui est connu pour augmenter la disponibilité de l'aldéhyde de l'extrémité réductrice [45],[46]. Cependant, la solution de dextrane obtenue était trop visqueuse pour permettre une analyse RMN, probablement en raison des interactions hydrogène entre le borate et les hydroxyles du dextrane. La fonctionnalisation terminale du Chit₂₅ avec le diaminobutane a été évaluée à pH 5,5 afin de ne pas compromettre la solubilité du chitosane. Cependant, la réaction de conjugaison n'a pas abouti, comme en témoigne le pic du diol géminé qui est resté inchangé, même après 24 heures de réaction (Figure 14.c). Il est clair que l'ADH, et plus encore le PDHA, avec des valeurs respectives de pK_a de 3,1 et 4,2 [18] apparaissent comme de bien meilleurs candidats que les diamines classiques pour la fonctionnalisation de l'extrémité réductrice des polysaccharides en conditions non réductrices.

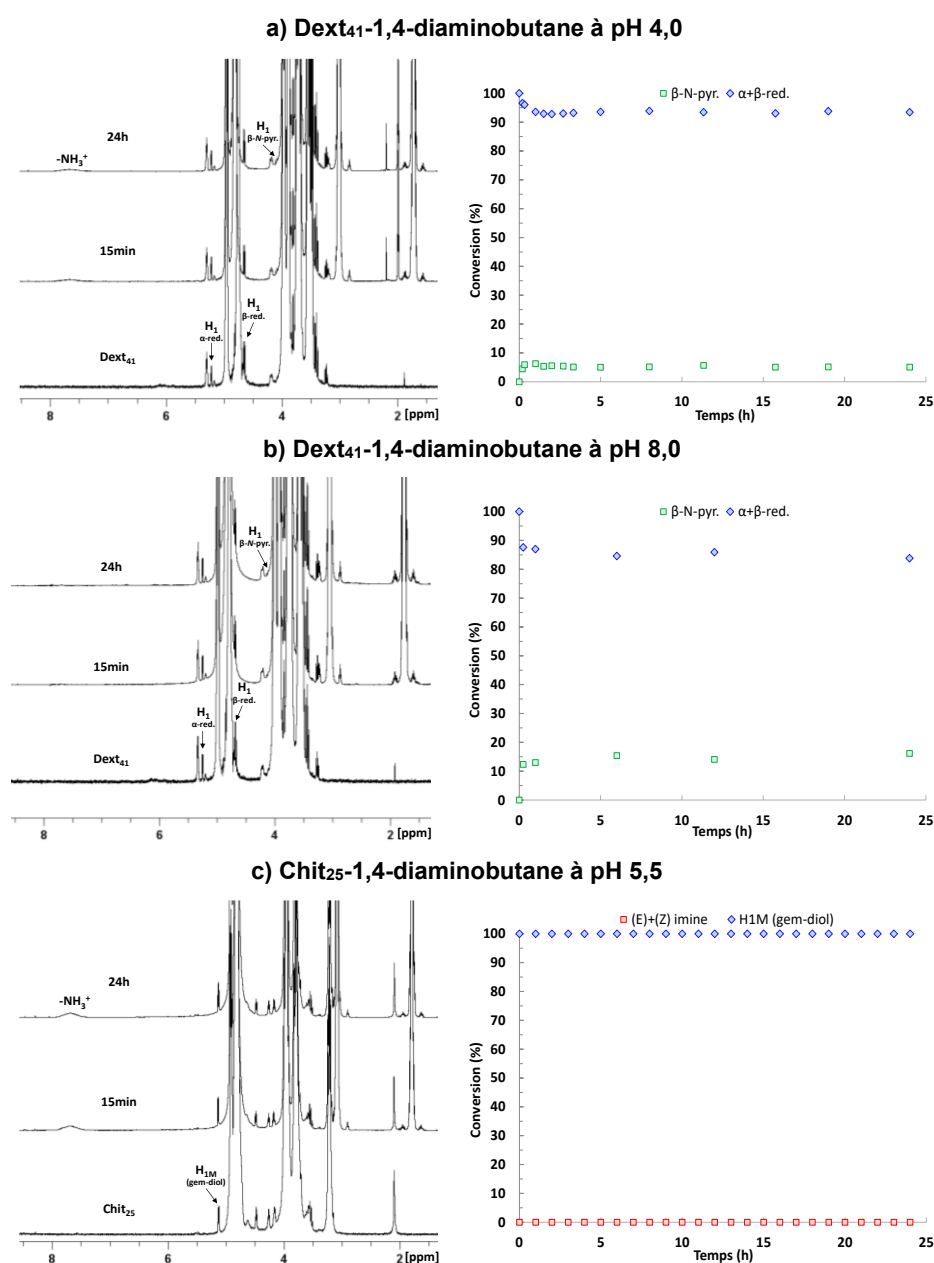


Figure 14. (Gauche) Analyse RMN ¹H des milieux réactionnels : Dext₄₁ ou Chit₂₅ avec 20 équivalents de 1,4-diaminobutane en conditions non réductrices après 15 min et 24 heures de réaction. Les spectres RMN du Dext₄₁ et du Chit₂₅ sont utilisés comme références. (Droite) Suivis cinétiques des réactions de conjugaison du Dext₄₁ et du Chit₂₅ avec le 1,4-diaminobutane à différents pHs (pH 4,0 : tampon acétate deutéré – pH 5,5 et 8,0 : D₂O + DCl).

Résistance à l'hydrolyse des conjugués non réduits. L'instabilité de la liaison hydrazone du chitosane-ADH à pH 5,5 a initié une étude complète de la stabilité au pH des conjugués non réduits. Pour cela, les conjugués de dextrane et de chitosane ont été dissous dans du D₂O, et le pH des solutions ajusté avec du DCl. Les conjugués ont été analysés 12 heures après. L'intensité des signaux des protons associés aux groupements E/Z oxime, E/Z hydrazone et β -N-pyranoside diminue avec le pH. Inversement, l'intensité des signaux associés aux protons anomériques de l'extrémité réductrice du dextrane et du diol géminé de l'unité M augmente lorsque le pH diminue (Figure 15 et Figure 16). Ces deux variations témoignent du clivage des liaisons β -N-pyranoside/hydrazone/oxime en conditions acides avec la régénération concomitante de l'extrémité réductrice native.

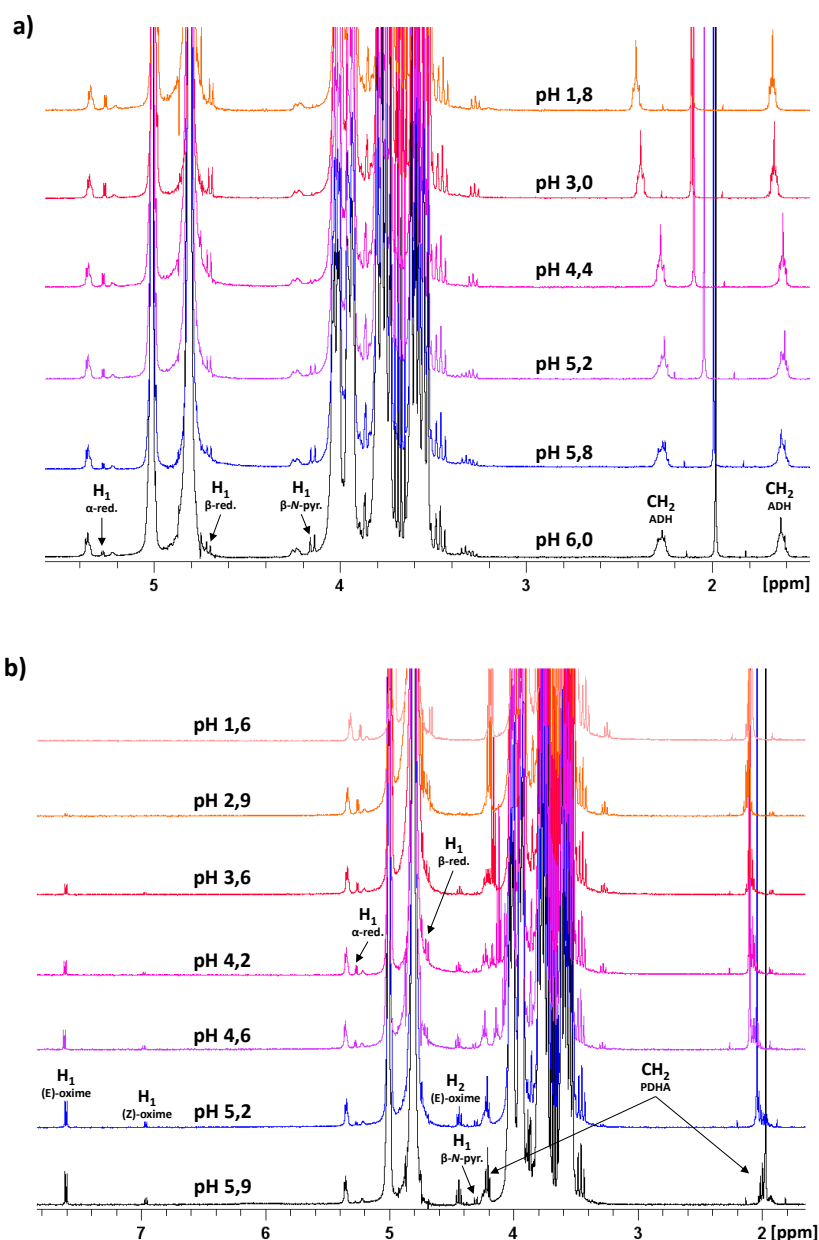


Figure 15. Analyses RMN ¹H des conjugués non réduits à différents pHs. a) Dext₄₁-ADH et b) Dext₄₁-PDHA. Les solutions ont été préparées à 10 g/L dans le D₂O et le pH ajusté avec du DCl 1,17 M.

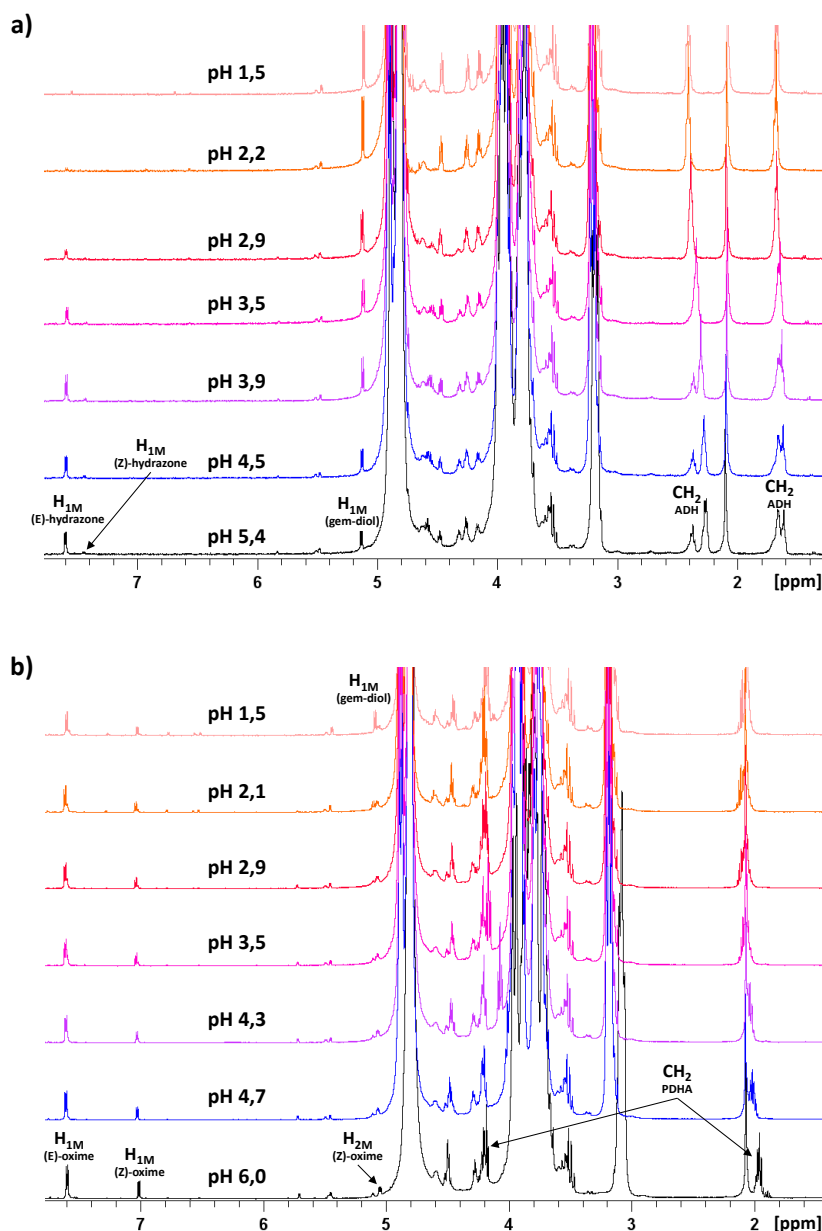


Figure 16. Analyses RMN ^1H des conjugués non réduits à différents pHs. a) Chit₂₅-ADH et b) Chit₂₅-PDHA. Les solutions ont été préparées à 10 g/L dans D₂O et le pH ajusté avec du DCl 1,17 M.

L'abondance relative des différentes formes de l'unité réductrice a été estimée à différents pHs par analyse RMN (Figure 17). Les liaisons oxime obtenues à partir des conjugués PDHA se sont révélées plus stables que les liaisons hydrazone : les valeurs de pH nécessaires pour atteindre 90% d'hydrolyse ($\text{pH}_{0,9}$) sont de 4,5 pour le Dext₄₁-ADH et de 3,0 pour le Dext₄₁-PDHA. La nature de l'extrémité réductrice affecte également la stabilité hydrolytique des liaisons hydrazone et oxime. Le $\text{pH}_{0,9}$ du Chit₂₅-ADH est de 2,5, soit deux unités de moins que celui obtenu pour le Dext₄₁-ADH. Cette différence est attribuée à la plus grande réactivité de l'aldéhyde de l'unité M par rapport à l'aldéhyde de l'extrémité réductrice du dextrane. Le conjugué le plus stable est le Chit₂₅-PDHA avec 70% des groupes oxime intacts à un pH de 1,5. Bien que la stabilité hydrolytique de l'oxime soit bien connue [47], la stabilité comparative des hydrazones et des oximes a été moins étudiée [43],[28]. Kalia et Raines ont suggéré

que les oximes ont une plus grande stabilité hydrolytique que les hydrazones en raison de leur meilleure résistance à la protonation [28].

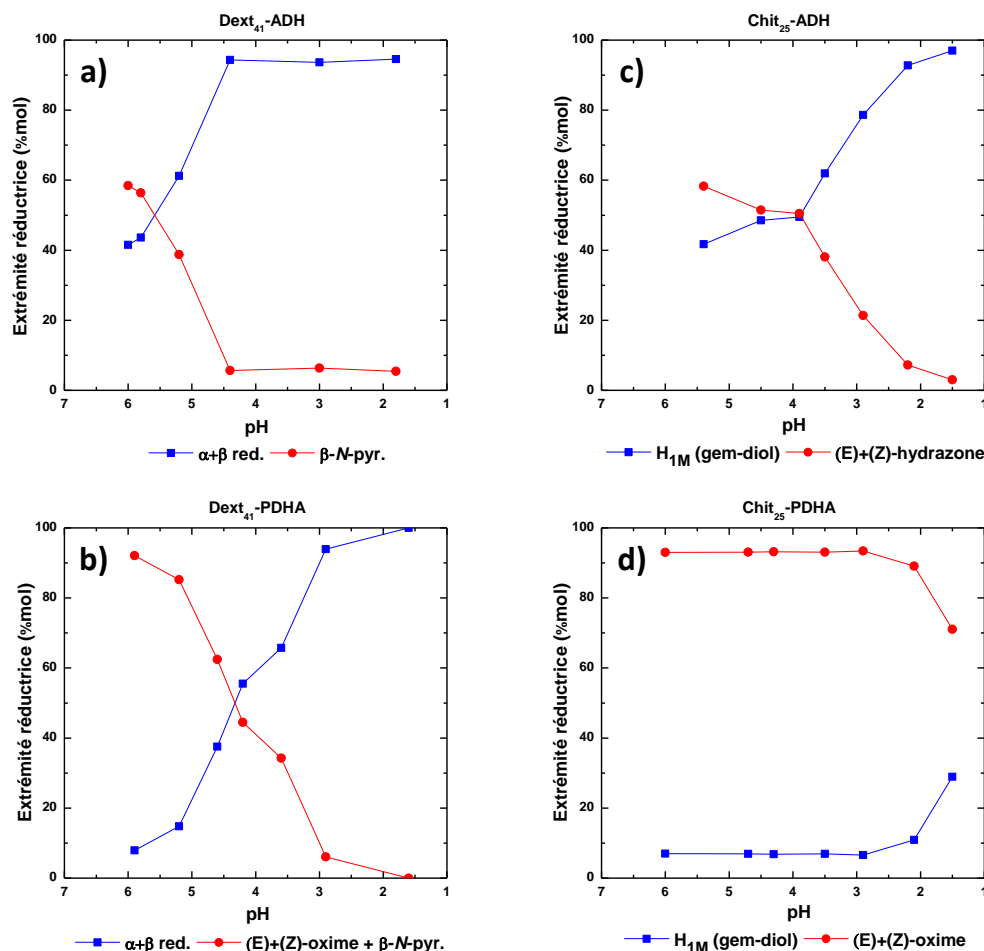


Figure 17. Stabilité au pH des conjugués non réduits. L'abondance (en %mol) des différentes formes de l'extrémité réductrice, qu'elle soit libre ou conjuguée à l'ADH/PDHA, est représentée en fonction du pH. a) Dext₄₁-ADH, b) Dext₄₁-PDHA, c) Chit₂₅-ADH et d) Chit₂₅-PDHA. Les analyses RMN ont été effectuées 12 heures après ajustement du pH.

Conjugués réduits. La réduction des fonctions hydrazone et oxime a été réalisée par ajout d'un large excès de NaBH₃CN directement dans le mélange réactionnel après 12 heures, plutôt que sur les conjugués purifiés. Cette approche permet de s'assurer que l'équilibre de la réaction soit déplacé vers la formation des conjugués par l'ajout de NaBH₃CN. Certaines réactions secondaires doivent être prises en compte lors de l'étape de réduction. Dans un premier temps, la réduction de l'unité M du chitosane est rapide, se produisant en l'espace d'environ 10 heures avec seulement 3 équivalents de NaBH₃CN à pH 4 [21]. En revanche, pour le dextrane, la réduction de l'extrémité réductrice est négligeable à pH 4. En présence de 20 équivalents de NaBH₃CN, la diminution de l'intensité du pic des protons anomériques H_{1 α} n'est que de 4 % après 24 heures de réaction (Figure 18).

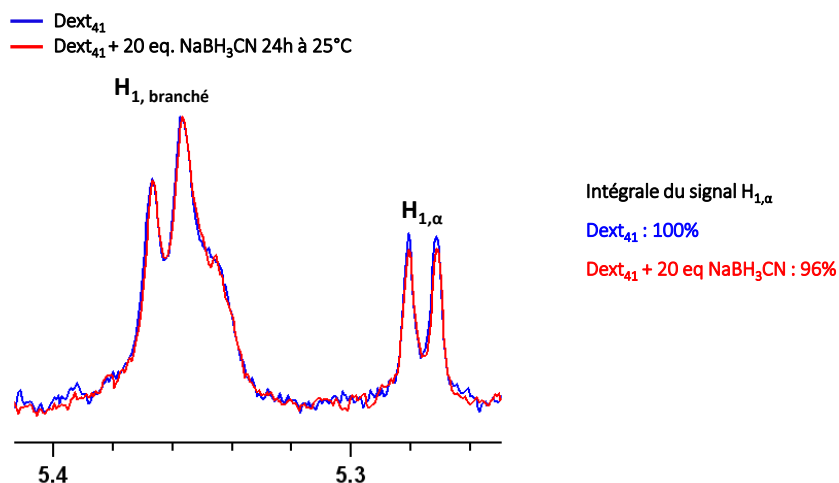


Figure 18. Analyse RMN ^1H du Dext_{41} dans le D_2O après 24 heures de réaction avec 20 équivalents de NaBH_3CN en tampon acétate pH 4,0 à 25°C. Les spectres sont agrandis dans la région correspondant aux protons $\alpha(1\rightarrow3)$ des unités branchées (intégrale inchangée après réduction) et aux protons $\text{H}_{1,\alpha}$ de l'extrémité réductrice.

Comme mentionné dans l'introduction, le *self-branching* du chitosane en présence de NaBH_3CN est une autre réaction secondaire à prendre en compte [36],[37],[48]. Cette réaction a été clairement mise en évidence par SEC-MALS sur du Chit_{25} comme en témoigne l'asymétrie et le décalage des chromatogrammes vers les hautes masses molaires ainsi que l'augmentation de l'indice de dispersité (\mathcal{D}) (Figure 19 et Tableau 4).

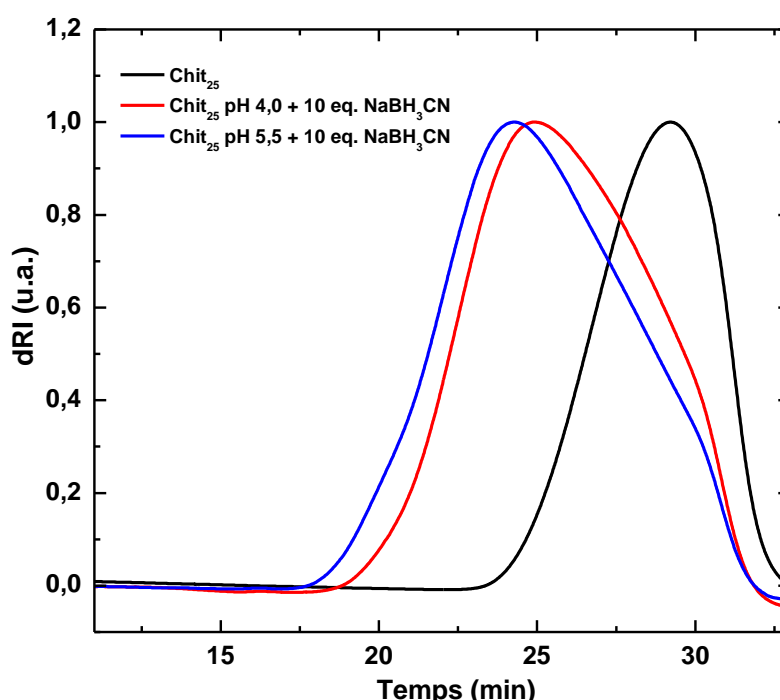


Figure 19. Chromatogrammes SEC (signal dRI) du Chit_{25} après ajout de 10 équivalents de NaBH_3CN . La réaction de réduction a été effectuée pendant 24 heures à 25°C à deux pHs : pH 4,0 (tampon acétate) et pH 5,5 (D_2O + DCl). Les milieux réactionnels ont été directement injectés en SEC après dilution dans le tampon acétate d'éluion (0,2 M $\text{AcOH}/0,15$ M AcONa , pH 4,5). Les chromatogrammes ont été normalisés par leur intensité maximale.

Tableau 4. Caractérisation SEC-MALS des structures branchées de chitosane obtenues après ajout de NaBH₃CN.

Nom	M _n (g/mol)	M _w (g/mol)	Đ
Chit ₂₅	3 700	4 700	1,26
Chit ₂₅ – pH 4,0 – Tampon acétate – 10 eq. NaBH ₃ CN	9 700	17 200	1,78
Chit ₂₅ – pH 5,5 – D ₂ O – 10 eq. NaBH ₃ CN	12 900	23 800	1,85

L'ajout de NaBH₃CN en large excès induit également une augmentation significative du pH du milieu réactionnel (Tableau 5). Cet effet peut être atténué en se plaçant en tampon, comme cela a été fait ici dans le cas du dextrane. Cependant, avec le chitosane, l'utilisation de tampon acétate n'est pas recommandée en raison de sa tendance à favoriser les réactions de *self-branching* [31]. Par conséquent, la réduction du chitosane a été réalisée dans l'eau en ajustant la solution à pH 4,0. Dans ces conditions, le pH du milieu augmente jusqu'à 5,2 avec l'ajout de NaBH₃CN, ce qui reste acceptable pour garantir la solubilité du chitosane (Tableau 5).

Tableau 5. pHs des milieux réactionnels de conjugaison du Dext₄₁ et du Chit₂₅ avec l'ADH et le PDHA à 25°C en présence de différentes quantités de NaBH₃CN.

Polysaccharide	Agent de liaison	Solvant	NaBH ₃ CN	pH initial	Temps de réduction	pH final
Dext ₄₁	20 eq. ADH	Tampon acétate	1 x 10 eq.	4,0	12 h	4,1
Dext ₄₁	20 eq. PDHA	Tampon acétate	2 x 10 eq.	4,0	24 h	4,0
Chit ₂₅	20 eq. ADH	Eau	1 x 10 eq.	4,0	12 h	5,2
Chit ₂₅	20 eq. PDHA	Eau	3 x 10 eq.	4,0	36 h	4,2

Dans le cas des conjugués de dextrane ou de chitosane avec l'ADH, seuls 10 équivalents de NaBH₃CN sont nécessaires pour réduire les fonctions *N*-pyranoside ou hydrazone (Figure 20). En revanche, la réduction complète des oximes obtenues avec le PDHA nécessite des quantités plus importantes de NaBH₃CN (2 x 10 équivalents pour le dextrane-PDHA et 3 x 10 équivalents pour le chitosane-PDHA), confirmant leur stabilité accrue par rapport aux hydrazones (Figure 20). La nature de l'extrémité réductrice, unité M ou extrémité réductrice normale, affecte également la réduction de la liaison oxime. Ceci est mis en évidence par la quantité de NaBH₃CN plus importante nécessaire pour réduire le chitosane-PDHA par rapport au dextrane-PDHA (Figure 20).

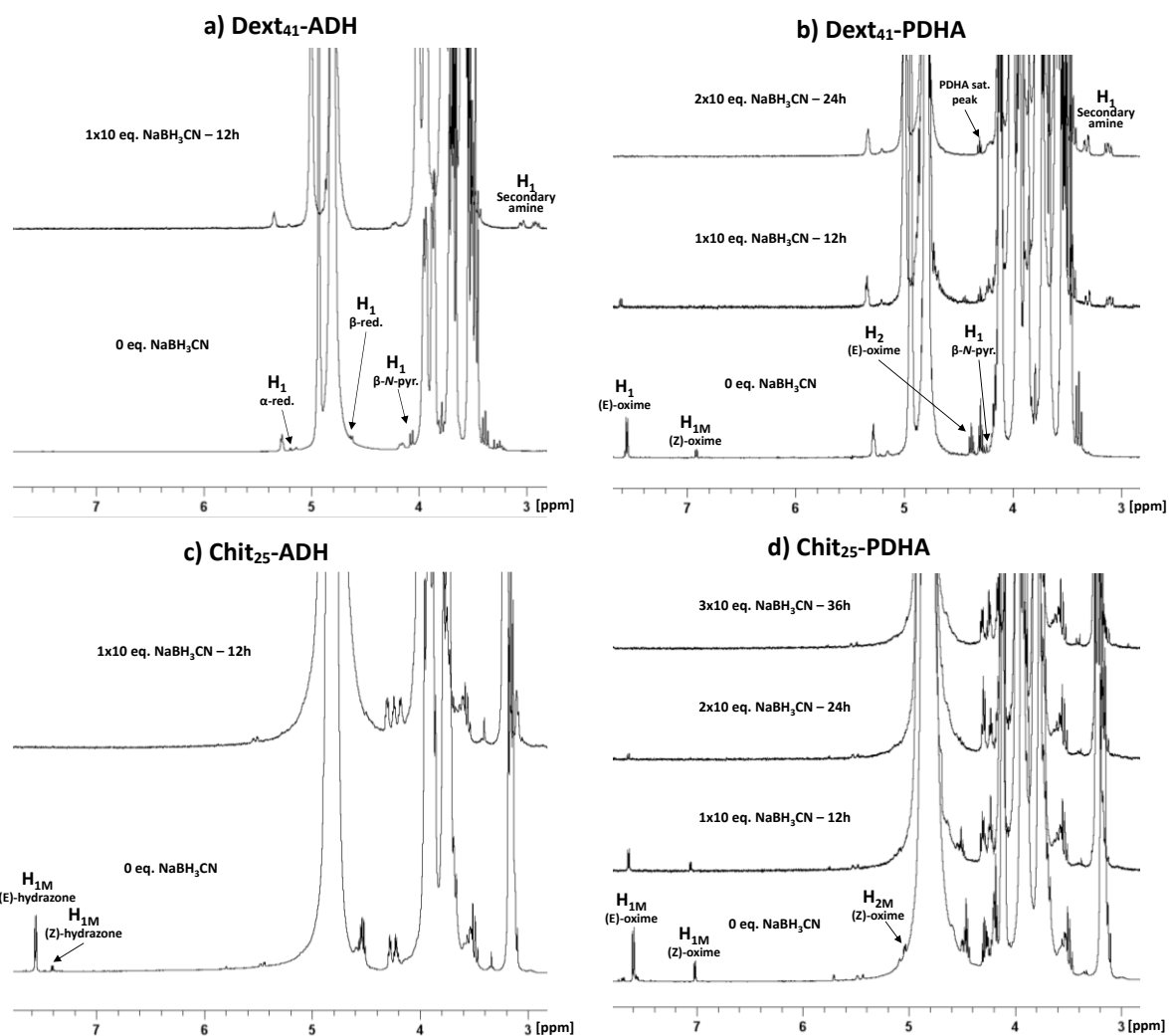


Figure 20. Analyses RMN ^1H des milieux réactionnels avant et après chaque ajout de NaBH_3CN . a) Dext₄₁-ADH, b) Dext₄₁-PDHA, c) Chit₂₅-ADH et d) Chit₂₅-PDHA. Les ajouts ont été effectués à 12 heures d'intervalle.

Après purification, la structure chimique des conjugués réduits a été confirmée par RMN (Figure 12). En particulier, les protons de l'amine secondaire nouvellement formée ont été bien identifiés dans la zone 2,8-3,4 ppm pour les conjugués de dextrane [49]. Pour les conjugués de chitosane, ces protons qui sont sensibles au pH, sont masqués par les protons H_2 du chitosane en conditions acides. Cependant, l'amine secondaire a pu être détectée par RMN 2D HSQC (Figure 21).

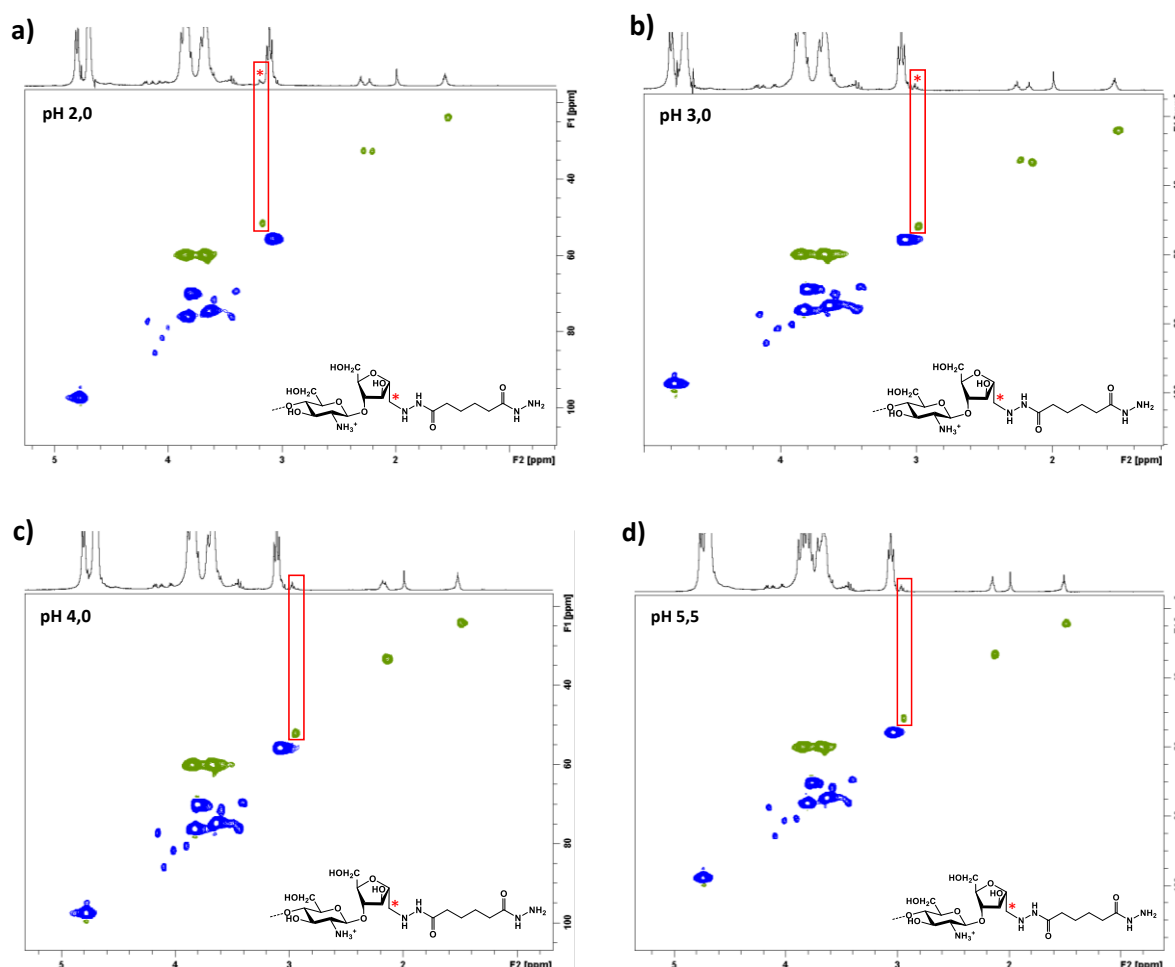


Figure 21. Analyses RMN 2D HSQC du Chit₂₅-ADH réduit à différents pHs ; a) pH 2,0, b) pH 3,0, c) pH 4,0 et d) pH 5,5. Les groupes CH₂ sont représentés en vert et les groupes CH/CH₃ en bleu.

Le taux de fonctionnalisation des conjugués de dextrane après réduction s'est avéré proche de 100% pour le PDHA comme pour l'ADH (dans les limites de l'incertitude de l'analyse RMN). Il est évident que dans le cas du dextrane-ADH, l'étape de réduction a permis de déplacer l'équilibre de la réaction pour atteindre une conversion complète du conjugué. Pour vérifier l'absence de réactions de dimérisation, les conjugués de dextrane et de chitosane avec l'ADH et le PDHA ont été analysés par SEC-MALS (Figure 22 et Tableau 6). Les analyses ont été effectuées en injectant directement les milieux réactionnels après dilution avec le tampon d'élution de la SEC, évitant ainsi toute augmentation de masse molaire résultant de l'étape de purification par précipitation. Les conjugués de dextrane ont été analysés en tampon phosphate à pH 9,0 pour éviter la protonation des amines terminales de l'ADH et du PDHA qui pourraient alors interagir avec la phase stationnaire des colonnes de SEC en tampon acétate à pH 4,5. Concernant les conjugués de chitosane, l'utilisation d'un tampon acétate était nécessaire afin d'assurer la solubilité du polymère. L'augmentation de la masse molaire des conjugués de dextrane par rapport au dextrane initial est relativement faible, ce qui est cohérent avec la faible masse molaire des groupes terminaux de l'ADH/PDHA. Les fractions massiques en polymère récupérées en sortie de colonne étaient supérieures à 70% (Tableau 6). Pour le chitosane, une augmentation significative de la masse molaire a été observée pour les deux conjugués, mais probablement pour des raisons différentes. Pour le Chit₂₅-ADH, les fractions massiques en polymère en sortie de colonne indiquent l'absence

d'interaction avec la colonne, excluant ainsi toute interaction du polymère avec la phase stationnaire à pH 4,5 (Tableau 6). Dans ces conditions, l'augmentation de la masse molaire est certainement liée à des réactions de *self-branching*, comme décrit précédemment dans le texte. Pour le Chit₂₅-PDHA, les réactions de *self-branching* sont minimisées en raison de la stabilité de la liaison oxime. Par conséquent, l'augmentation de la masse molaire est sûrement liée à l'interaction du PDHA avec la colonne, comme en témoigne la faible fraction massique en sortie de colonne. Une interaction électrostatique entre les amines protonées du PDHA et les groupes carboxylés résiduels de la phase stationnaire (polyméthacrylate hydroxylé) est suspectée en raison de la valeur du pK_a du PDHA (4,1), proche du pH du tampon (4,5). Dans ces conditions, ce sont les fractions de plus faible masse molaire des conjugués Chit₂₅-PDHA qui sont les plus susceptibles d'interagir avec la colonne, conduisant à une augmentation de la masse molaire moyenne du conjugué.

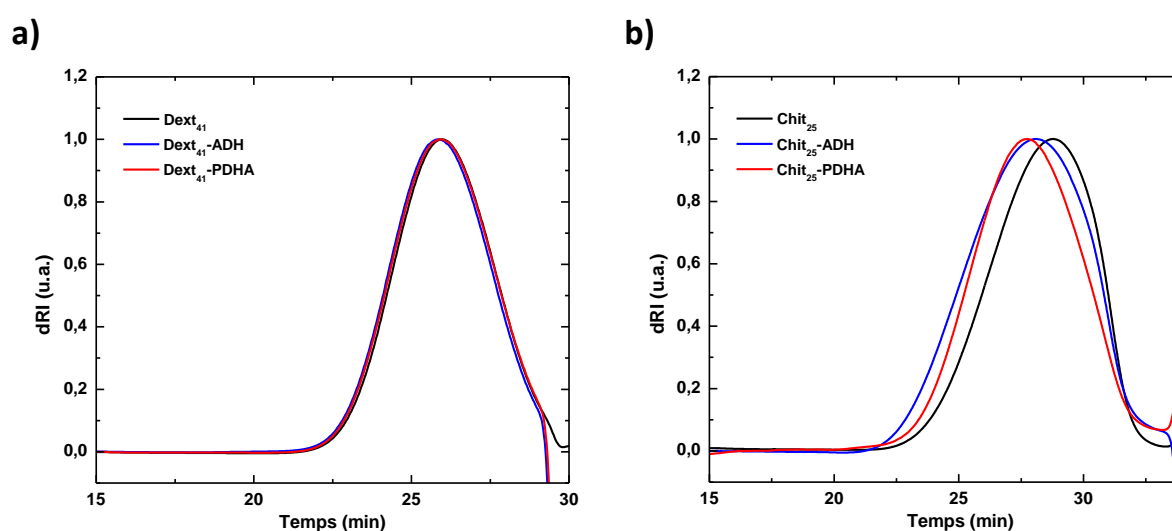


Figure 22. Chromatogrammes SEC (signal dRI) des conjugués réduits. a) Dext₄₁-ADH/PDHA en tampon phosphate pH 9,0 et b) Chit₂₅-ADH/PDHA en tampon acétate pH 4,5. Les chromatogrammes ont été normalisés par leur intensité maximale.

Tableau 6. Caractérisation SEC-MALS des conjugués réduits Dext₄₁-ADH/PDHA et Chit₂₅-ADH/PDHA.

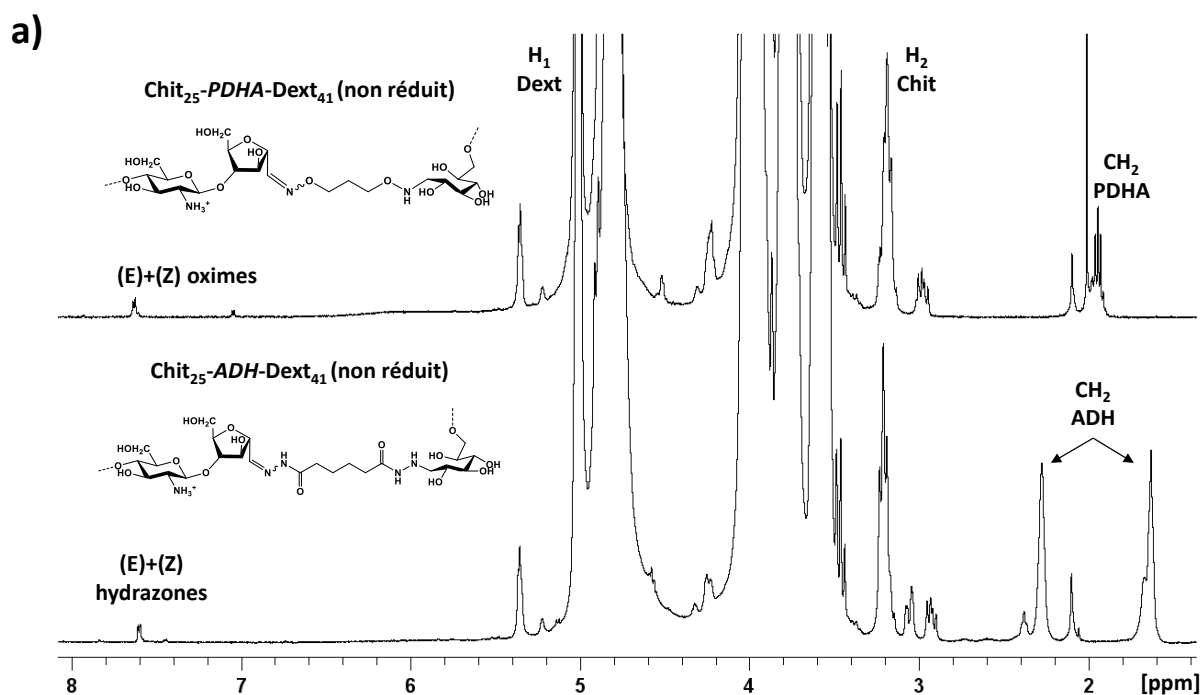
Conjugué	Tampon	M _n (g/mol)	M _w (g/mol)	Đ	dn/dc (mL/g)	Fraction récupérée (%)
Dext ₄₁	phosphate pH 9,0	8 400	10 300	1,23	0,1354	84
Dext ₄₁ -ADH	phosphate pH 9,0	8 700	10 500	1,21	0,1351	73
Dext ₄₁ -PDHA	phosphate pH 9,0	8 800	10 700	1,22	0,1358	74
Chit ₂₅	acétate pH 4,5	4 300	5 600	1,31	0,1912	97
Chit ₂₅ -ADH	acétate pH 4,5	5 700	7 600	1,34	0,1860	86
Chit ₂₅ -PDHA	acétate pH 4,5	5 600	7 100	1,28	0,1723	39

3.4. Synthèse des copolysaccharides chitosane-*b*-dextrane

Les deux approches proposées pour synthétiser des copolysaccharides chitosane-*b*-dextrane consistent à faire réagir soit le dextrane fonctionnalisé en bout de chaîne avec le chitosane, soit le chitosane fonctionnalisé en bout de chaîne avec le dextrane. L'ADH et le PDHA ont été comparés en tant qu'agents

de couplage potentiels, ce qui a donné lieu à quatre voies de couplage possibles (Figure 1). La concentration globale en polymère et le nombre d'équivalents du composé en excès ont été maximisés pour obtenir des rendements élevés et une cinétique rapide, tout en évitant une viscosité excessive du milieu réactionnel (Annexe S5 – Chapitre 2). La méthode de purification des copolymères reposant sur leur précipitation en conditions basiques, il est préférable d'utiliser un excès de dextrane plutôt qu'un excès de chitosane lors de la réaction de couplage. En effet, le dextrane peut être facilement éliminé par cycles de lavage/centrifugation car soluble en milieu basique tandis que le chitosane, s'il est introduit en excès, précipitera avec le copolymère. Les conditions de couplage classiques impliquent une concentration en chitosane (ou chitosane-ADH/PDHA) de 20 g/L et 3 équivalents de dextrane-ADH/PDHA (ou dextrane). Toutes les réactions ont été effectuées à température ambiante dans de l'eau milli-Q et le pH de toutes les solutions ajusté à 4,0 avec HCl (le tampon acétate a été évité afin de minimiser les réactions de *self-branching* du chitosane). L'agent réducteur (NaBH_3CN), ajouté en quantités variables selon l'agent de couplage, a été introduit après 12 heures de réaction afin d'éviter la réduction des extrémités réductrices. Des tests de couplage ont d'abord été réalisés avec le Chit₂₅ et le Dext₄₁ avant d'appliquer cette méthode de couplage à d'autres longueurs de blocs polysaccharides.

Méthode de couplage I. Le couplage du chitosane avec du dextrane fonctionnalisé par l'ADH et le PDHA (sous leur forme réduite) a été étudié dans les conditions mentionnées ci-dessus. La formation des liaisons hydrazone/oxime ainsi que la disparition concomitante du pic du diol géminé a été clairement mise en évidence par RMN après 4 heures de réaction (Figure 23). Le taux de conversion du couplage, déterminé à partir des intégrales des liaisons hydrazone/oxime, est d'environ 80% avec le Dext₄₁-ADH et de 90% avec le Dext₄₁-PDHA (dans les limites de l'incertitude de l'analyse RMN).



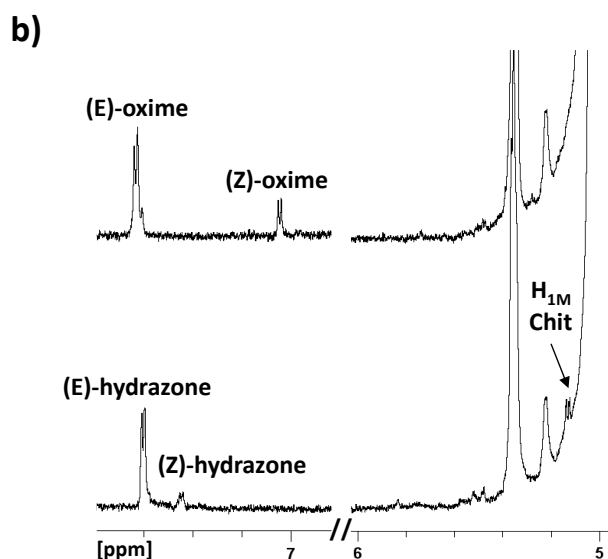


Figure 23. a) Spectres RMN ^1H des milieux réactionnels du Chit₂₅ en présence de 3 équivalents de Dext₄₁-ADH ou Dext₄₁-PDHA (formes réduites) après 4 heures de réaction. b) Agrandissement de la zone correspondant aux protons des oximes et des hydrazones ainsi que du diol géminé résiduel.

La réduction des liaisons hydrazone (formées par l'ADH) nécessite 1×10 équivalents de NaBH_3CN alors que pour réduire complètement les liaisons oxime (formées par le PDHA) 5×10 équivalents de NaBH_3CN sont nécessaires, ajoutés à 12 heures d'intervalle. Après réduction, les copolysaccharides ont été purifiés par précipitation en conditions alcalines afin d'éliminer l'excès de dextrane-ADH/PDHA. De façon surprenante, le copolymère s'est retrouvé dans le culot plutôt que dans le surnageant, révélant ainsi son incapacité à former des agrégats micellaires à pH élevé, contrairement à ce qui est attendu pour un copolymère à blocs de type double hydrophile. Une fois purifiés, les copolymères ont été caractérisés par RMN ^1H (Figure 24) et par SEC-MALS (Figure 25).

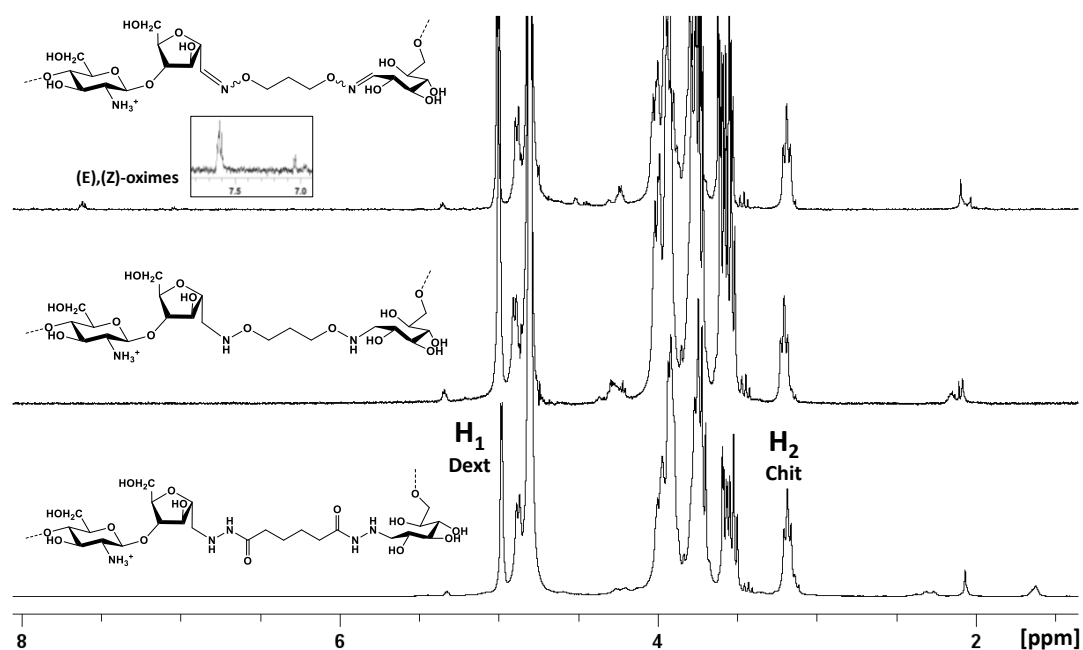


Figure 24. Spectre RMN ^1H (de bas en haut) du Chit₂₅-ADH-Dext₄₁ réduit, du Chit₂₅-PDHA-Dext₄₁ réduit et du Chit₂₅-PDHA-Dext₄₁ non réduit.

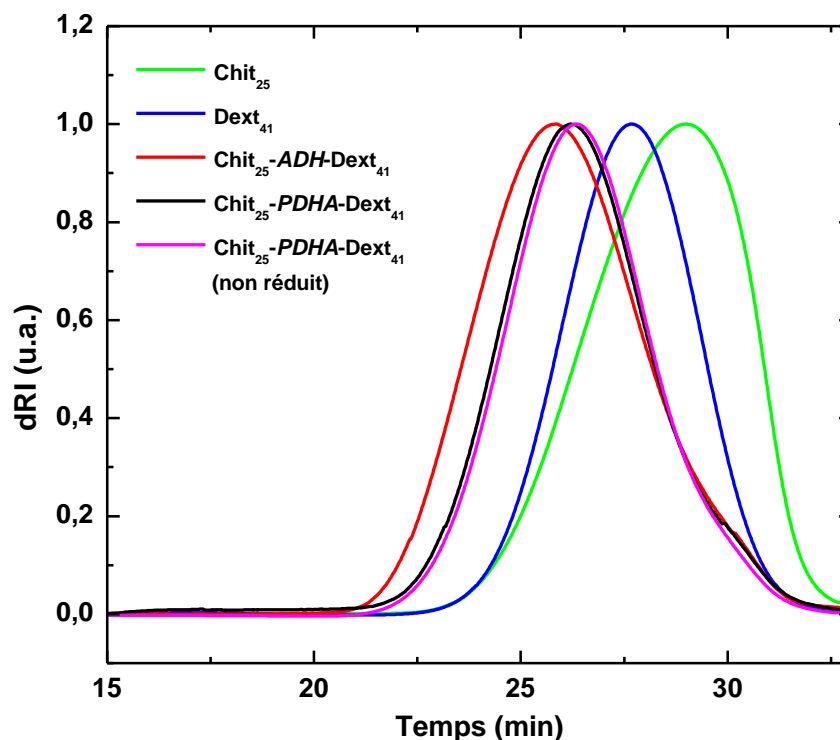


Figure 25. Chromatogrammes SEC (signal dRI) des blocs polysaccharides et des copolysaccharides en tampon acétate pH 4,5. Les chromatogrammes ont été normalisés par leur intensité maximale.

Tableau 7. Caractérisation SEC-MALS et RMN ^1H des copolysaccharides à blocs (méthode de couplage I) avant purification.

Copolysaccharide	Teneur en chitosane ^a (m.%)	M_n théorique (g/mol)	M_n SEC (g/mol)	\bar{D}
Chit₂₅-ADH-Dext₄₁	55	12 400	14 000	1,30
Chit₂₅-PDHA-Dext₄₁	43	12 400	11 700	1,20
Chit₂₅-PDHA-Dext₄₁ (non-reduced)	44	12 400	11 400	1,24

Dans la cas du Chit₂₅-PDHA-Dext₄₁, la teneur en chitosane dans le copolymère est légèrement supérieure à la valeur théorique (37% massique), ce qui indique la présence de chitosane libre mais globalement, la masse molaire du copolymère obtenue par SEC-MALS correspond à la valeur théorique attendue (Tableau 7). L'analyse DOSY a également confirmé le couplage des deux blocs de polysaccharides, comme l'indique la diminution du coefficient de diffusion du Chit₂₅-PDHA-Dext₄₁ comparé à ses précurseurs (Figure 26).

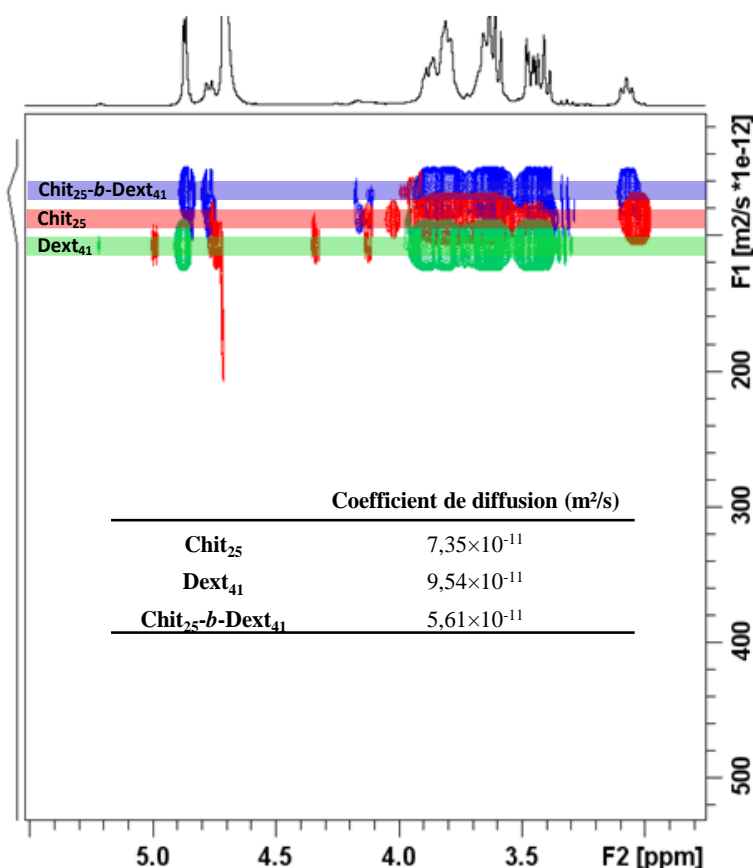


Figure 26. Spectre RMN DOSY ¹H et valeurs des coefficients de diffusion du Chit₂₅-PDHA-Dext₄₁ et de ses précurseurs.

À l'inverse, dans le cas du Chit₂₅-ADH-Dext₄₁, la teneur en chitosane ainsi que la masse molaire sont nettement supérieures à la théorie (Tableau 7), ce qui ne peut être expliqué que par le *self-branching* du chitosane, malgré les précautions prises pour le limiter. Le *self-branching* implique la réaction intra/intermoléculaire des amines latérales du chitosane avec l'unité M. Ce phénomène est susceptible de se produire avec le Chit₂₅-ADH-Dext₄₁ en raison de la combinaison de deux facteurs : la vitesse d'hydrolyse de l'hydrazone à pH 4,0 et le faible excès de dextrane-ADH (3 équivalents) par rapport aux 20 équivalents d'ADH précédemment utilisés pour former les conjugués de chitosane-ADH. Dans ces conditions, des structures stables de chitosane *self-branché* ont pu se former lors de l'ajout de l'agent réducteur ; similaires à celles observées lors de l'ajout de NaBH₃CN à des solutions de chitosane à pH 4,0 (Figure 19 et Tableau 4).

En raison de la stabilité relativement élevée des oximes intermédiaires formées par le PDHA, la synthèse d'un copolysaccharide à blocs sans aucune étape de réduction a été envisagée, permettant non seulement de gagner du temps, mais aussi de se passer de l'utilisation de NaBH₃CN, composé très toxique. De plus, les liaisons oxime présentent un comportement dynamique intéressant, offrant ainsi des propriétés de réversibilité et d'auto-réparation dans l'élaboration de matériaux aux propriétés cicatrisantes [50],[51]. Les mêmes conditions réactionnelles que celles décrites précédemment ont été appliquées pour la fonctionnalisation terminale du dextrane avec le PDHA et son couplage avec le chitosane, à l'exception des deux étapes de réduction qui ont été omises du protocole. Après purification du copolysaccharide par précipitation, les analyses RMN et SEC-MALS ont montré que le taux de conversion du couplage et

la masse molaire du copolysaccharide non réduit étaient similaires à ceux obtenus en présence de NaBH_3CN (Figure 25 et Tableau 7). Par conséquent, la synthèse de copolysaccharides à blocs en conditions non réductrices est une approche viable avec le PDHA comme agent de couplage.

Que ce soit dans le cas du $\text{Chit}_{25}\text{-PDHA-Dext}_{41}$ réduit ou non réduit, un petit épaulement est visible du côté des faibles masses molaires sur les chromatogrammes SEC (Figure 25), témoignant de la présence d'une petite quantité de chitosane libre. Afin que les copolysaccharides soient les plus purs possible, deux méthodes de purification ont été testées avec la forme réduite du copolymère. La première méthode a fait appel à la SEC semi-préparative ; méthode efficace pour séparer de petites quantités de polymères (Annexe S6 – Chapitre 2). Une seconde méthode consiste à tirer parti de la différence de solubilité du copolymère par rapport au chitosane afin d'extraire le chitosane libre par précipitation sélective. Le pH de la solution de $\text{Chit}_{25}\text{-PDHA-Dext}_{41}$ a été ajusté à $6,5 \pm 0,1$, soit légèrement au-dessus du pH de solubilité du Chit_{25} seul (Figure 35). Après centrifugation, la composition en polymère dans le culot et le surnageant a été déterminée par RMN ^1H (Figure 27) et par SEC-MALS (Figure 28).

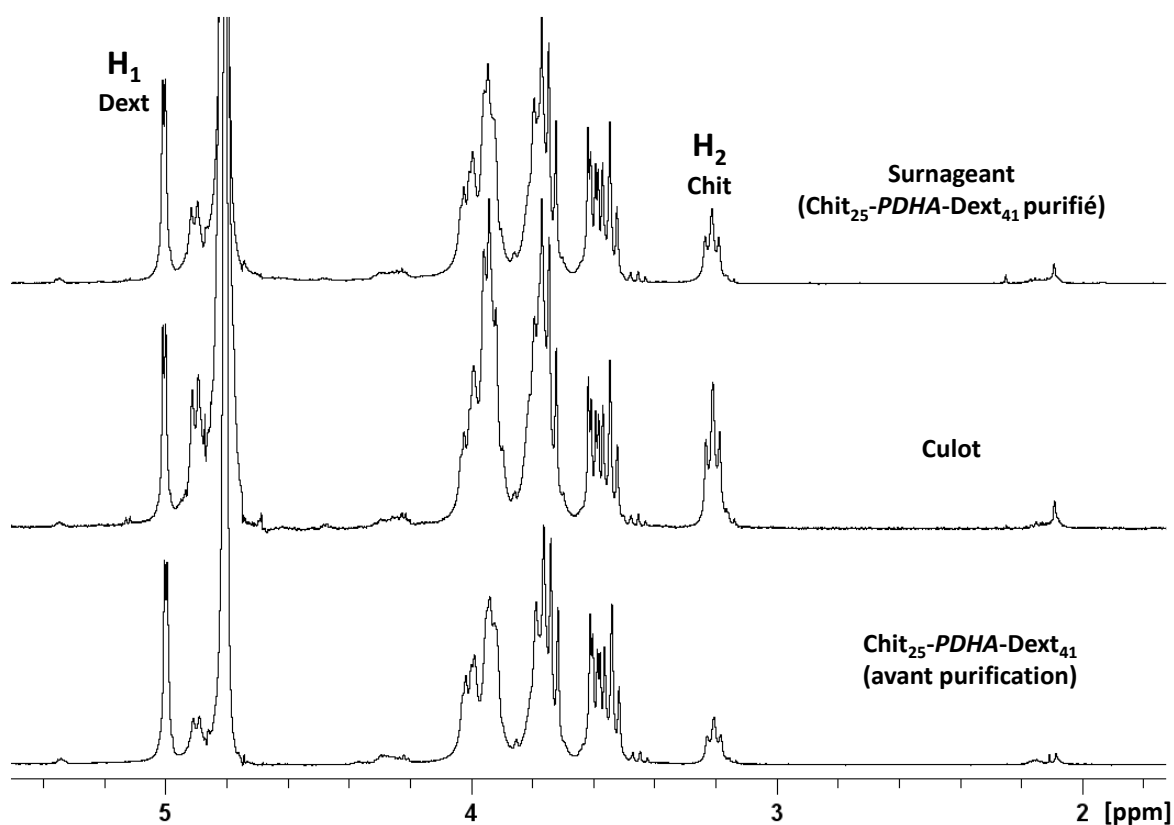


Figure 27. Spectres RMN ^1H du $\text{Chit}_{25}\text{-PDHA-Dext}_{41}$ dans D_2O avant et après purification à pH 6,5.

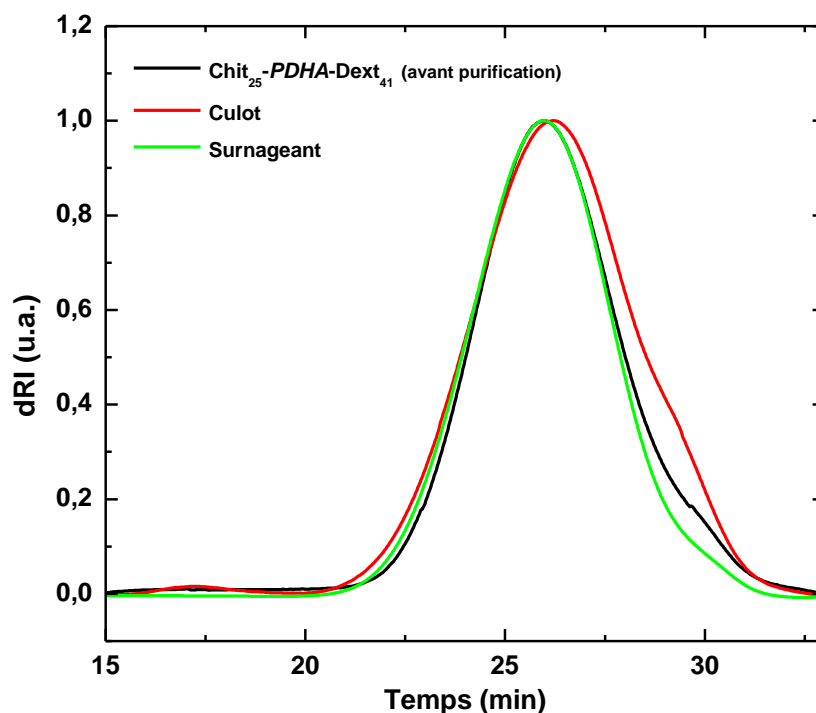


Figure 28. Chromatogrammes SEC (signal dRI) du Chit₂₅-PDHA-Dex₄₁ en tampon acétate pH 4,5, avant et après purification à pH 6,5. Les chromatogrammes ont été normalisés par leur intensité maximale.

Tableau 8. Caractérisation SEC-MALS et RMN ¹H du culot et du surnageant après précipitation/centrifugation du Chit₂₅-PDHA-Dex₄₁ à pH 6,5.

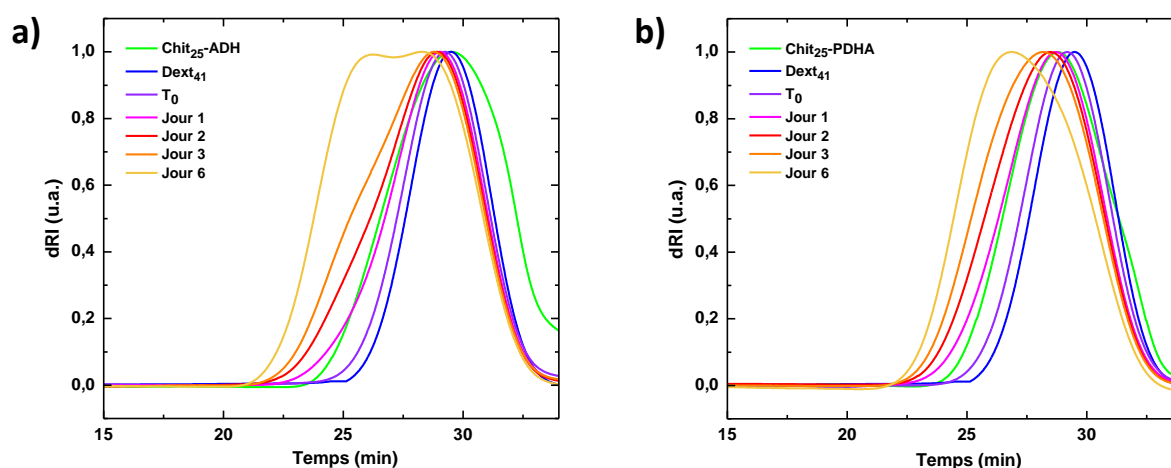
Composé	Teneur en chitosane (%m)	M _n SEC (g/mol)	Đ
Chit₂₅-PDHA-Dex₄₁ (avant purification)	43	11 700	1,20
Culot	58	9 900	1,27
Surnageant	40	12 000	1,23

Le polymère présent dans le surnageant a une composition et une masse molaire proches de celles attendues pour le copolymère. Le culot est quant à lui principalement constitué de chitosane libre avec une faible fraction de copolysaccharide, ce qui représente 11% de la masse totale du copolymère non purifié (Tableau 9). Cependant, la proportion de polymère dans le culot augmente jusqu'à 29% à un pH de 7,0, ce qui indique la précipitation d'une fraction substantielle de copolymère à des pHs plus élevés en raison de l'insolubilité des blocs de chitosane (Tableau 9). Par conséquent, un pH de 6,5 semble être le plus approprié pour éliminer sélectivement l'excès de chitosane par précipitation tout en limitant la perte en copolymère. Ce pH est compatible à la fois avec le Chit₂₅ et le Chit₅₀ car leurs pHs critiques de solubilité sont proches (Figure 35). Pour des blocs de chitosane de plus faible taille (DP < 25), des valeurs de pH plus élevées seraient nécessaires pour extraire sélectivement le chitosane libre, leur solubilité augmentant de manière significative lorsque la masse molaire diminue [30].

Tableau 9. Compositions et fractions massiques en polymère dans le culot et le surnageant après centrifugation des solutions de Chit₂₅-PDHA-Dext₄₁ à différents pHs.

	pH 6,5	pH 6,7	pH 7,0
m_{culot} (mg)	2,8	4,4	6,9
m_{surnageant} (mg)	22,4	20,3	17,2
Culot (%m)	11	18	29

Méthode de couplage II. Une deuxième approche consiste à faire réagir du chitosane fonctionnalisé par l'ADH/PDHA avec du dextrane dans les mêmes conditions expérimentales (pH, température, concentration en polymère) que celles utilisées précédemment (méthode I). Plus précisément, 1 équivalent de Chit₂₅-ADH/PDHA a réagi avec 3 équivalents de Dext₄₁ à pH 4,0 avec des ajouts quotidiens de 10 équivalents de NaBH₃CN. La cinétique de couplage de cette réaction est plus lente que la précédente en raison de la disponibilité réduite des groupes aldéhyde à l'extrémité réductrice du dextrane par rapport à l'unité M du chitosane. Étonnamment, la masse molaire du copolymère obtenu après 6 jours de réaction dépasse la masse théorique attendue pour un copolymère linéaire Chit₂₅-b-Dext₄₁, que ce soit avec l'ADH ou le PDHA comme agent de couplage (Figure 29 et Tableau 10).

**Figure 29.** Suivi SEC (signal dRI) des réactions a) Chit₂₅-ADH + 3 eq. Dext₄₁ et b) Chit₂₅-PDHA + 3 eq. Dext₄₁. Toutes les réactions ont été effectuées en conditions réductrices avec des ajouts quotidiens de 10 eq. de NaBH₃CN. Les analyses ont été réalisées par injection directe du milieu réactionnel après dilution en tampon acétate pH 4,5. Les chromatogrammes ont été normalisés par leur intensité maximale.**Tableau 10.** Caractérisation SEC-MALS des copolysaccharides obtenus par la méthode de couplage II.

Copolysaccharide	M _n théorique (g/mol)	M _n SEC (g/mol)	Đ
Chit ₂₅	-	4 300	1,31
Dext ₄₁	-	8 100	1,22
Chit ₂₅ -ADH-Dext ₄₁ (jour 6)	12 400	15 200	1,76
Chit ₂₅ -PDHA-Dext ₄₁ (jour 6)	12 400	14 600	1,60

Les réactions de *self-branching* ne peuvent être envisagées pour expliquer l'obtention de ces masses molaires particulièrement élevées car l'aldéhyde de l'unité M n'est pas disponible car fonctionnalisé avec ADH/PDHA. Par conséquent, l'augmentation de la masse molaire ne peut être due qu'au greffage de blocs de dextrane sur les amines latérales du chitosane, en plus du couplage en bout de chaîne. Cela suggère, que dans de telles conditions réductrices, ni la réactivité de l'hydrazide ni celle de l'oxyamine en bout de chaîne du chitosane ne peuvent rivaliser avec les amines latérales du chitosane, bien plus nombreuses. Dans la littérature, plusieurs études ont décrit le greffage de sucres réducteurs, comme le lactose, le galactose ou le dextrane, sur les amines latérales du chitosane par amination réductrice, en particulier en présence de cyanoborohydrure de sodium [52],[53]. Un essai de greffage de dextrane sur le chitosane initial de 41 kDa (Chit₂₅₂), dépourvu d'unité M à son extrémité réductrice, a été effectué pour vérifier la théorie du greffage latéral du chitosane. Le nombre d'équivalents de chaînes de dextrane par rapport aux fonctions amine du chitosane a été fixé à 2:5, avec des conditions expérimentales similaires à celles utilisées précédemment. La quantité de dextrane libre diminue au cours du temps tandis que la masse molaire du copolymère augmente (Figure 30 et Tableau 11). Après 14 jours de réaction, presque toutes les chaînes de dextrane sont greffées sur le chitosane. Le degré de branchement final est alors de 38%.

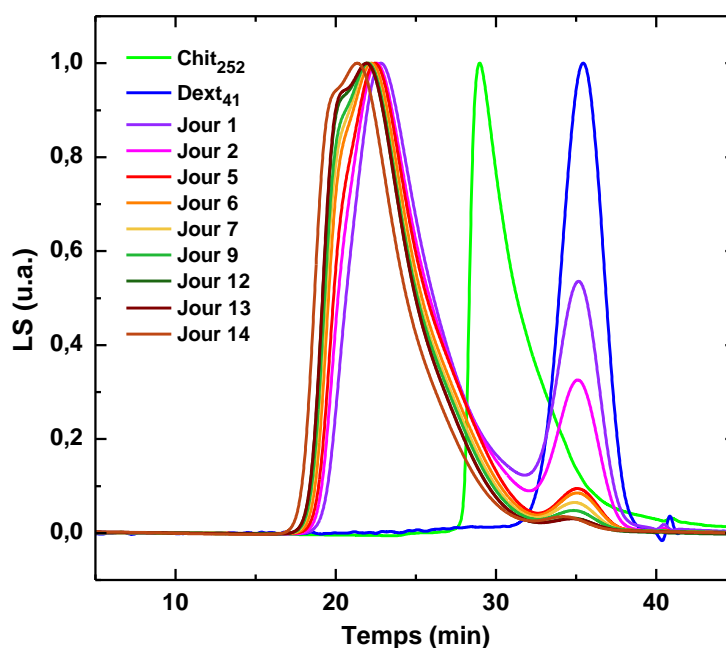


Figure 30. Suivi SEC (signal LS) de la réaction Chit₂₅₂ + 3 eq. Dext₄₁. La réaction a été effectuée en conditions réductrices avec des ajouts quotidiens de 10 eq. de NaBH₃CN. Les analyses ont été réalisées par injection directe du milieu réactionnel après dilution en tampon acétate pH 4,5. Les chromatogrammes ont été normalisés par leur intensité maximale. Pour cette réaction, le signal LS était plus approprié que le DRI pour suivre l'augmentation de la masse molaire du copolymère dextrane-*g*-chitosane.

Tableau 11. Caractérisation par SEC-MALS des copolysaccharides greffés.

Copolysaccharide	M_n théorique (g/mol)	M_n SEC (g/mol)	\bar{D}	Degré de branchement (%)
Chit ₂₅₂	-	41 000	1,40	-
Dext ₄₁	-	8 100	1,22	-
Dext ₄₁ -g-Chit ₂₅₂ (jour 1)	-	221 000	2,54	8,8
Dext ₄₁ -g-Chit ₂₅₂ (jour 2)	-	292 000	2,05	12,3
Dext ₄₁ -g-Chit ₂₅₂ (jour 5)	-	402 000	2,74	17,7
Dext ₄₁ -g-Chit ₂₅₂ (jour 6)	-	410 000	2,23	18,1
Dext ₄₁ -g-Chit ₂₅₂ (jour 7)	-	445 000	2,69	19,8
Dext ₄₁ -g-Chit ₂₅₂ (jour 9)	-	631 000	2,55	28,9
Dext ₄₁ -g-Chit ₂₅₂ (jour 12)	-	610 000	2,35	27,9
Dext ₄₁ -g-Chit ₂₅₂ (jour 13)	-	793 000	2,63	36,8
Dext ₄₁ -g-Chit ₂₅₂ (jour 14)	871 000	810 000	2,27	37,6

En conclusion, la deuxième voie de couplage n'est pas appropriée à la synthèse de copolysaccharides à blocs linéaires à partir de chitosane fonctionnalisé et de dextrane. De plus, dans ce cas-ci, l'utilisation d'un excès plus important de chitosane fonctionnalisé n'est pas une option envisageable car le nombre d'amines primaires du chitosane augmentera également.

Bibliothèque de copolysaccharides. La méthode optimale de synthèse des copolysaccharides à blocs linéaires consiste à faire réagir du chitosane présentant une unité M en bout de chaîne avec 3 équivalents de dextrane-PDHA en conditions aqueuses à pH 4,0 et à température ambiante. La réduction, si nécessaire, est réalisée avec 5 x 10 équivalents de NaBH₃CN. Différentes compositions de copolymères ont été ciblées en utilisant du Chit₂₅ et du Chit₅₀, couplés avec du Dext₂₀, du Dext₄₁ et du Dext₈₆, fonctionnalisés avec du PDHA. Les copolymères sous leur forme réduite ont été analysés par RMN ¹H (Figure 31) et SEC-MALS (Figure 32) après extraction du chitosane libre à pH 6,5. Le décalage des chromatogrammes associé à l'augmentation de la masse molaire a pu être clairement identifié par SEC pour toutes les compositions de copolymères à blocs (Figure 32). La méthode utilisée pour l'extraction du chitosane libre par précipitation sélective s'est avérée efficace pour toutes les compositions de copolymères, comme le montre la diminution systématique de la teneur en chitosane après purification (Figure 31 et Tableau 12). Toutefois, il convient de noter que la teneur finale en chitosane peut être aussi influencée par le fractionnement des copolymères à pH 6,5. Les fractions de copolymères contenant les plus longs blocs de chitosane ont tendance à précipiter plus efficacement, ce qui se traduit par une teneur en chitosane plus faible dans le copolymère purifié (Tableau 12). De ce point de vue, la chromatographie préparative par filtration sur gel serait une méthode plus appropriée pour purifier les copolymères. Des copolymères greffés ont également été préparés à partir de Chit₂₅₂ et de Dext₄₁. Les degrés de branchement visés sont de 15, 25 et 40%. Après 14 jours de réaction avec des ajouts quotidiens de NaBH₃CN, la masse molaire du copolymère final correspond à un rendement quasiment quantitatif de la réaction (Tableau 12).

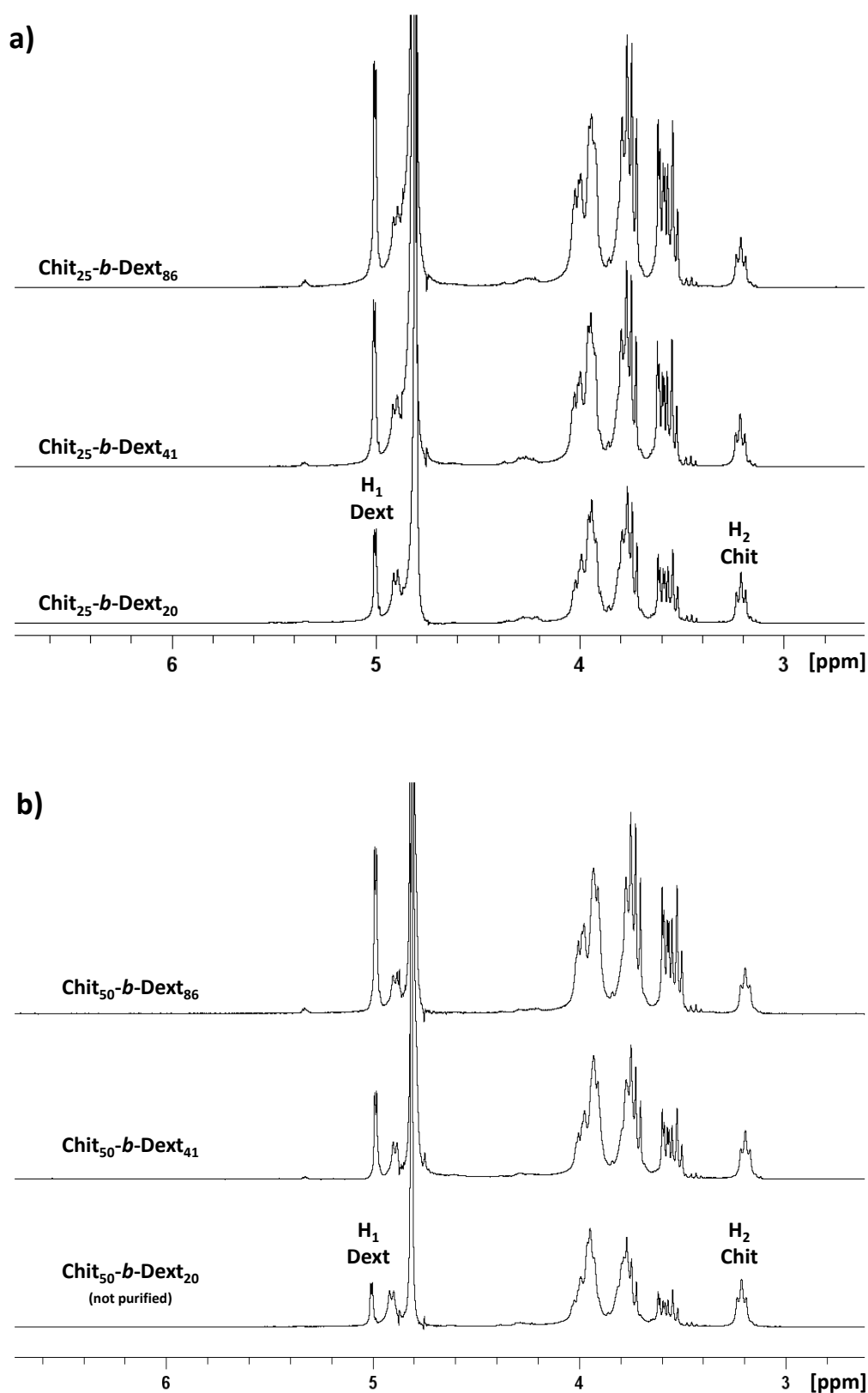


Figure 31. Spectres RMN ^1H des copolysaccharides à blocs linéaires après purification par précipitation sélective du chitosane libre à pH 6,5. a) Chit₂₅-*b*-Dext₂₀, Chit₂₅-*b*-Dext₄₁ et Chit₂₅-*b*-Dext₈₆ et b) Chit₅₀-*b*-Dext₂₀ (non purifié), Chit₅₀-*b*-Dext₄₁ et Chit₅₀-*b*-Dext₈₆.

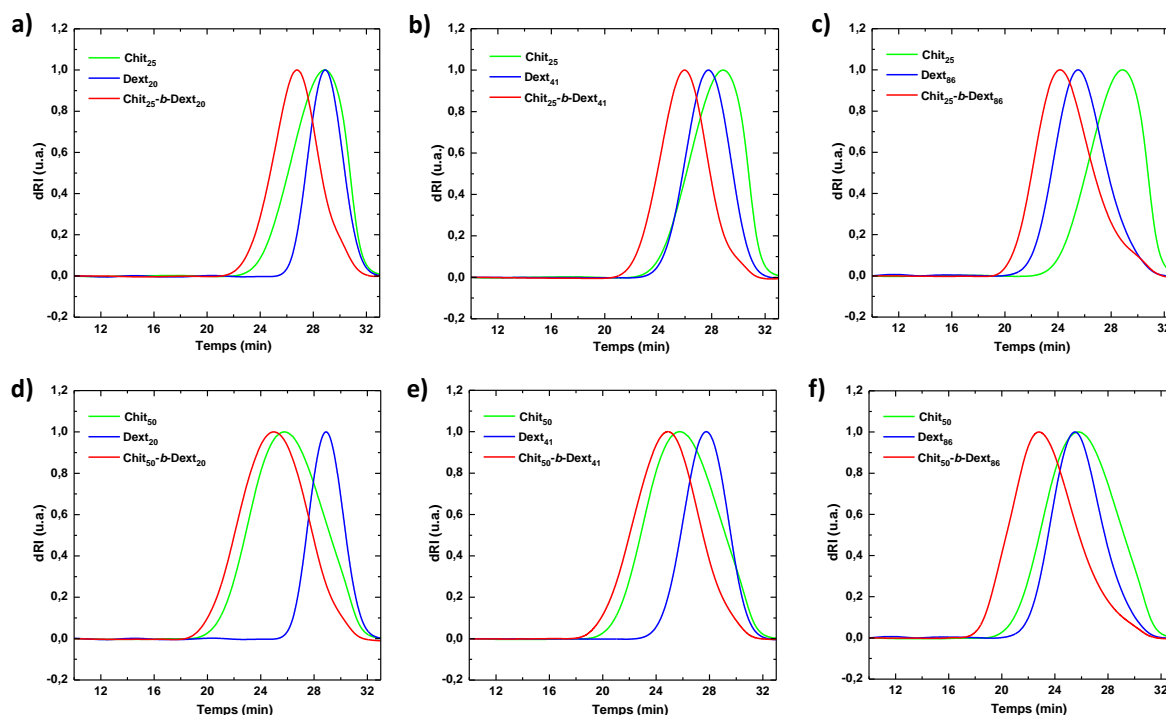


Figure 32. Chromatogrammes SEC (signal dRI) des copolysaccharides à blocs purifiés et de leurs précurseurs en tampon acétate pH 4,5. a) Chit₂₅-*b*-Dext₂₀, b) Chit₂₅-*b*-Dext₄₁, c) Chit₂₅-*b*-Dext₈₆, d) Chit₅₀-*b*-Dext₂₀ (non purifié), e) Chit₅₀-*b*-Dext₄₁ et f) Chit₅₀-*b*-Dext₈₆. Les chromatogrammes ont été normalisés par leur intensité maximale.

Tableau 12. Caractérisation par SEC-MALS et RMN de la bibliothèque de copolysaccharides linéaires Chit_m-*b*-Dext_n et de copolysaccharides greffés Dext_n-*g*^x-Chit_m.

Copolysaccharide	M _n	M _n	M _n	Đ copolymère	dn/dc copolymère (mL/g)	Teneur en chitosane (%m)		Degré de branchement (%)
	chitosane (g/mol)	dextrane (g/mol)	copolymère (g/mol)			Théorie	Exp. ^a	
Chit₂₅-<i>b</i>-Dext₂₀	4 300	4 400	9 200	1,23	0,1479	55	49 (54)	-
Chit₂₅-<i>b</i>-Dext₄₁	4 300	8 100	12 000	1,23	0,1438	38	40 (43)	-
Chit₂₅-<i>b</i>-Dext₈₆	4 300	16 600	23 800	1,48	0,1366	22	28 (31)	-
Chit₅₀-<i>b</i>-Dext₂₀	7 800	4 400	14 700	1,44	0,1553	71	(70)	-
Chit₅₀-<i>b</i>-Dext₄₁	7 800	8 100	20 900	1,39	0,1459	55	53 (56)	-
Chit₅₀-<i>b</i>-Dext₈₆	7 800	16 600	37 900	1,51	0,1377	37	35 (35)	-
Chit₉₀-<i>b</i>-Dext₁₅₂	15 000	37 800	58 700	1,28	0,1363	37	21 (31)	-
Dext₄₁-<i>g</i>³⁶-Chit₂₅₂	41 000	8 100	770 000	2,30	0,1315	-	-	35,7
Dext₄₁-<i>g</i>²²-Chit₂₅₂	41 000	8 100	496 000	2,60	0,1296	-	-	22,3
Dext₄₁-<i>g</i>¹²-Chit₂₅₂	41 000	8 100	293 000	2,58	0,1348	-	-	12,3

^a après purification (avant purification)

Pour évaluer la robustesse de cette méthode de synthèse de copolysaccharides à blocs linéaires, le couplage a été expérimenté avec des blocs de polysaccharides de masses molaires élevées ; à savoir un bloc de chitosane de 14 000 g/mol (Chit₉₀) et un bloc de dextrane de 40 000 g/mol (Dext₁₅₂). Pour ce faire, le Dext₁₅₂ a été préalablement fonctionnalisé avec du PDHA en conditions réductrices. Les mêmes conditions de couplage que celles décrites ci-dessus (concentration massique en polymère, nombre d'équivalents, pH, temps de réaction) ont été appliquées, à la seule différence que la température a été

fixée à 50°C pour l'étape de formation de l'oxime, en raison de l'augmentation de la viscosité du mélange réactionnel. La réaction a été suivie par RMN ^1H car les protons (E) et (Z) de l'oxime sont toujours détectables (Figure 33). Après réduction, le copolymère a été récupéré par précipitation puis purifié. Les analyses RMN ^1H et SEC-MALS attestent du succès de ce couplage de longs blocs de polysaccharides (Figure 33 et Figure 34). A noter que la teneur finale en chitosane dans le copolymère après purification est plus faible que précédemment (Tableau 12), probablement en raison de la plus faible solubilité des longs blocs de chitosane à pH 6,5. Il aurait été avisé d'adapter le pH d'extraction à la longueur du bloc de chitosane. Cependant, même si le rendement est relativement faible en raison des difficultés de purification, la méthode de couplage n'en est pas moins robuste comme en témoignent la formation des imines obtenues avant réduction.

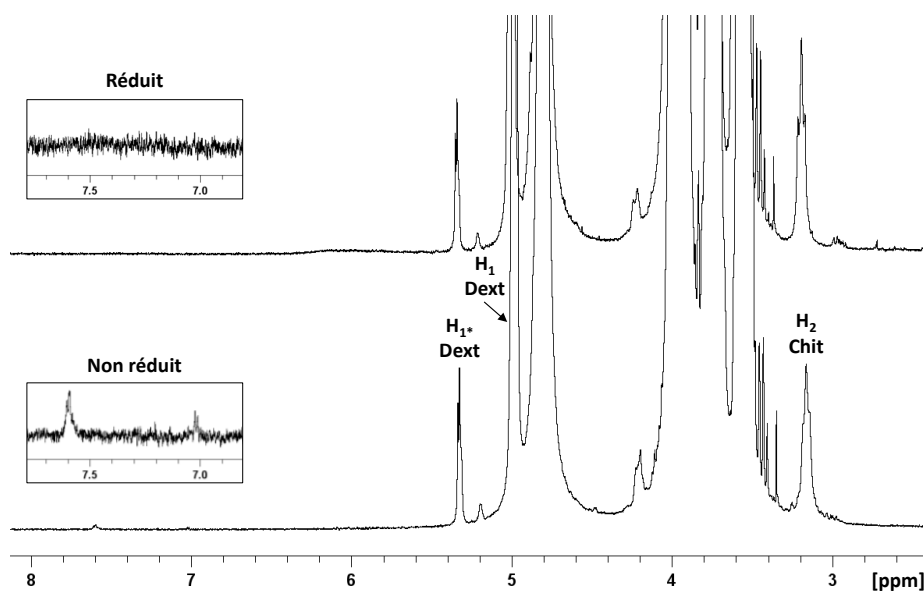


Figure 33. Analyses RMN ^1H du mélange réactionnel du $\text{Chit}_{90} + 3 \text{ eq. de Dext}_{152}$ -PDHA après 12 heures de réaction à 50°C (bas) et après réduction avec $5 \times 10 \text{ eq. de NaBH}_3\text{CN}$ à température ambiante (haut).

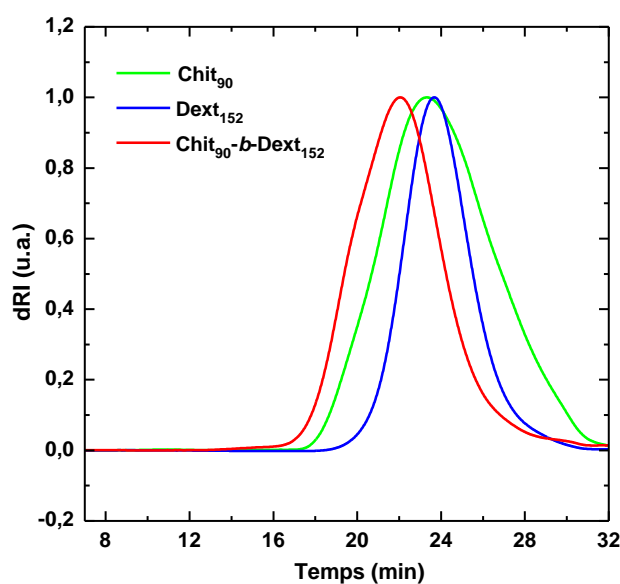


Figure 34. Chromatogrammes SEC (signal dRI) du Chit_{90} - b - Dext_{152} purifié et de ses précurseurs en tampon acétate pH 4,5. Les chromatogrammes ont été normalisés par leur intensité maximale.

3.5. Solubilité des copolysaccharides chitosane-*b*-dextrane dans l'eau

La solubilité du chitosane dans l'eau est influencée à la fois par le pH, la masse molaire et le degré d'acétylation [30],[54],[55]. Pour du chitosane entièrement désacétylé, il a été précédemment démontré que le pH critique de solubilité diminuait de 7,5 à 6,0 lorsque le DP augmentait de 5 à 50 [30]. Les chaînes de chitosane étant couplées à du dextrane, qui est soluble à tout pH, la solubilité des copolymères devrait donc augmenter en conséquence. Plus précisément, ces copolymères devraient être solubles en conditions physiologiques à pH 7,4, les rendant ainsi appropriés pour des applications de délivrance de médicaments et de gènes. La dépendance de la solubilité au pH a été évaluée par diffusion de la lumière, une méthode particulièrement sensible pour détecter l'agrégation des chaînes de polymères au niveau moléculaire, comme indiqué par l'augmentation de l'intensité diffusée lorsque les chaînes se désolvatent. Le résultat le plus surprenant est que la conjugaison du chitosane avec des blocs de dextrane n'a pas complètement empêché les copolysaccharides de précipiter en conditions neutres ou basiques, même pour les copolymères présentant la plus grande fraction massique de dextrane, à savoir le Chit₂₅-*b*-Dext₈₆ (Figure 35). De ce point de vue, les copolymères chitosane-*b*-dextrane ne présentent pas le comportement typique des copolymères à blocs de type double hydrophile, tels que ceux constitués d'une polybase faible (comme la polyhistidine, la poly(2-vinylpyridine) ou le poly(2-(diéthylamino)méthacrylate d'éthyle)) couplée à un bloc hydrophile comme le PEG, qui présentent des propriétés d'auto-assemblage en agrégats micellaires ou vésiculaires à pH supérieur à 8 [56],[57],[58]. Cela peut être expliqué par le fait que les chaînes de chitosane, lorsqu'elles sont neutralisées, peuvent former des liaisons hydrogène intra- et intermoléculaires suffisamment fortes pour atténuer considérablement la dynamique des chaînes copolymères. Dans ces conditions, le copolymère ne peut pas s'auto-assembler. En effet, aucune structure de taille micellaire n'a pu être détectée par DLS à des pHs basiques. L'augmentation du degré d'acétylation du chitosane pourrait potentiellement compenser la précipitation du chitosane mais ce paramètre n'a pas été étudié dans ce travail. Malgré cela, le couplage du chitosane avec du dextrane induit une augmentation de leur plage de solubilité d'au moins une unité de pH pour les compositions de copolymères testées ici (Figure 35). La longueur du bloc dextrane a peu d'influence sur le pH critique de solubilité des copolymères, suggérant ainsi que les liaisons hydrogène formées par le chitosane régissent le comportement des copolymères. Par conséquent, c'est donc la longueur du bloc de chitosane qui influence la solubilité des copolymères. Les copolymères à base de Chit₅₀ ont des valeurs de pH critique légèrement inférieures comparés aux copolymères à base de Chit₂₅ (Figure 35). Le copolymère Chit₅₀-*b*-Dext₂₀, qui n'a pas été purifié, a un pH critique de 6,3 en raison de la présence de chitosane libre qui contribue à l'augmentation précoce de l'intensité diffusée (Figure 35). Il est donc intéressant de mentionner que la diffusion de la lumière est suffisamment sensible pour détecter la présence de chitosane libre et que cette technique est donc appropriée pour évaluer l'efficacité de la procédure de purification du copolymère.

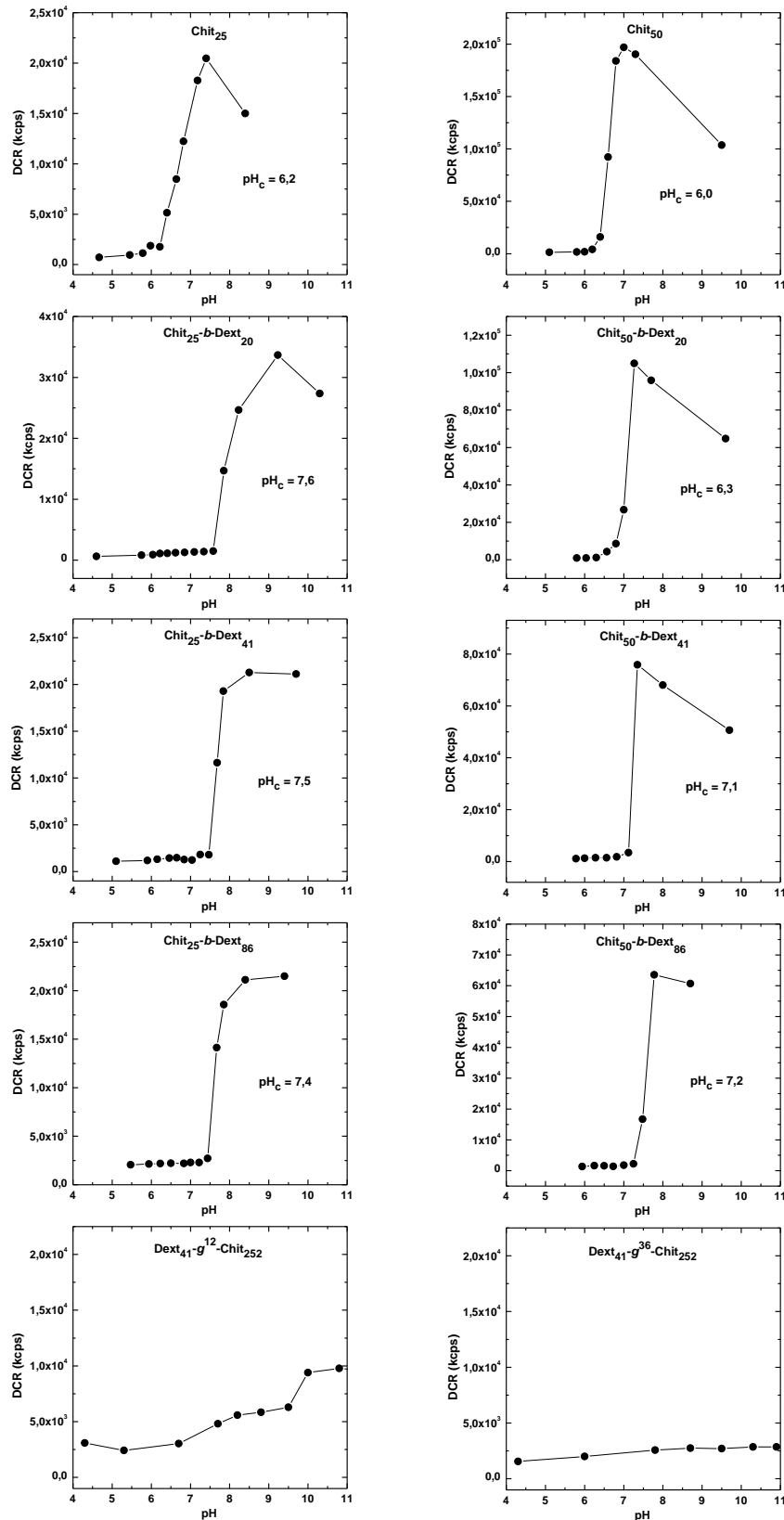


Figure 35. Variation de l'intensité diffusée (DCR) des solutions de copolysaccharides Chit_m-b-Dext_n et Dex_n-g^x-Chit_m à 2 g/L en fonction du pH. Le pH critique (pH_c), correspondant au début de la précipitation, est indiqué sur le graphique.

Les mesures de diffusion de la lumière ayant été effectuées avec un instrument de DLS, une attention particulière a également été portée aux corrélogrammes et aux distributions de tailles des particules formées au-dessus du pH critique. Des nanoparticules de diamètre compris entre 350 nm et 400 nm ont été obtenues autour de pH 7,4, mais uniquement pour les copolymères constitués des blocs de dextrane les plus longs (Dext₈₆) (Figure 36). Une approche par nanopréciipitation a ensuite été réalisée pour évaluer la possibilité de former des particules plus petites par précipitation des copolymères à pH 7,4. Ce procédé consiste à désolvater rapidement le chitosane, favorisant ainsi l'étape de nucléation par rapport à l'étape de croissance ou d'agrégation, ce qui permet de former des particules de petite taille en nombre important. En pratique, cela a consisté à dissoudre les copolymères à pH 4,0 et à les ajouter rapidement dans un excès de tampon MOPS 50 mM à pH 7,4 contenant 100 mM de NaCl. Cette approche s'est révélée efficace pour obtenir des nanoparticules relativement stables, avec des tailles variant entre 100 nm et 400 nm, mais uniquement pour les copolymères contenant le bloc de dextrane le plus long (Dext₈₆) (Figure 36). Cela peut s'expliquer par le fait qu'une fois les particules formées, elles ont une forte tendance à s'agréger en raison des liaisons hydrogène formées entre les blocs de chitosane neutralisés. Dans ces conditions, les blocs de dextrane doivent être suffisamment longs pour créer une barrière stérique à la surface des particules, générant ainsi des forces répulsives suffisamment fortes pour contrer l'agrégation des particules [59]. Les particules obtenues par nanopréciipitation sont dans un état figé, ce qui signifie que la dynamique des chaînes de copolymères est trop lente pour créer un équilibre dynamique entre les unimères et les particules. L'obtention de véritables structures micellaires nécessiterait une longueur de dextrane significativement plus importante ou une longueur chitosane beaucoup plus faible. Dans ces conditions, des micelles en étoile pourraient être obtenues.

Les copolysaccharides greffés dextrane-*g*-chitosane présentent un comportement très différent dans la gamme de composition étudiée. Le Dext₄₁-*g*³⁶-Chit₂₅₂ (DB 36%) est soluble même à pH très basique (Figure 36). Une légère augmentation de l'intensité diffusée a pu être observée pour le Dext₄₁-*g*¹²-Chit₂₅₂ (DB 12%) mais aucun phénomène de précipitation n'a été observé (Figure 36). Le greffage latéral de chaînes de dextrane sur le chitosane augmente considérablement son hydrophilie et réduit également la formation de liaisons hydrogène entre les amines lorsqu'elles ne sont plus protonées. Ceci est non seulement dû à la réduction significative du nombre de groupes aminés libres, mais surtout à la présence d'une barrière stérique qui empêche l'agrégation des chaînes de chitosane à pH neutre et basique. La forte solubilité des copolymères greffés dextrane-*g*-chitosane peut être intéressante pour plusieurs applications en conditions physiologiques. Cependant, la disponibilité réduite des amines pourrait altérer leurs propriétés complexantes.

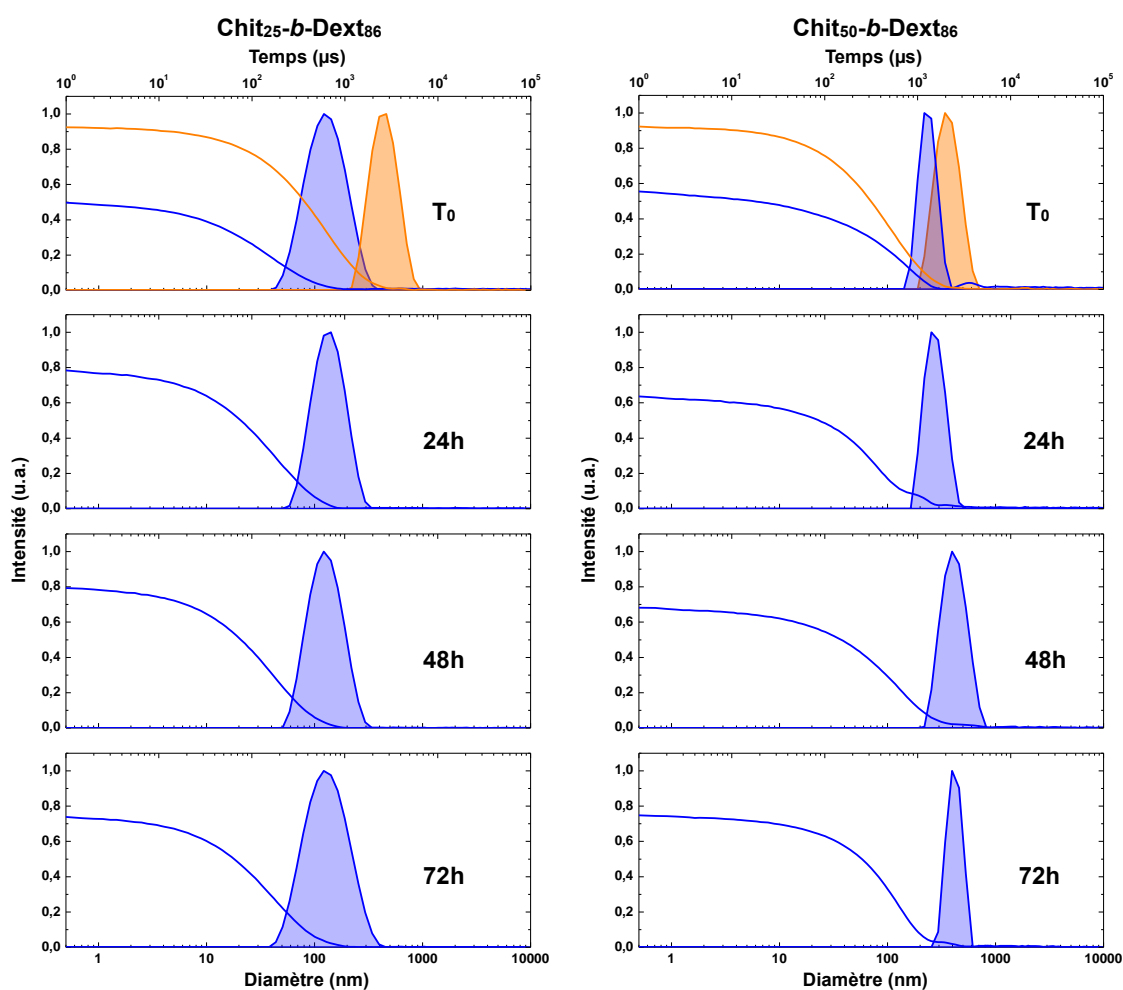


Figure 36. Analyse par DLS des particules formées en augmentant le pH des solutions de copolysaccharide de 4,0 à 7,4 : (courbes oranges) augmentation progressive du pH et (courbes bleues) nanoprécipitation par ajout rapide de la solution de copolysaccharide dans un tampon MOPS 50 mM à pH 7,4. Les fonctions d'autocorrélation et les distributions de tailles sont représentées. La stabilité des particules obtenues par nanoprécipitation a été suivie sur une période de 72 heures.

4. CONCLUSION

Dans ce travail, une méthode pour synthétiser des copolysaccharides à blocs linéaires à partir de chitosane et de dextrane a été décrite. Cette approche repose sur le couplage des extrémités réductrices de ces polysaccharides par l'intermédiaire de diamines. Cette stratégie présente plusieurs difficultés ; tout d'abord, les extrémités réductrices des polysaccharides sont peu réactives en milieu aqueux en raison de la faible disponibilité de la forme aldéhyde, en équilibre majoritaire avec la forme hémiacétal. Dans le cas du chitosane, une unité M très réactive peut être générée à son extrémité réductrice par dégradation du chitosane en présence de nitrite de sodium. À l'inverse, le dextrane possède une extrémité réductrice classique, donc moins réactive. Une deuxième difficulté est liée aux propriétés de solubilité du chitosane, qui n'est soluble qu'en conditions légèrement acides, typiquement à un pH inférieur à 6. Ce pH n'est cependant pas adapté à l'amination des extrémités réductrices avec des diamines classiques, car celles-ci sont protonées à un tel pH, ce qui diminue leur réactivité, comme cela a été démontré avec le diaminobutane. De plus, lorsqu'il s'agit de coupler des blocs polysaccharides de

grande taille, la faible probabilité de rencontre des extrémités réductrices doit être compensée par une réactivité élevée de l'agent de couplage. Dans ce contexte, il a été démontré que les dihydrazides (ADH) ou dioxyamines (PDHA) sont beaucoup plus adaptées au couplage des polysaccharides en raison de leur forte nucléophilie et de leur faible basicité, ce qui permet de réaliser la réaction en milieu acide, à pH 4. Il est important de noter que les liaisons oxime formées avec le PDHA sont plus résistantes à l'hydrolyse acide que les liaisons hydrazone formées avec l'ADH. Avec le PDHA, il est donc possible de coupler des blocs de polysaccharides en conditions non réductrices. Cela pourrait être aussi avantageux pour induire la dissociation des copolymères par un brusque changement de pH ou en présence d'enzymes capables d'effectuer des réactions de transimination. La réduction des oximes en amines en présence de NaBH_3CN est plus lente que celle des hydrazones, en lien avec la stabilité plus élevée des oximes. Parmi les différentes méthodes de couplage, il a été démontré que la meilleure approche consiste à coupler le chitosane portant une unité M au dextrane fonctionnalisé par du PDHA. Cette approche a permis d'obtenir des copolysaccharides à blocs linéaires de masses molaires supérieures à 50 000 g/mol. L'obtention de copolymères de masse molaire plus élevée se heurte à des difficultés davantage liées à des facteurs physiques que chimiques, tels que la viscosité du milieu réactionnel, l'enchevêtrement des chaînes et l'encombrement stérique. À l'inverse, le couplage du chitosane-PDHA avec un excès de dextrane conduit à la formation d'un copolymère greffé ; l'extrémité réductrice des blocs de dextrane réagit avec les amines latérales des chaînes de chitosane. Cela peut sembler étonnant au premier abord, mais plusieurs facteurs peuvent l'expliquer : i) la basicité relativement faible des amines du chitosane ($\text{pK}_a \sim 6,5$), ii) l'abondance des amines du chitosane par rapport à celles du PDHA, et iii) les conditions réductrices employées. Bien que les copolymères greffés dextrane-*g*-chitosane soient plus simples à synthétiser, ces structures ne conservent pas les propriétés de complexation du chitosane natif, contrairement aux copolymères linéaires.

Les propriétés de solubilité des copolymères linéaires chitosane-*b*-dextrane sont nettement différentes de celles typiquement observées avec des copolymères à blocs de type double hydrophile. Plus précisément, les copolymères chitosane-*b*-dextrane ne sont pas capables de s'auto-assembler en structures micellaires lors de la neutralisation des blocs de chitosane. Au lieu de cela, ces copolymères ont tendance à précipiter dans des conditions de pH légèrement basiques en raison des fortes liaisons hydrogène formées entre les amines neutralisées du chitosane. Néanmoins, la gamme de solubilité des copolymères a été étendue d'une unité de pH comparée au chitosane, ce qui les rend potentiellement utilisables en conditions physiologiques (pH 7,4). Les applications de délivrance de gènes sont particulièrement ciblées dans ce travail en raison des propriétés de complexation de ces copolymères à blocs.

REFERENCES

- [1] S. Dumitriu, Éd., *Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility, Second Edition*, éd. CRC Press, 2004. doi: 10.1201/9781420030822.
- [2] P. Sorlier, A. Denuzière, C. Viton, et A. Domard, « Relation between the Degree of Acetylation and the Electrostatic Properties of Chitin and Chitosan », *Biomacromolecules*, vol. 2, n° 3, p. 765-772, sept. 2001, doi: 10.1021/bm015531+.
- [3] D. A. Brant, Éd., *Solution Properties of Polysaccharides*, vol. 150. in ACS Symposium Series, vol. 150. WASHINGTON, D. C.: AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, 1981. doi: 10.1021/bk-1981-0150.
- [4] M. Rief, J. M. Fernandez, et H. E. Gaub, « Elastically Coupled Two-Level Systems as a Model for Biopolymer Extensibility », *Phys. Rev. Lett.*, vol. 81, n° 21, p. 4764-4767, nov. 1998, doi: 10.1103/PhysRevLett.81.4764.
- [5] J. A. White et W. M. Deen, « Agarose-Dextran Gels as Synthetic Analogs of Glomerular Basement Membrane: Water Permeability », *Biophysical Journal*, vol. 82, n° 4, p. 2081-2089, avr. 2002, doi: 10.1016/S0006-3495(02)75555-0.
- [6] G. Berth, H. Dautzenberg, et M. G. Peter, « Physico-chemical characterization of chitosans varying in degree of acetylation », *Carbohydrate Polymers*, vol. 36, n° 2-3, p. 205-216, juill. 1998, doi: 10.1016/S0144-8617(98)00029-0.
- [7] C. Schatz, C. Viton, T. Delair, C. Pichot, et A. Domard, « Typical Physicochemical Behaviors of Chitosan in Aqueous Solution », *Biomacromolecules*, vol. 4, n° 3, p. 641-648, mai 2003, doi: 10.1021/bm025724c.
- [8] M. X. Weinhold et J. Thöming, « On conformational analysis of chitosan », *Carbohydrate Polymers*, vol. 84, n° 4, p. 1237-1243, avr. 2011, doi: 10.1016/j.carbpol.2011.01.011.
- [9] C. Schatz et S. Lecommandoux, « Polysaccharide-Containing Block Copolymers: Synthesis, Properties and Applications of an Emerging Family of Glycoconjugates », *Macromol. Rapid Commun.*, vol. 31, n° 19, p. 1664-1684, oct. 2010, doi: 10.1002/marc.201000267.
- [10] A. S. Volokhova, K. J. Edgar, et J. B. Matson, « Polysaccharide-containing block copolymers: synthesis and applications », *Mater. Chem. Front.*, vol. 4, n° 1, p. 99-112, 2020, doi: 10.1039/C9QM00481E.
- [11] J. P. Dworkin et S. L. Miller, « A kinetic estimate of the free aldehyde content of aldoses », *Carbohydrate Research*, vol. 329, n° 2, p. 359-365, nov. 2000, doi: 10.1016/S0008-6215(00)00204-4.
- [12] J. M. Los, L. B. Simpson, et K. Wiesner, « The Kinetics of Mutarotation of D-Glucose with Consideration of an Intermediate Free-aldehyde Form », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 78, n° 8, p. 1564-1568, avr. 1956, doi: 10.1021/ja01589a017.
- [13] R. F. Borch, M. D. Bernstein, et H. D. Durst, « Cyanohydrinborate anion as a selective reducing agent », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 93, n° 12, p. 2897-2904, juin 1971, doi: 10.1021/ja00741a013.
- [14] W. T. E. Bosker, K. Ágoston, M. A. Cohen Stuart, W. Norde, J. W. Timmermans, et T. M. Slaghek, « Synthesis and Interfacial Behavior of Polystyrene-Polysaccharide Diblock Copolymers », *Macromolecules*, vol. 36, n° 6, p. 1982-1987, mars 2003, doi: 10.1021/ma020925u.
- [15] B. B. Breitenbach, I. Schmid, et P. R. Wich, « Amphiphilic Polysaccharide Block Copolymers for pH-Responsive Micellar Nanoparticles », *Biomacromolecules*, vol. 18, n° 9, p. 2839-2848, sept. 2017, doi: 10.1021/acs.biomac.7b00771.
- [16] R. Novoa-Carballal et A. H. E. Müller, « Synthesis of polysaccharide-b-PEG block copolymers by oxime click », *Chem. Commun.*, vol. 48, n° 31, p. 3781, 2012, doi: 10.1039/c2cc30726j.
- [17] M. Coudurier *et al.*, « Reducing-End Functionalization of 2,5-Anhydro-d-mannofuranose-Linked Chitooligosaccharides by Dioxyamine: Synthesis and Characterization », *Molecules*, vol. 25, n° 5, p. 1143, mars 2020, doi: 10.3390/molecules25051143.
- [18] I. V. Mo *et al.*, « Activation of enzymatically produced chitooligosaccharides by dioxyamines and dihydrazides », *Carbohydrate Polymers*, vol. 232, p. 115748, mars 2020, doi: 10.1016/j.carbpol.2019.115748.
- [19] A. Moussa, A. Crépet, C. Ladavière, et S. Trombotto, « Reducing-end “clickable” functionalizations of chitosan oligomers for the synthesis of chitosan-based diblock copolymers », *Carbohydrate Polymers*, vol. 219, p. 387-394, sept. 2019, doi: 10.1016/j.carbpol.2019.04.078.
- [20] A. Solberg, I. V. Mo, F. L. Aachmann, C. Schatz, et B. E. Christensen, « Alginate-based diblock polymers: preparation, characterization and Ca-induced self-assembly », *Polym. Chem.*, vol. 12, n° 38, p. 5412-5425, 2021, doi: 10.1039/D1PY00727K.
- [21] I. V. Mo, M. Ø. Dalheim, F. L. Aachmann, C. Schatz, et B. E. Christensen, « 2,5-Anhydro-D-Mannose End-Functionalized Chitin Oligomers Activated by Dioxyamines or Dihydrazides as Precursors of Diblock Oligosaccharides », *Biomacromolecules*, vol. 21, n° 7, p. 2884-2895, juill. 2020, doi: 10.1021/acs.biomac.0c00620.

- [22] O. R. Baudendistel, D. E. Wieland, M. S. Schmidt, et V. Wittmann, « Real-Time NMR Studies of Oxyamine Ligations of Reducing Carbohydrates under Equilibrium Conditions », *Chem. Eur. J.*, vol. 22, n° 48, p. 17359-17365, nov. 2016, doi: 10.1002/chem.201603369.
- [23] Y. A. Kwase, M. Cochran, et M. Nitz, « Protecting-Group-Free Glycoconjugate Synthesis: Hydrazide and Oxyamine Derivatives in N-Glycoside Formation », in *Modern Synthetic Methods in Carbohydrate Chemistry*, 1^{re} éd., D. B. Werz et S. Vidal, Éd., Wiley, 2013, p. 67-96. doi: 10.1002/9783527658947.ch3.
- [24] H. S. El Khadem et A. J. Fatiadi, « Hydrazine derivatives of carbohydrates and related compounds », in *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, vol. 55, Elsevier, 2000, p. 175-263. doi: 10.1016/S0065-2318(00)55006-9.
- [25] D. K. Kölmel et E. T. Kool, « Oximes and Hydrazones in Bioconjugation: Mechanism and Catalysis », *Chem. Rev.*, vol. 117, n° 15, p. 10358-10376, août 2017, doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00090.
- [26] J. O. Edwards et R. G. Pearson, « The Factors Determining Nucleophilic Reactivities », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 84, n° 1, p. 16-24, janv. 1962, doi: 10.1021/ja00860a005.
- [27] T. Hansen, P. Vermeeren, F. M. Bickelhaupt, et T. A. Hamlin, « Origin of the α -Effect in S_N2 Reactions », *Angew Chem Int Ed*, vol. 60, n° 38, p. 20840-20848, sept. 2021, doi: 10.1002/anie.202106053.
- [28] J. Kalia et R. T. Raines, « Hydrolytic Stability of Hydrazones and Oximes », *Angew Chem Int Ed*, vol. 47, n° 39, p. 7523-7526, sept. 2008, doi: 10.1002/anie.200802651.
- [29] C. Chapelle *et al.*, « Water-Soluble 2,5-Anhydro- D -mannofuranose Chain End Chitosan Oligomers of a Very Low Molecular Weight: Synthesis and Characterization », *Biomacromolecules*, vol. 20, n° 12, p. 4353-4360, déc. 2019, doi: 10.1021/acs.biomac.9b01003.
- [30] T. Delas *et al.*, « Effects of Chain Length of Chitosan Oligosaccharides on Solution Properties and Complexation with siRNA », *Polymers*, vol. 11, n° 8, p. 1236, juill. 2019, doi: 10.3390/polym11081236.
- [31] K. Tømmeraas, K. M. Vårum, B. E. Christensen, et O. Smidsrød, « Preparation and characterisation of oligosaccharides produced by nitrous acid depolymerisation of chitosans », *Carbohydrate Research*, vol. 333, n° 2, p. 137-144, juill. 2001, doi: 10.1016/S0008-6215(01)00130-6.
- [32] P. K. Glasoe et F. A. Long, « USE OF GLASS ELECTRODES TO MEASURE ACIDITIES IN DEUTERIUM OXIDE ^{1,2} », *J. Phys. Chem.*, vol. 64, n° 1, p. 188-190, janv. 1960, doi: 10.1021/j100830a521.
- [33] G. G. Allan et M. Peyron, « Molecular weight manipulation of chitosan II: prediction and control of extent of depolymerization by nitrous acid », *Carbohydrate Research*, vol. 277, n° 2, p. 273-282, nov. 1995, doi: 10.1016/0008-6215(95)00208-B.
- [34] E. Gemma, O. Meyer, D. Uhrin, et A. N. Hulme, « Enabling methodology for the end functionalisation of glycosaminoglycan oligosaccharides », *Mol. Biosyst.*, vol. 4, n° 6, p. 481, 2008, doi: 10.1039/b801666f.
- [35] T. Wanjun, W. Cunxin, et C. Donghua, « Kinetic studies on the pyrolysis of chitin and chitosan », *Polymer Degradation and Stability*, vol. 87, n° 3, p. 389-394, mars 2005, doi: 10.1016/j.polymerdegradstab.2004.08.006.
- [36] K. Tømmeraas, M. Köping-Höggård, K. M. Vårum, B. E. Christensen, P. Artursson, et O. Smidsrød, « Preparation and characterisation of chitosans with oligosaccharide branches », *Carbohydrate Research*, vol. 337, n° 24, p. 2455-2462, nov. 2002, doi: 10.1016/S0008-6215(02)00334-8.
- [37] K. Tømmeraas, S. P. Strand, B. E. Christensen, O. Smidsrød, et K. M. Vårum, « Preparation and characterization of branched chitosans », *Carbohydrate Polymers*, vol. 83, n° 4, p. 1558-1564, févr. 2011, doi: 10.1016/j.carbpol.2010.10.008.
- [38] N. Cheetham, E. Fiala-Beer, et G. Walker, « Dextran Structural Details from High-Field Proton NMR Spectroscopy », in *Carbohydrate Polymers*, 1989.
- [39] D. Gagnaire et M. Vignon, « Étude par ¹³C NMR et ¹H NMR du dextrane et de ses dérivés acétylés et benzylés », *Makromol. Chem.*, vol. 178, n° 8, p. 2321-2333, août 1977, doi: 10.1002/macp.1977.021780819.
- [40] I. Benzeval, A. Bowyer, et J. Hubble, « The influence of degree-of-branching and molecular mass on the interaction between dextran and Concanavalin A in hydrogel preparations intended for insulin release », *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 80, n° 1, p. 143-148, janv. 2012, doi: 10.1016/j.ejpb.2011.08.009.
- [41] W. P. Jencks, « Mechanism and Catalysis of Simple Carbonyl Group Reactions », in *Progress in Physical Organic Chemistry*, 1^{re} éd., vol. 2, S. G. Cohen, A. Streitwieser, et R. W. Taft, Éd., Wiley, 1964, p. 63-128. doi: 10.1002/9780470171813.ch2.
- [42] C. F. Lane, « Sodium Cyanoborohydride - A Highly Selective Reducing Agent for Organic Functional Groups », *Synthesis*, vol. 1975, n° 03, p. 135-146, 1975, doi: 10.1055/s-1975-23685.

- [43] A. V. Gudmundsdottir, C. E. Paul, et M. Nitz, « Stability studies of hydrazide and hydroxylamine-based glycoconjugates in aqueous solution », *Carbohydrate Research*, vol. 344, n° 3, p. 278-284, févr. 2009, doi: 10.1016/j.carres.2008.11.007.
- [44] S. Cheng *et al.*, « Glycoconjugate synthesis using chemoselective ligation », *Org. Biomol. Chem.*, vol. 17, n° 10, p. 2646-2650, 2019, doi: 10.1039/C9OB00270G.
- [45] M. Levy et E. A. Doisy, « THE EFFECT OF BORATE ON THE OXIDATION OF GLUCOSE AND OTHER SUGARS », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 77, n° 2, p. 733-751, mai 1928, doi: 10.1016/S0021-9258(20)74024-X.
- [46] R. Roy, R. E. Williams, et H. J. Jennings, « Increase in the acyclic form of sugars in the presence of borate ions, as measured by circular dichroism », *Carbohydrate Research*, vol. 127, n° 1, p. 165-169, avr. 1984, doi: 10.1016/0008-6215(84)85119-8.
- [47] S. Munneke, J. R. C. Prevost, G. F. Painter, B. L. Stocker, et M. S. M. Timmer, « The Rapid and Facile Synthesis of Oxyamine Linkers for the Preparation of Hydrolytically Stable Glycoconjugates », *Org. Lett.*, vol. 17, n° 3, p. 624-627, févr. 2015, doi: 10.1021/ol503634j.
- [48] E. A. Bezrodnykh, I. V. Blagodatskikh, S. N. Kulikov, P. V. Zelenikhin, I. A. Yamskov, et V. E. Tikhonov, « Consequences of chitosan decomposition by nitrous acid: Approach to non-branched oligochitosan oxime », *Carbohydrate Polymers*, vol. 195, p. 551-557, sept. 2018, doi: 10.1016/j.carbpol.2018.05.007.
- [49] B. L. Ridley, M. D. Spiro, J. Glushka, P. Albersheim, A. Darvill, et D. Mohnen, « A Method for Biotin Labeling of Biologically Active Oligogalacturonides Using a Chemically Stable Hydrazide Linkage », *Analytical Biochemistry*, vol. 249, n° 1, p. 10-19, juin 1997, doi: 10.1006/abio.1997.2165.
- [50] S. Mukherjee, A. P. Bapat, M. R. Hill, et B. S. Sumerlin, « Oximes as reversible links in polymer chemistry: dynamic macromolecular stars », *Polym. Chem.*, vol. 5, n° 24, p. 6923-6931, 2014, doi: 10.1039/C4PY01282H.
- [51] L. Shen *et al.*, « Dynamic Covalent Self-Assembly Based on Oxime Condensation », *Angew Chem Int Ed*, vol. 57, n° 50, p. 16486-16490, déc. 2018, doi: 10.1002/anie.201811025.
- [52] U. Janciauskaite, V. Rakutyte, J. Miskinis, et R. Makuska, « Synthesis and properties of chitosan-N-dextran graft copolymers », *Reactive and Functional Polymers*, vol. 68, n° 3, p. 787-796, mars 2008, doi: 10.1016/j.reactfunctpolym.2007.12.001.
- [53] M. Yalpani et L. D. Hall, « Some chemical and analytical aspects of polysaccharide modifications. III. Formation of branched-chain, soluble chitosan derivatives », *Macromolecules*, vol. 17, n° 3, p. 272-281, mars 1984, doi: 10.1021/ma00133a003.
- [54] C. Qin, H. Li, Q. Xiao, Y. Liu, J. Zhu, et Y. Du, « Water-solubility of chitosan and its antimicrobial activity », *Carbohydrate Polymers*, vol. 63, n° 3, p. 367-374, mars 2006, doi: 10.1016/j.carbpol.2005.09.023.
- [55] K. M. Vårum, M. H. Ottøy, et O. Smidsrød, « Water-solubility of partially N-acetylated chitosans as a function of pH: effect of chemical composition and depolymerisation », *Carbohydrate Polymers*, vol. 25, n° 2, p. 65-70, janv. 1994, doi: 10.1016/0144-8617(94)90140-6.
- [56] U. Borchert *et al.*, « pH-Induced Release from P2VP-PEO Block Copolymer Vesicles », *Langmuir*, vol. 22, n° 13, p. 5843-5847, juin 2006, doi: 10.1021/la060227t.
- [57] V. Bütün, N. C. Billingham, et S. P. Armes, « Unusual Aggregation Behavior of a Novel Tertiary Amine Methacrylate-Based Diblock Copolymer: Formation of Micelles and Reverse Micelles in Aqueous Solution », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 120, n° 45, p. 11818-11819, nov. 1998, doi: 10.1021/ja982295a.
- [58] E. S. Lee, H. J. Shin, K. Na, et Y. H. Bae, « Poly(l-histidine)-PEG block copolymer micelles and pH-induced destabilization », *Journal of Controlled Release*, vol. 90, n° 3, p. 363-374, juill. 2003, doi: 10.1016/S0168-3659(03)00205-0.
- [59] B. K. Johnson et R. K. Prud'homme, « Mechanism for Rapid Self-Assembly of Block Copolymer Nanoparticles », *Phys. Rev. Lett.*, vol. 91, n° 11, p. 118302, sept. 2003, doi: 10.1103/PhysRevLett.91.118302.

**Chapitre 3 :
Stabilisation des
complexes chitosane/ADN
en conditions
physiologiques**

1. INTRODUCTION

Les propriétés cationiques du chitosane font de lui le seul biopolymère couramment utilisé pour la formulation de complexes polyélectrolytes (PEC) et par extension pour la conception de systèmes non viraux de délivrance d'ADN [1],[2]. Ces systèmes reposent sur la complexation électrostatique des groupements phosphate des acides nucléiques avec les amines protonées du chitosane en conditions légèrement acides. Contrairement à la plupart des systèmes polyamine utilisés pour la délivrance de gènes, tels que la polyéthylèneimine ou la polylysine, le chitosane présente une faible toxicité en raison de sa faible cationicité à pH physiologique [3],[4],[5]. La littérature consacrée à la formulation de vecteurs à base de chitosane pour la vectorisation d'acides nucléiques est vaste. Les premières études dans ce domaine sont parues à la fin des années 90. Les paramètres intrinsèques du chitosane qui gouvernent la taille des complexes, leur densité de charge, leur stabilité, et donc leur efficacité de transfection, incluent principalement le degré d'acétylation (DA), la masse molaire et le rapport molaire amine/phosphate (N:P) [6],[7],[8]. Le principal inconvénient du chitosane réside dans son faible degré de protonation à pH physiologique, ce qui le rend insoluble dans ces conditions et entraîne l'agrégation ou la dissociation des PECs. De façon intéressante, bien que la précipitation du chitosane à pH physiologique soit connue, de nombreuses formulations à base de chitosane ont été évaluées avec succès en conditions *in vitro* et *in vivo* [1]. Cela pourrait s'expliquer par le fait qu'une proportion suffisante de vecteurs peut être internalisée et induire une réponse biologique, même lorsque le chitosane devient insoluble. Cependant, Nimesh *et coll.* ont montré que l'internalisation et la dissociation des vecteurs augmentent de manière significative lorsque le pH du milieu de culture est ajusté à 6,5, indiquant que l'efficacité des vecteurs est meilleure lorsque le chitosane est partiellement soluble [9]. Cette observation souligne donc l'importance de la solubilité du chitosane pour améliorer la performance des systèmes de délivrance [1]. De nombreuses modifications chimiques du chitosane ont été proposées afin d'améliorer leur stabilité en conditions physiologiques [10],[11], de faciliter leur dissociation [12],[13],[14], de renforcer leur résistance aux protéases sériques [11],[15], ainsi que d'optimiser le ciblage [16],[17],[18], l'internalisation cellulaire [13],[9], et l'échappement endosomal [19],[20],[21]. La plupart des modifications chimiques du chitosane impliquent des réactions de quaternisation des amines [10],[22] ou de greffage de groupements hydrophiles tels que des chaînes de polyéthylène glycol (PEG) ou de dextrane [15],[23]. Ces réactions sont généralement limitées à de faibles degrés de substitution afin de préserver la capacité de complexation du chitosane, qui dépend de la disponibilité des amines primaires. En outre, en altérant la structure du chitosane, ces modifications chimiques peuvent aussi entraîner une augmentation de la cytotoxicité des complexes formés. Il est donc essentiel de développer des systèmes de délivrance de gènes stables en conditions physiologiques et présentant des taux de transfection élevés sans compromettre l'intégrité structurale du chitosane.

L'utilisation de métaux a préalablement été étudiée pour améliorer la stabilité et l'efficacité de transfection de polyplexes. Il a été prouvé que l'ajout de zinc à des formulations à base de PEI branché permet de réduire considérablement la taille des complexes et d'améliorer leur internalisation [24]. L'ajout de zinc à d'autres polycations a également démontré une amélioration de leurs propriétés de complexation, en réduisant la taille des complexes, en renforçant leur affinité pour les acides nucléiques, et en améliorant leur internalisation cellulaire [25]. Tiyaboonchai et Limpeanchob sont les premiers à

avoir étudié la capacité des ions zinc à stabiliser des particules chitosane/dextrane sulfate dans l'eau [26]. Wu et Delair ont ensuite montré que l'ajout de $ZnCl_2$ permettait d'obtenir des complexes chitosane/hyaluronane stables dans l'HEPES 10 mM à pH 7,4 [27]. Les travaux de Tim Delas ont permis de démontrer l'efficacité des ions zinc pour la stabilisation de complexes chitosane/acides nucléiques à pH physiologique [28]. Des particules chitosane/siRNA stables en tampon HEPES 50 mM à pH 7,4 ont ainsi été obtenues. Les ions zinc se sont révélés particulièrement efficaces pour stabiliser les complexes formés à partir de chitosane faiblement acétylé (DA < 25%). Ces résultats s'expliquent par la capacité des ions zinc à établir des liaisons de coordination entre des atomes riches en électrons comme l'azote ou l'oxygène et ses orbitales vacantes. Ce mécanisme de réticulation des chaînes de polysaccharides par les ions zinc empêche la formation de liaisons hydrogène entre les amines du chitosane lorsque le pH est supérieur à leur pK_a , ce qui permet de prévenir la précipitation du chitosane.

Une méthode alternative pour améliorer la stabilité des complexes à base de chitosane consiste à greffer du PEG ou du dextrane sur la chaîne de chitosane [11],[15]. Étant donné que le greffage se fait au niveau des amines latérales du chitosane, cette méthode est limitée à des faibles taux de greffage afin de préserver l'intégrité du chitosane et ses propriétés de complexation. Dans cette optique, l'utilisation de copolymères à blocs linéaires se présente comme une alternative prometteuse. La synthèse de copolymères à blocs linéaires à partir d'un bloc polysaccharide est cependant complexe, principalement en raison de la faible disponibilité de la forme aldéhyde réactive de l'extrémité réductrice des polysaccharides [29]. L'amination réductrice, en présence de dihydrazides et dioxyamines comme agents de couplage, s'est avérée être une méthode efficace pour modifier et fonctionnaliser l'extrémité réductrice des polysaccharides [30]. Les travaux de Tim Delas sur des copolymères à blocs linéaires chitosane-*b*-PEG ont démontré qu'un copolymère pur, exempt de chitosane résiduel, est essentiel car la complexation du chitosane libre avec les acides nucléiques est favorisée thermodynamiquement et cinétiquement par rapport aux copolymères à base de chitosane [28]. Les copolysaccharides linéaires chitosane-*b*-dextrane, dont la synthèse a été présentée dans le Chapitre 2, apparaissent comme une alternative idéale en raison de leur pureté et de leur biocompatibilité. Dans ce contexte, le dextrane joue un rôle similaire à celui du PEG en augmentant la solubilité des copolysaccharides à pH physiologique, ce qui contribue à la stabilisation des complexes tout en assurant la protection des acides nucléiques contre la dégradation par les nucléases.

L'objectif de ce travail est double. Premièrement, il s'agit d'étudier les propriétés des complexes formés entre le chitosane et l'ADN et l'impact de certains paramètres comme le degré d'acétylation du chitosane ou encore le rapport de charge amine/phosphate. Deuxièmement, il vise à évaluer la capacité des ions zinc et des copolysaccharides à blocs chitosane-*b*-dextrane à stabiliser de tels complexes. Ces investigations permettront d'identifier les synergies potentielles entre ces deux approches et d'évaluer leur impact global sur la stabilité des complexes chitosane/ADN. L'objectif final est l'obtention de particules stables en conditions physiologiques (force ionique, pH et température).

2. SECTION EXPERIMENTALE

2.1. Matériels

Le chitosane (41 kg/mol, DA 4%) a été obtenu auprès de Stellar Biosol (Gujarat, Inde, lot de chitosane 144/090605) (Annexe S1 – Chapitre 2). L'ADN double brin de thymus de veau (> 10 000 bp) provient de Sigma-Aldrich. Le nitrate de zinc hexahydraté provient de Fisher Scientific. Tous les autres produits chimiques ont été obtenus à partir de sources commerciales et sont de qualité analytique.

2.2. Acétylation du chitosane

Le chitosane initial (41 kg/mol, DA 4%) a été réacétylé par action de l'anhydride acétique afin d'obtenir une bibliothèque de chitosanes de DA de 4%, 19%, 28%, 48% et 64% [31]. Pour cela, le chitosane a été dissous à une concentration de 20 g/L dans une solution d'acide acétique glacial à 2% massique. La solution a été laissée sous agitation pendant une nuit. Un volume d'éthanol technique, équivalent à celui utilisé pour dissoudre le chitosane, a été ajouté à la solution. Divers volumes d'anhydride acétique ont été dilués dans un minimum d'éthanol technique puis ajoutés de sorte que le rapport molaire [Anhyd.Ac.]/[GlcN] varie de 0,05 à 0,70. Les rapports molaires correspondant aux DAs ciblés ont été déterminés à partir d'une courbe de calibration préalablement établie (Figure 1). La solution est restée sous agitation une nuit à température ambiante puis, a été filtrée sur une membrane en fibre de verre de 1 μ m de porosité pour éliminer les particules insolubles. Pour les DAs inférieurs à 30%, le chitosane a été précipité par addition de 1 volume d'une solution de MeOH:NH₃ (1:1) à 6 volumes de solution de chitosane. Le milieu a été centrifugé (15 min, 6 000 x g) à température ambiante et les culots ont été lavés à l'eau. Cette procédure a été répétée plusieurs fois jusqu'à ce que le pH du surnageant soit neutre. Pour les DA supérieurs à 30 %, afin de limiter les pertes en raison de la solubilité du chitosane à DA élevé, les solutions de chitosane réacétylé ont été dialysées contre l'eau à l'aide d'une membrane en cellulose régénérée avec un seuil de coupure de 3,5 kDa. Le chitosane a été récupéré par lyophilisation. Les valeurs de DA ont été déterminées par RMN ¹H selon la formule de Hirai [32].

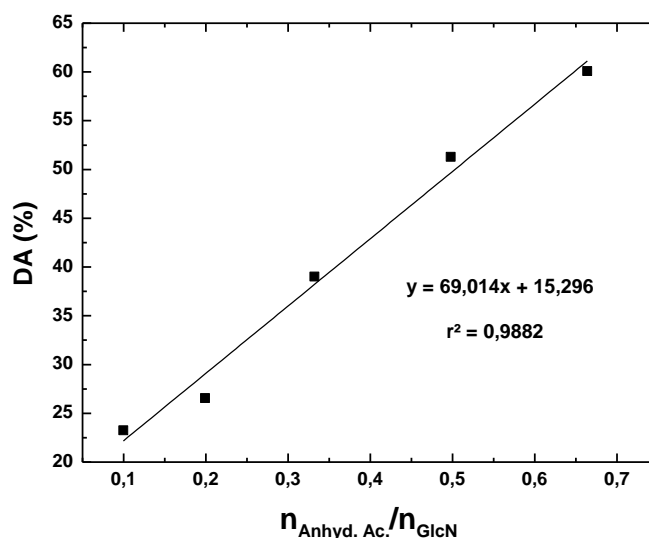


Figure 1. Degré d'acétylation (DA) des chitosanes déterminés par RMN ¹H en fonction du rapport molaire initial anhydride acétique/GlcN.

2.3. Formation des complexes

En l'absence de zinc, les complexes entre l'ADN de thymus de veau et le chitosane ont été formés en ajoutant 400 µL d'ADN à une concentration de 0,3 g/L dans 800 µL de solution de chitosane de concentration variable (concentration finale en ADN de 0,1 g/L, volume final de complexes de 1,2 mL). Le chitosane a été préalablement solubilisé à 2 g/L dans de l'eau avec une quantité stœchiométrique de HCl pour assurer la protonation complète des résidus de glucosamine. Le pH de la solution de chitosane a été ajusté à 4 et la concentration ajustée en fonction du rapport de charge ($R_{+/-}$) ciblé. Il est important de noter que le rapport de charge $R_{+/-}$ a été préféré au rapport N:P. Le rapport N:P représente le nombre total de groupes amines du chitosane par rapport au nombre de groupes phosphates de l'ADN, sans prendre en compte le degré d'acétylation du chitosane. En revanche, le rapport de charge $R_{+/-}$ est défini comme le rapport entre les groupes amine chargés du chitosane et les groupes phosphate de l'ADN. Le rapport de charge est défini comme suit :

$$R_{+/-} = \frac{N}{P} \times \left(1 - \frac{DA}{100}\right)$$

Les rapports $R_{+/-}$ pour des chitosanes ayant des degrés d'acétylation différents sont directement comparables au niveau de leur charge effective contrairement aux rapports N:P. Les complexes étant formés à un rapport $R_{+/-} > 1$, la solution d'ADN a été ajoutée rapidement à la solution de chitosane à l'aide d'une micropipette. L'ajout du composant en défaut à celui en excès permet d'éviter le passage par la stœchiométrie de complexation. Le mélange de l'ADN au chitosane a été réalisé dans des microtubes en plastique de 2 mL, placés dans un ThermoMixer Comfort Eppendorf réglé à 1200 rpm et 25°C.

La formation des complexes en présence de zinc a été réalisée dans des conditions similaires. Le rapport Zn:P, qui détermine la quantité de zinc ajoutée, est défini comme le rapport molaire entre les ions zinc ajoutés et les groupes phosphates de l'ADN. Le nitrate de zinc hexahydraté a été dissous dans de l'eau milli-Q à une concentration de 5 g/L, et la concentration finale a été ajustée en fonction du rapport Zn:P souhaité. Pour un rapport Zn:P donné, la moitié du volume nécessaire de zinc a été ajoutée à la solution de chitosane, et l'autre moitié à la solution d'ADN, avant de mélanger les deux solutions. Le volume final du mélange a été fixé à 1,2 mL.

Les complexes ont été incubés sous agitation pendant 1 heure dans un ThermoMixer Comfort Eppendorf à 1200 rpm et 25°C avant d'être dilués dans du tampon MOPS (50 mM, pH 7,4) ou dans un tampon MOPS/NaCl (50 mM/100 mM, pH 7,4) ou bien dans une solution saline de NaCl à 154 mM dans un rapport volumique de 1:5. Les complexes dilués sont incubés entre 1 heure et plusieurs jours à 25°C ou 37°C dans un ThermoMixer Comfort Eppendorf, à 1200 rpm. La stabilité des complexes dans le temps a été suivie par analyse DLS (voir ci-dessous).

2.4. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

La caractérisation structurale des chitosanes réacétylés a été réalisée par spectroscopie RMN ^1H à 298 K sur un spectromètre Bruker AVANCE III HD 400 MHz en utilisant une sonde directe multinucléaire Bruker à gradient z de 5 mm. Les chitosanes ont été dissous à 10 mg/mL dans le D_2O et le pH ajusté à 4 à l'aide de DCl 1,17 M. Les spectres RMN ^1H ont été calibrés à partir du signal de HOD à 4,81 ppm.

2.5. Diffusion dynamique de la lumière (DLS) et potentiel zêta

Les complexes ont été analysés par diffusion dynamique de la lumière à 25°C à l'aide d'un ZetaSizer Nano ZS (Malvern Panalytical Ltd, Malvern, UK) équipé d'un laser ayant une longueur d'onde $\lambda = 632,8$ nm et d'un détecteur à un angle de 173°. Les analyses ont été effectuées sur 100 μ L de solution dans des cuvettes en plastique de taille ultra-micro. Trois mesures ont été effectuées pour chaque échantillon. Les diamètres hydrodynamiques moyens et les indices de polydispersité (PDI) ont été déterminés en utilisant la méthode des cumulants. Le diamètre hydrodynamique moyen est calculé à partir du premier cumulant (a_1) et le PDI à partir du second (a_2), selon la formule $PDI = \frac{a_2}{a_1^2}$. Les distributions de tailles moyennées en intensité sont obtenues par analyse NNLS (non-negative least squares).

Les mesures de potentiel zêta ont été effectuées à 25°C sur le même appareil en utilisant la technologie PALS (Phase Analysis Light Scattering). Les analyses ont été effectuées sur 1 mL de solution dans des cellules capillaires en plastique (Malvern DTS1070). Cinq mesures ont été effectuées pour chaque échantillon.

2.6. Spectroscopie UV-vis

Le quantification du chitosane libre dans les complexes en fonction du rapport de charge $R_{+/-}$ a été effectuée par mesure de l'absorbance de l'Orange II (Acide 4-(2-Hydroxy-1-naphthylazo)benzènesulfonique). Un volume de 50 μ L de complexes a été ajouté à 1 750 μ L d'une solution d'Orange II de concentration connue préparée dans un tampon acétate 500 mM, pH 4,5. Les solutions ont été incubées 30 minutes sous agitation avant d'être centrifugées 30 minutes à 18 000 x g et 20°C. Les surnageants ont été analysés par spectroscopie UV-vis à 485 nm. Des courbes d'étalonnage préalablement établies ont permis de déterminer la concentration en chitosane dans le surnageant. Les mesures d'absorbance ont été réalisées dans des microplaques transparentes en polystyrène de 96 puits à l'aide d'un lecteur SpectraMax M2 (Molecular Devices). Chaque analyse a été effectuée en triplicat, avec 200 μ L de solution par puits.

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Formation et caractérisation des complexes chitosane/ADN

Présentation du système complexant. Les complexes chitosane/acides nucléiques ont été largement étudiés pour leur potentiel dans le domaine de la délivrance de gènes, en raison de la biocompatibilité et de la biodégradabilité du chitosane. Le caractère cationique du chitosane permet de former des complexes stables avec les acides nucléiques, tels que l'ADN, par interactions électrostatiques, offrant ainsi une protection contre la dégradation enzymatique et facilitant la délivrance intracellulaire. Les complexes ont été systématiquement préparés à pH 4 pour garantir une protonation maximale des amines du chitosane [4]. Afin d'étudier l'influence du degré d'acétylation du chitosane sur les caractéristiques des complexes, le chitosane initial d'une masse molaire de 41 kg/mol et acétylé à hauteur de 4% a été acétylé à des degrés supérieurs à l'aide d'anhydride acétique pour produire une série de chitosanes avec différents degrés d'acétylation : 19%, 28%, 48% et 64%. Ces chitosanes seront par la suite notés Chit_{DA} X%. Les données représentées sur la Figure 1 mettent en

évidence une bonne linéarité entre la quantité d'agent acétylant engagée et le degré d'acétylation obtenu, en lien avec la forte réactivité des fonctions anhydrides avec les amines. Morandi *et coll.* ont montré que, dans ce type de réaction, le risque d'*O*-acétylation est inexistant tant que la quantité d'anhydride est inférieure ou égale à la quantité d'amines présentes [33]. La complexation des polyélectrolytes est un processus coopératif, où la formation d'une paire d'ions facilite celle des suivantes, assimilée à un mécanisme en zip tel une fermeture éclair [34]. Ce phénomène est particulièrement marqué pour les oligomères, dont la masse molaire est inférieure à 10 kg/mol, alors que pour des chaînes de plus hautes masses molaires, les effets coopératifs de la complexation sont moins prononcés [35]. La masse molaire du chitosane utilisé ici (41 kg/mol) est dans la gamme des masses molaires typiquement utilisées pour la formulation de complexes avec l'ADN [1]. Les complexes de chitosane ont été formulés avec de l'ADN de thymus de veau, sélectionné pour sa disponibilité ainsi que son coût abordable comparé à d'autres acides nucléiques tels que l'ARN. L'ADN de thymus de veau est un duplex de plus de 10 000 paires de bases possédant une structure linéaire contrairement au plasmide, molécule d'ADN circulaire, utilisé ultérieurement pour l'évaluation biologique. L'ADN est une molécule extrêmement rigide possédant une longueur de persistance supérieure à 50 nm [36]. Des polycations, même de masses molaires relativement faibles, peuvent établir des complexes stables avec l'ADN de thymus de veau, à condition que leur degré de polymérisation soit suffisant. Cela a été démontré pour les ionènes ayant un degré de polymérisation supérieur à 25, où les complexes formés affichent une résistance au sel relativement élevée (0,3 M NaCl) [37]. Le chitosane utilisé ici est un polyélectrolyte de faible taille avec un rayon de giration (R_g) de l'ordre de 20 nm (Annexe S1 – Chapitre 2) en comparaison avec l'ADN de thymus de veau dont le rayon de giration doit être de l'ordre de plusieurs centaines de nanomètres voire du micromètre en raison de sa très forte masse molaire et sa rigidité intrinsèque. La valeur du R_g n'a pas été vérifiée expérimentalement, mais l'analyse par diffusion dynamique de la lumière (DLS) révèle la présence de multiples populations, associées à différents modes de relaxation, phénomène typique des polyélectrolytes. Cela est particulièrement vrai dans le cas de l'ADN, en raison de sa forte densité de charge, de sa structure en double hélice rigide et de sa haute masse molaire. Les tailles mesurées par DLS dépassent largement la centaine de nanomètres (Figure 2).

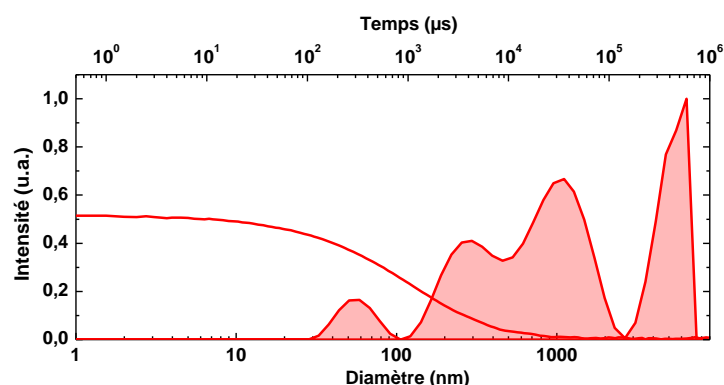


Figure 2. Distribution de tailles et corrélogramme de l'ADN de thymus de veau dans l'eau à pH 4.

Par ailleurs, le chitosane est également un polymère rigide, avec une longueur de persistance estimée entre 5 et 10 nm et qui est peu influencée par le degré d'acétylation [38]. Dans ces conditions et pour des taux de complexation relativement faibles, le chitosane peut se lier aux chaînes d'ADN sans altérer

significativement leur conformation rigide. Cependant, l'ADN perd son caractère polyélectrolyte dès que sa chaîne est suffisamment complexée ou qu'une quantité suffisante de sels est ajoutée. Il a été démontré que, pour des taux de complexation supérieurs à 70%, l'ADN peut se condenser, adoptant alors une conformation plus flexible avec une morphologie globulaire [39],[40]. La complexation peut néanmoins se poursuivre au-delà de ce point, jusqu'à atteindre la neutralité du système.

Présentation des techniques de caractérisation. Les complexes ont été caractérisés sur le plan colloïdal par des mesures de potentiel zêta et de diffusion dynamique de la lumière (DLS), permettant de déterminer leur charge de surface et leur taille hydrodynamique à pH 4 pour différents rapports amine/phosphate (N:P). La quantité de chitosane libre dans les formulations a été quantifiée par spectrophotométrie, en utilisant un pigment sulfonaté. Dans le cadre de cette étude, la DLS a été largement utilisée, il est donc nécessaire de rappeler que plusieurs paramètres issus de cette analyse doivent être considérés avant de conclure quant à la formation de complexes. Bien que la distribution de tailles des particules soit un premier indice sur la formation des complexes, il est impératif d'examiner le corrélogramme associé. En effet, des particules de grande taille, typiquement des agrégats ($> 1 \mu\text{m}$), ne sont pas systématiquement révélées par l'analyse des cumulants ou l'analyse NNLS. Néanmoins, la présence de ces particules se manifeste sur les corrélogrammes par un décalage vers des temps de relaxation élevés, ainsi qu'un retour à la ligne de base bruité. Par ailleurs, une valeur d'ordonnée à l'origine significativement inférieure à 1 indique un système agrégé où les particules sédimentent, ce qui signifie que leur mouvement dans la solution n'est pas seulement dominé par l'agitation thermique. Dans certains cas, la valeur de l'ordonnée à l'origine peut dépasser 1 ; ce phénomène est causé par des fluctuations du nombre de particules pendant l'analyse, induites par la sédimentation de celles-ci. Pour des applications biologiques, il est essentiel que la taille des particules de complexes soit inférieure à 500 nm et que l'indice de polydispersité soit inférieur à 0,3, ce qui indique généralement une population unique de particules, comme illustré sur la Figure 3.

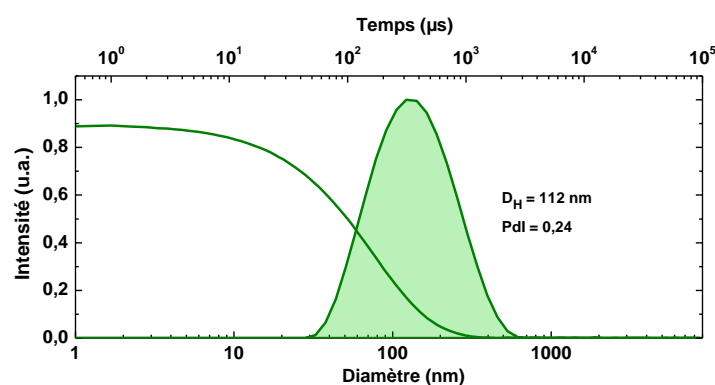


Figure 3. Distribution de tailles et corrélogramme des complexes formés entre le chitosane DA 4% et l'ADN de thymus de veau formulés à un rapport de charge de 5 à pH 4.

Un autre aspect important à prendre en compte est l'observation visuelle des suspensions de complexes ; la résolution de l'œil humain permettant de détecter la présence de particules d'une dizaine de micromètres [41]. Les cuvettes utilisées pour la DLS sont particulièrement adaptées à cette observation en raison de leur grande transparence et de leur long trajet optique.

Caractérisation par zétamétrie. La caractérisation des complexes par mesure du potentiel zêta met en évidence une inversion de la charge de surface des particules lorsque le rapport de mélange amine/phosphate (N:P) augmente (Figure 4). En présence d'un excès d'ADN les complexes sont chargés négativement et inversement, en présence d'un excès de chitosane ils sont chargés positivement, comme illustré plus bas sur la Figure 5.

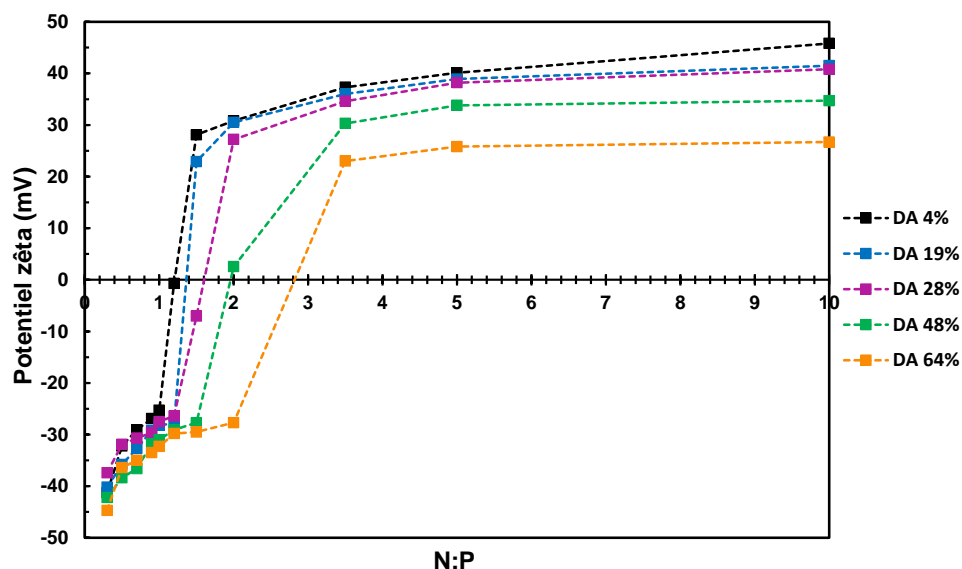


Figure 4. Représentation du potentiel zêta des complexes formés entre l'ADN et le chitosane à différents DAs en fonction du rapport N:P. Les mesures sont effectuées à pH 4.

La stabilité colloïdale des particules est assurée par la présence de charges libres sur le polymère en excès à leur surface. En effet, des valeurs relativement importantes de potentiel zêta sont observées de part et d'autre du point de neutralité électrique. Le rapport N:P pour lequel l'inversion de charge est observée dépend du degré d'acétylation du chitosane, puisque ce rapport ne considère pas directement la quantité d'amines protonées impliquées dans la complexation. En transformant le rapport N:P en rapport molaire de charges ($R_{+/-}$), l'inversion de charge est proche de la stœchiométrie c'est-à-dire $R_{+/-} = 1$ quel que soit le DA (Tableau 1). Cela démontre que, malgré des densités de charge très différentes entre les polymères, les polymères de charges opposées sont capables de s'organiser au sein des complexes de manière à maximiser les interactions électrostatiques.

Tableau 1. Distances inter-charges du chitosane et stœchiométrie de complexation exprimée à travers les rapports N:P et $R_{+/-}$ en fonction du DA.

DA	Distance inter-charges (nm)	N:P stœchiométrie	$R_{+/-}$ stœchiométrie
4%	0,52	1,2	1,15
19%	0,62	1,4	1,10
28%	0,69	1,6	1,15
48%	0,96	1,9	1,00
64%	1,39	2,8	1,00

La complexation des polyélectrolytes tend globalement vers une stœchiométrie quasi parfaite, malgré les différences de densité de charge entre le chitosane (Tableau 1) et l'ADN (distance inter-charges 1,7 nm). Premièrement, les chaînes une fois complexées deviennent plus flexibles, ce qui facilite leur réorganisation pour optimiser les interactions électrostatiques. Deuxièmement, le microenvironnement ionique local est modifié par la libération des contre-ions des deux polyélectrolytes, ce qui augmente la force ionique et favorise l'appariement des charges à distance. Ceci permet des réarrangements dynamiques, assurant ainsi une complexation efficace et globalement stœchiométrique, malgré les variations de distance entre charges (Tableau 1). Ces processus de réorganisation et d'optimisation des interactions électrostatiques garantissent la formation de complexes polyélectrolytes stables, même à des taux de complexation élevés [42]. Lorsque la stœchiométrie en charge est atteinte ($\xi = 0$ mV), les complexes sont neutres et ne sont donc plus stabilisés, ce qui entraîne leur agrégation puis leur précipitation. Ce phénomène se traduit par la formation de particules en suspension qui peuvent dans certains cas être détectées visuellement. En présence d'un large excès de chitosane, les chaînes de chitosane ne sont que partiellement complexées et donc la fraction libre permet de stabiliser électrostatiquement les complexes en formant une couronne de charges positives autour des particules (Figure 5). Il est également important de souligner que pour des rapports N:P inférieurs à 1, on observe une complexation progressive de l'ADN par le chitosane, comme le montre la variation régulière du potentiel zêta avec le rapport N:P, indiquant que la conformation de l'ADN reste relativement peu perturbée jusqu'au point de condensation. Avant ce seuil, la formation de particules colloïdales n'est pas possible, contrairement à ce qui se produit lorsque le chitosane est en excès, où des valeurs relativement constantes de potentiel zêta sont observées à des rapports N:P supérieurs à 3 (Figure 4).

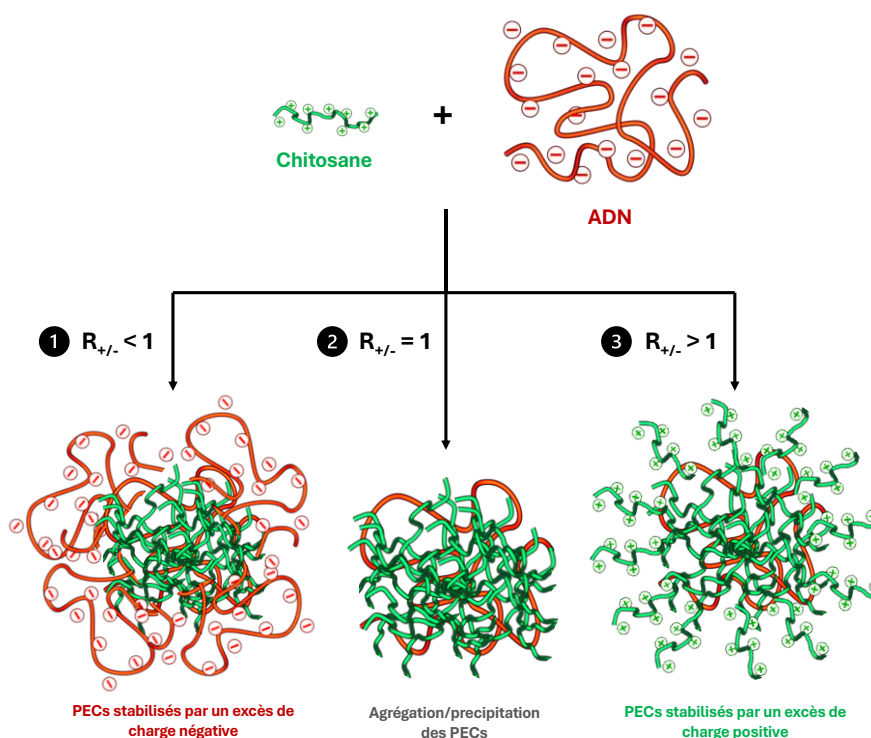
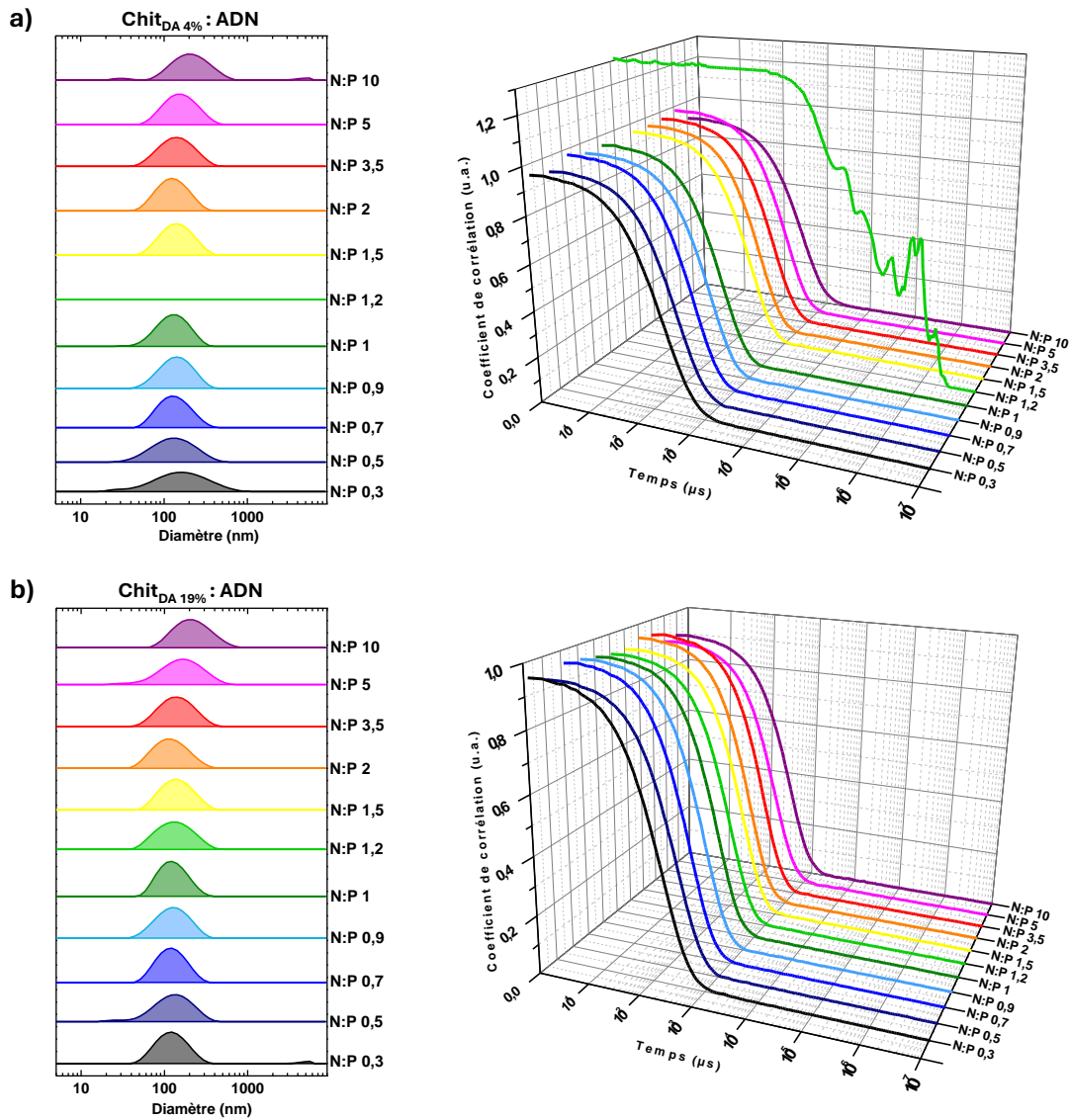


Figure 5. Représentation schématique de la formation des complexes entre le chitosane et l'ADN de thymus de veau en fonction du rapport de charge $R_{+/-}$.

Caractérisation par DLS. L'analyse par DLS des complexes formulés à différents rapports N:P fournit des informations complémentaires sur les propriétés physico-chimiques des particules, notamment leur diamètre hydrodynamique (D_H), leur indice de polydispersité (PDI) et leur intensité diffusée (DCR). Ces résultats permettent une meilleure compréhension de l'impact des rapports de charge sur la structuration et le comportement colloïdal des complexes (Figure 6).



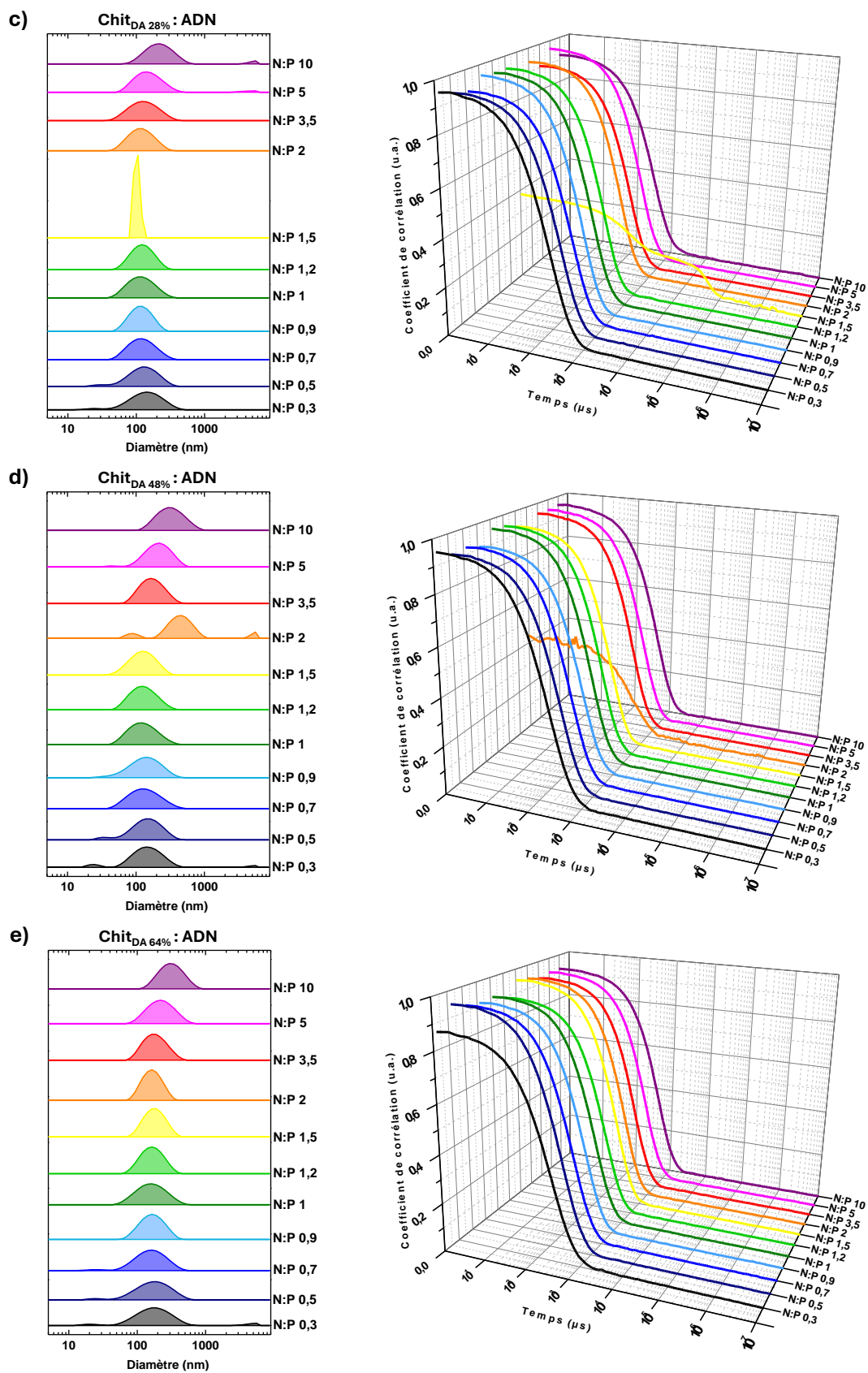


Figure 6. Distributions de tailles et corrélogrammes des complexes chitosane : ADN obtenus à différents rapports N:P dans l'eau à pH 4. a) Chit_{DA} 4%, b) Chit_{DA} 19%, c) Chit_{DA} 28%, d) Chit_{DA} 48% et e) Chit_{DA} 64%.

En l'absence de chitosane, l'ADN a une signature en DLS caractéristique d'un polyélectrolyte fort avec de nombreux modes de relaxation dont les deux plus importants, rapide et lent, sont respectivement attribués au couplage charge/contre-ion et aux agrégats électrostatiques [43]. En présence d'une faible quantité de chitosane ($N:P < 0,5$), la signature DLS de ces modes est observable, bien qu'atténuée, ce qui démontre que les propriétés polyélectrolytes de l'ADN sont préservées dans une certaine mesure lorsque celui-ci est partiellement complexé. Pour des valeurs de $N:P$ plus élevées, l'analyse par DLS révèle la présence de particules de dimensions colloïdales, caractérisées par une distribution de tailles unique et des indices de polydispersité inférieurs à 0,30 (Figure 6). A la stoechiométrie, les corrélogrammes présentent plusieurs modes de relaxation avec un retour à la ligne de base bruitée et une variation significative de l'ordonnée à l'origine, ce qui traduit l'agrégation des particules de complexes. Dans ce cas l'algorithme utilisant la méthode NNLS est le plus souvent incapable de générer une distribution de tailles réaliste. Ce phénomène est clairement observable pour les complexes à base de chitosane de DA 4%, 28% et 48%, aux rapports $N:P$ respectifs de 1,2, 1,5 et 2 (Figure 6). Le cas des complexes $\text{Chit}_{\text{DA } 28\%} : \text{ADN}$ à $N:P$ 1,5 souligne l'importance de ne pas se fier uniquement à l'allure de la distribution de tailles. En effet, bien que la distribution de tailles à $N:P$ 1,5 semble correcte, le corrélogramme révèle plusieurs modes de relaxation, indiquant la présence d'agrégats trop volumineux pour être visualisés sur la distribution de tailles (Figure 6.c). Concernant les complexes $\text{Chit}_{\text{DA } 19\%} : \text{ADN}$ et $\text{Chit}_{\text{DA } 64\%} : \text{ADN}$, les distributions de tailles et les corrélogrammes révèlent systématiquement la présence de particules bien définies, avec une faible dispersité et sans signe d'agrégation. Cela révèle qu'aucun des rapports $N:P$ analysés ne correspondait exactement à la stoechiométrie de complexation de ces systèmes, indiquant que le phénomène d'agrégation des complexes à la neutralité électrique se produit dans une plage très restreinte de rapports de charge. Finalement, les valeurs de stoechiométrie de complexation obtenues par DLS, mises en évidence par la présence d'agrégats, sont en bon accord avec les résultats obtenus par zétamétrie (Figure 4 et Figure 6). Ces résultats démontrent l'importance de raisonner avec le rapport de charge $R_{+/-}$ plutôt que le rapport $N:P$. Ceci s'explique par le fait que le rapport $N:P$ ne fait pas la distinction entre les amines primaires chargées et celles acétylées. Le rapport de charge $R_{+/-}$ est ainsi plus pertinent puisqu'il ne considère que la charge effective du chitosane. Par conséquent, seul le rapport de charge $R_{+/-}$ sera désormais utilisé.

Les données de diffusion ont également été analysées au travers des variations de diamètre hydrodynamique moyen (D_H), d'indice de polydispersité (PDI) calculé selon la méthode des cumulants et d'intensité diffusée (DCR) (Figure 7). Pour des raisons de clarté, les points correspondant à la stoechiométrie de charge des complexes n'ont pas été représentés.

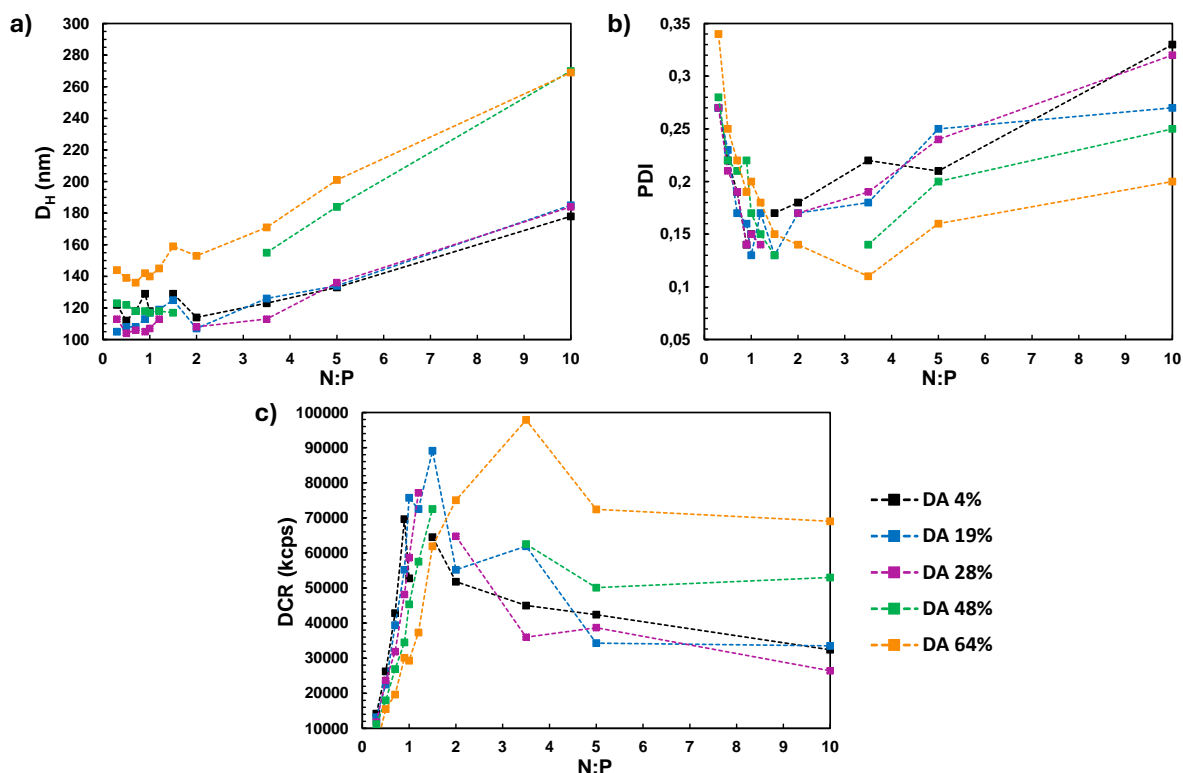


Figure 7. a) Diamètre hydrodynamique (D_H), b) indice de polydispersité (PDI) et c) intensité diffusée (DCR) des complexes chitosane/ADN en fonction du rapport N:P dans l'eau à pH 4.

Les diamètres hydrodynamiques varient peu avant d'atteindre la stœchiométrie, puis augmentent de manière significative au-delà, en relation avec la formation d'une couronne de chitosane plus importante à mesure que le rapport N:P croît (Figure 7.a). Cette variation est particulièrement accentuée pour les degrés d'acétylation les plus élevés, car le chitosane étant moins chargé, un plus grand excès est nécessaire pour atteindre une valeur donnée de N:P. Le PDI est globalement inférieur à 0,3 témoignant de la présence majoritaire d'une unique population d'objets diffusants. Pour des N:P compris entre 0 et 1, une diminution régulière du PDI est observée, accompagnée d'une augmentation progressive du diamètre des complexes et du potentiel zêta (Figure 4 et Figure 7). Ces variations reflètent certainement les différences structurales des complexes formés de part et d'autre de la stœchiométrie. A des rapports N:P supérieurs à 1, les particules colloïdales sont stabilisées par l'excès de chitosane. En revanche, en dessous de la stœchiométrie, le comportement polyélectrolyte de l'ADN domine, avec les petites chaînes de chitosane décorant partiellement l'ADN à mesure que le rapport N:P augmente. Toutefois, à de faibles N:P, il n'y a pas véritablement de structuration en particules colloïdales sphériques dotées d'une couronne de polyanion en excès à la surface, comme c'est le cas à des valeurs élevées de N:P. L'ADN conserve une conformation rigide ce qui fait que le chitosane se complexe sans permettre une réelle condensation de la molécule d'ADN, empêchant ainsi la formation de véritables particules colloïdales. Dans ce contexte, des propriétés telles que la charge de surface ou l'intensité diffusée sont directement proportionnelles à la quantité de charges complexées, ce qui ne serait pas le cas si le chitosane était complexé avec un polyanion de longueur de chaîne équivalente.

Dosage du chitosane libre. La stœchiométrie de complexation ainsi que la fraction de chitosane libre ont été déterminées par une méthode spectrophotométrique. Cette nouvelle approche consiste à

préparer des complexes à différents $R_{+/-}$ et à les incuber en présence d'Orange II, un colorant azoïque anionique qui interagit avec les amines du chitosane [44],[45]. Pour des rapports de charge supérieurs à 1, une fraction des amines du chitosane est complexée avec l'ADN, tandis qu'une autre fraction reste libre. Le chitosane libre est présent sous deux formes, des segments partiellement complexés à la surface des particules et des chaînes totalement libres en solution. Plus le rapport $R_{+/-}$ augmente, plus le nombre d'amines non complexées est élevé. Les amines non complexées peuvent alors interagir avec l'Orange II. La quantification de la quantité d'Orange II liée aux amines par spectroscopie UV-vis permet d'estimer la concentration de glucosamines libres, c'est-à-dire non complexées avec l'ADN, étant donné que la complexation de l'Orange II avec le chitosane est stœchiométrique. Cependant, cette technique ne permet pas de distinguer les chaînes de chitosane libres de celles qui sont partiellement complexées. Malgré cela, cette méthode permet également de déterminer la stœchiométrie de complexation, correspondant au rapport de charge $R_{+/-}$ à partir duquel du chitosane en excès est détecté.

Des complexes $\text{Chit}_{\text{DA } 4\%} : \text{ADN}$ et $\text{Chit}_{\text{DA } 19\%} : \text{ADN}$ ont été formulés à différents $R_{+/-}$ dans l'eau à pH 4. La représentation de la concentration molaire en chitosane libre en fonction du rapport $R_{+/-}$ permet d'identifier clairement la stœchiométrie de complexation (Figure 8). Ces mêmes données permettent également de représenter le pourcentage de chitosane libre en fonction de $R_{+/-}$ (Figure 9).

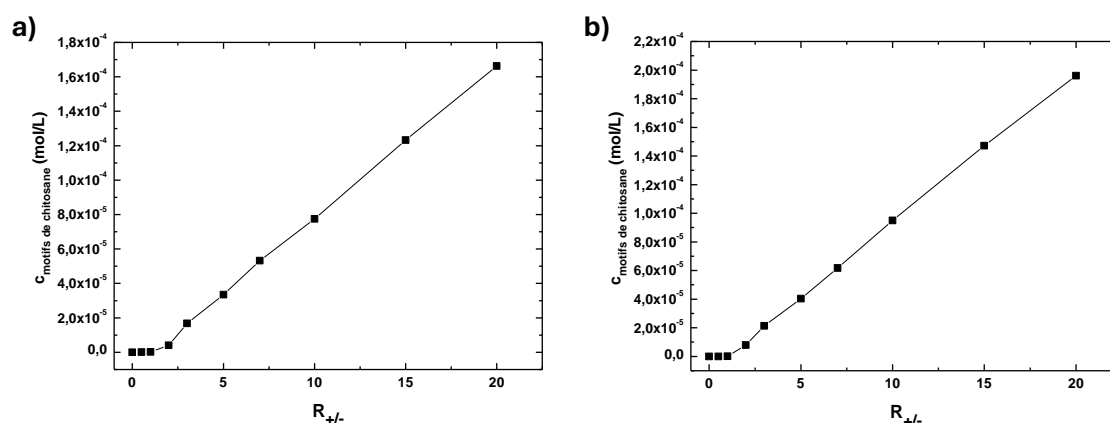


Figure 8. Concentration molaire de chitosane non complexé (libre) avec l'ADN en fonction du rapport de charge $R_{+/-}$. a) Complexes $\text{Chit}_{\text{DA } 4\%} : \text{ADN}$ et b) complexes $\text{Chit}_{\text{DA } 19\%} : \text{ADN}$.

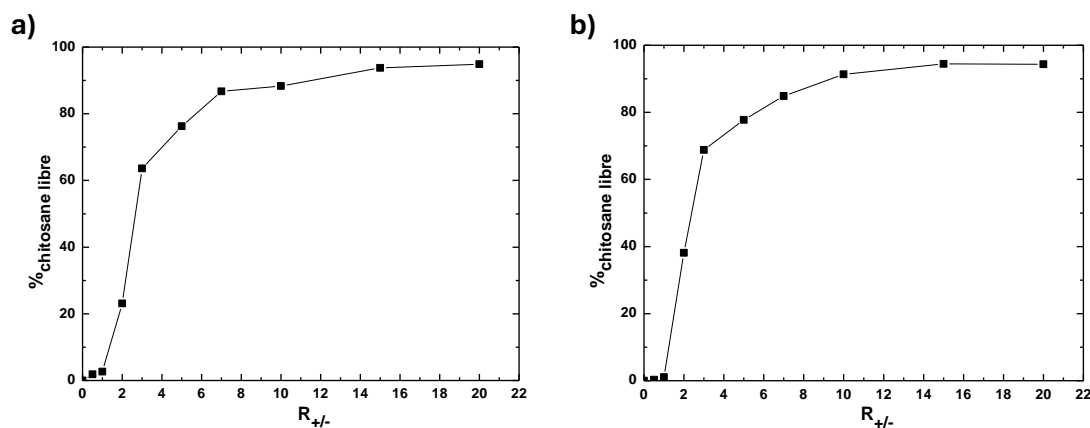


Figure 9. Pourcentage de chitosane libre en fonction du rapport de charge $R_{+/-}$. a) Complexes $\text{Chit}_{\text{DA } 4\%} : \text{ADN}$ et b) complexes $\text{Chit}_{\text{DA } 19\%} : \text{ADN}$.

Cette approche permet de vérifier que la stoechiométrie de complexation est bien située à un rapport de charge de 1. D'un point de vue physicochimique, il est inutile de se placer à des rapports de charge trop élevés, car pour un $R_{+/-}$ de 5, plus de 80 % du chitosane n'est pas engagé dans la complexation avec l'ADN (Figure 9). La présence de chitosane libre peut également interférer et perturber la stabilité des complexes, notamment en conditions physiologiques. Le rapport de charge optimal entre le chitosane et l'ADN se situe donc entre 2, excès de chitosane minimal pour stabiliser les complexes, et 5, au-delà la quantité de chitosane libre devient excessive. Cependant d'un point de vue biologique, plusieurs études ont rapporté l'intérêt d'un large excès de chitosane notamment pour faciliter la circulation des complexes par déstabilisation des membranes cellulaires [46] mais également pour offrir une protection supplémentaire contre la dégradation enzymatiques [47].

3.2. Stabilité des complexes à pH physiologique

Les complexes préparés à pH 4, à des rapports de charge $R_{+/-}$ compris entre 2 et 5, montrent une bonne stabilité colloïdale dans le temps. Cette stabilité a été confirmée par un suivi quotidien par DLS sur plus de 15 jours à température ambiante et 7 jours à 37°C (données non présentées). Cependant, l'objectif étant d'évaluer la stabilité en conditions physiologiques, les complexes précédemment formulés à pH 4 ont été dilués dans un rapport de 1 pour 5 en tampon MOPS (50 mM, pH 7,4). Le tampon MOPS a été choisi pour son pK_a de 7,2, idéal pour formuler un tampon à pH physiologique, mais surtout en raison de sa faible affinité de liaison avec le zinc [48]. Après une heure d'incubation en tampon, les suspensions de complexes ont été analysées par DLS. La dilution n'a pas affecté le pH du tampon. Afin de valider la stabilité des complexes en tampon MOPS, il est essentiel que le corrélogramme soit bien défini et que les tailles de particules soient proches de celles mesurées avant dilution. La dilution en tampon entraîne un écrantage des charges de surface des particules de complexes ce qui peut provoquer une légère diminution des tailles. Au contraire, une augmentation des tailles de particules en tampon indiquerait un début d'agrégation, lié à une déstabilisation des complexes. L'intensité diffusée (DCR) permet également d'estimer la stabilité colloïdale : une augmentation légère de l'intensité diffusée peut souligner un effet d'écrantage alors qu'une diminution met en évidence la présence d'agrégats de taille suffisante pour sédimenter. L'effet de dilution des particules dans le tampon doit être considéré pour évaluer les variations d'intensité diffusée. Finalement, il est important de préciser que cette étude porte sur la stabilité colloïdale des particules de complexes, et non sur la stabilité des liaisons de complexation entre l'ADN et le chitosane.

Un premier test a été effectué sur les particules de complexes à base de $\text{Chit}_{\text{DA } 4\%}$ et d'ADN. Le rapport de charge a ici été fixé à 5 afin de garantir une stabilisation efficace des complexes grâce à l'excès de chitosane. L'influence de ce paramètre sera étudiée plus loin dans ce chapitre. Comme mentionné précédemment, les complexes ainsi formulés sont particulièrement stables au cours du temps à pH 4. Après dilution dans le MOPS à pH 7,4, les complexes sont fortement déstabilisés, comme l'indiquent la diminution drastique de l'intensité diffusée (DCR) ainsi que le corrélogramme très bruité associé à une valeur d'ordonnée à l'origine supérieure à 1 (Figure 10). Dans ces conditions, l'analyse NNLS effectuée par le logiciel ne permet pas de fournir une distribution de tailles dans le domaine de tailles accessibles par la DLS. Cependant, la méthode des cumulants, également accessible sur le logiciel de la DLS, permet

de déterminer un diamètre hydrodynamique moyen en Z ainsi qu'une valeur de PDI. Il convient de noter que ces valeurs ne sont pas pleinement représentatives de l'état d'agrégation réel du système.

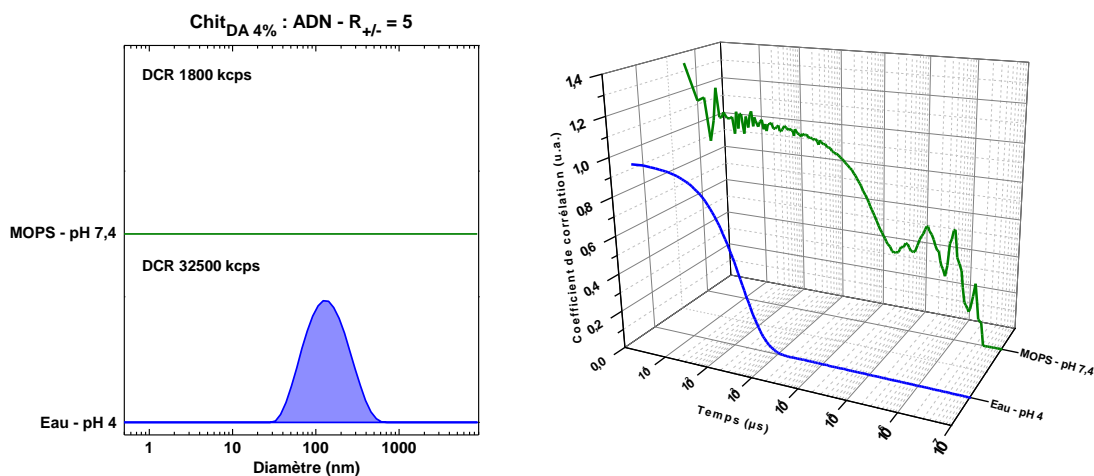


Figure 10. (gauche) Distributions de tailles et (droite) corrélogrammes des complexes Chit_{DA 4%} : ADN à R_{+/-} = 5 dans l'eau à pH 4 (bleu) et après une heure d'incubation en tampon MOPS à pH 7,4 (vert).

L'instabilité des complexes formés entre l'ADN et le chitosane de DA 4% en tampon MOPS s'explique principalement par le fait qu'à pH 7,4, les amines du chitosane ne sont plus protonées. Cela provoque la précipitation du chitosane et empêche une complexation efficace avec l'ADN. Ces premiers résultats démontrent la nécessité d'améliorer la stabilité des complexes chitosane/ADN en conditions physiologiques.

3.2.1. Influence du degré d'acétylation

Le degré d'acétylation (DA) est un paramètre influant grandement sur les propriétés en solution du chitosane comme l'indique l'augmentation du pK_a avec le DA [4]. Vårum *et coll.* ont démontré que pour un DP 800, le pH de précipitation du chitosane augmente de 6,15 à 7,5 avec un DA variant de 1 à 50% [49]. Les variations d'intensité diffusée et d'absorbance ont été déterminées en fonction du pH pour l'ensemble des chitosanes réacétylés. Bien que la diffusion de la lumière soit une méthode plus sensible que la spectroscopie UV-vis, aucune différence significative n'a été observée au niveau de la détermination du pH critique (pH_C) de solubilité (Figure 11).

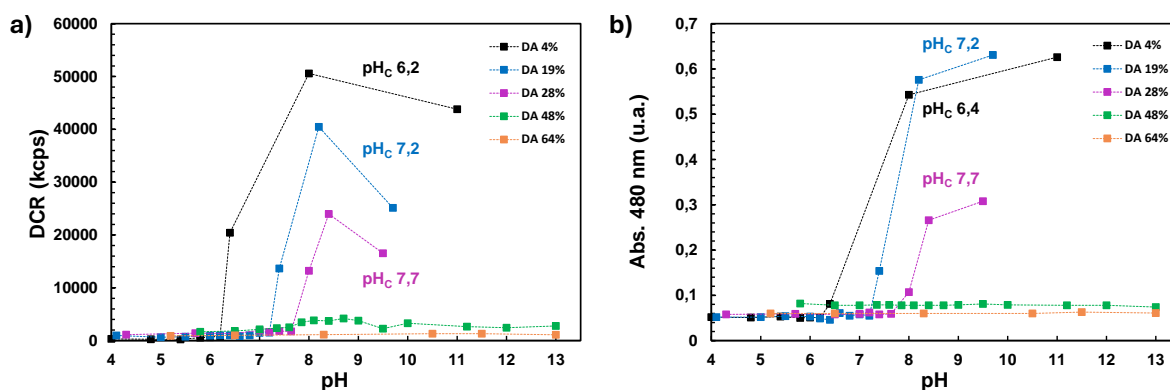
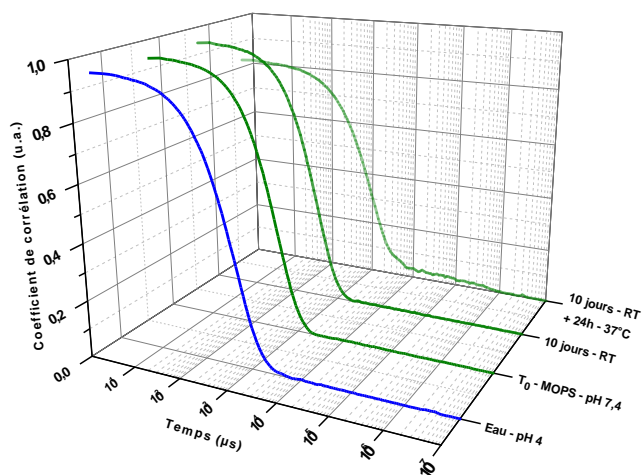
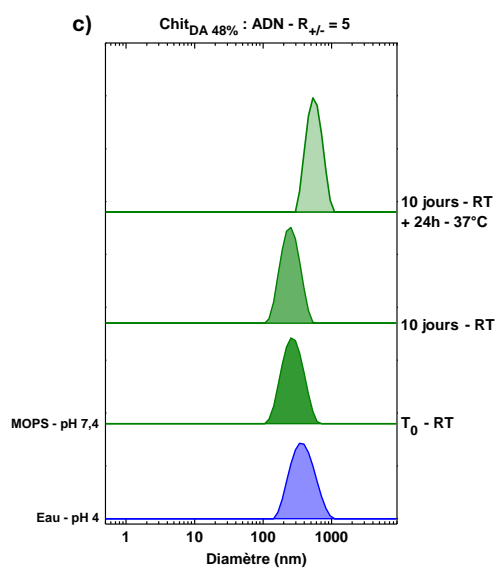
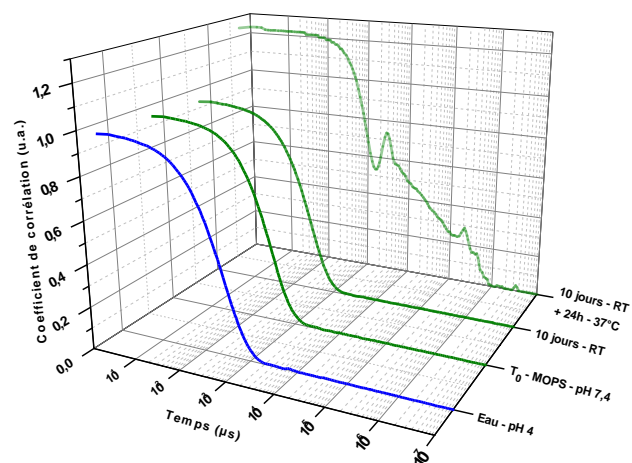
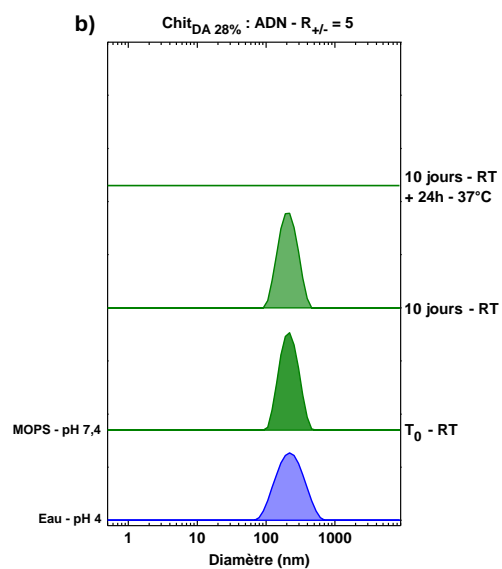
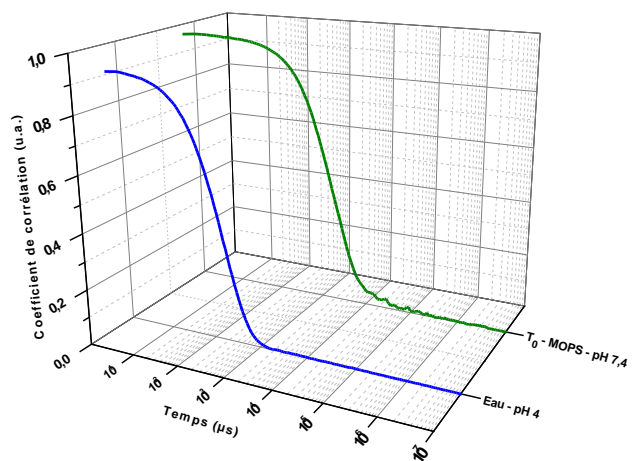
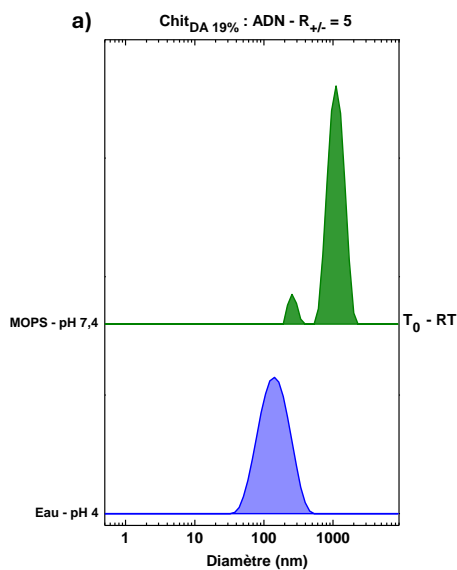


Figure 11. a) Intensité diffusée (DCR) et b) absorbance à 480 nm des chitosanes à différents DAs en fonction du pH.

Lorsque le DA augmente de 4% à 28%, le pH critique de solubilité (pH_c) passe de 6,2 à 7,7. Les chitosanes de DA 48% et 64% sont solubles sur toute la gamme de pH. Vårum avait observé une précipitation pour un DA de 50 %, ce qui peut s'expliquer par la différence de masses molaires des chitosanes, le chitosane utilisé dans son étude avait une masse molaire supérieure à 150 kg/mol alors que celui utilisé ici est seulement de 41 kg/mol. La complexation de l'ADN avec des chitosanes ayant des DAs plus élevés devrait permettre l'obtention de particules dont la couronne de chitosane en excès serait plus stable à pH 7,4. Toutefois, bien que l'augmentation de la solubilité du chitosane puisse effectivement favoriser la stabilité colloïdale de ces complexes, elle ne garantit pas nécessairement la persistance des interactions électrostatiques avec l'ADN à ce pH. L'augmentation du DA permet d'élargir la plage de solubilité du chitosane en fonction du pH, mais entraîne également une diminution de sa densité de charge. En effet, un DA plus élevé signifie que davantage d'unités glucosamine sont acétylées, ce qui réduit le nombre d'amines protonées disponibles. Cette diminution de la densité de charges affecte la capacité du chitosane à complexer efficacement l'ADN. Il est donc essentiel de trouver un équilibre avec un chitosane de DA suffisamment élevé pour assurer la stabilisation des complexes, tout en préservant ses propriétés de complexation. Étant donné que les complexes formés avec des chitosanes de DA 4% se sont révélés instables après dilution en tampon MOPS, des chitosanes de DA 19%, 28%, 48% et 64% ont été testés (Tableau 2 et Figure 12). Le rapport de charge R_{+/·} est maintenu à 5. Les tests de stabilité ont été effectués sur 10 jours à température ambiante suivis de plusieurs jours à 37°C.

Tableau 2. Caractérisation des complexes chitosane : ADN à différents DAs obtenue par analyses DLS.

DA	Conditions	pH	DCR (kcps)	Diamètre (nm)	PDI
4%	T ₀ - RT	4,0	32 900	110	0,24
	T ₀ - RT	7,4	2 200	6 900	0,88
19%	T ₀ - RT	4,0	34 900	120	0,21
	T ₀ - RT	7,4	22 500	1 200	0,41
28%	T ₀ - RT	4,0	57 500	200	0,23
	T ₀ - RT	7,4	24 600	205	0,10
	10 jours - RT	7,4	26 600	200	0,05
	10 jours - RT + 24h - 37°C	7,4	1 300	1 050	0,98
48%	T ₀ - RT	4,0	77 500	330	0,25
	T ₀ - RT	7,4	19 500	240	0,11
	10 jours - RT	7,4	19 800	230	0,10
	10 jours - RT + 24h - 37°C	7,4	900	600	0,33
64%	T ₀ - RT	4,0	96 500	430	0,23
	T ₀ - RT	7,4	10 500	260	0,12
	10 jours - RT	7,4	10 800	270	0,10
	10 jours - RT + 24h - 37°C	7,4	800	600	0,45



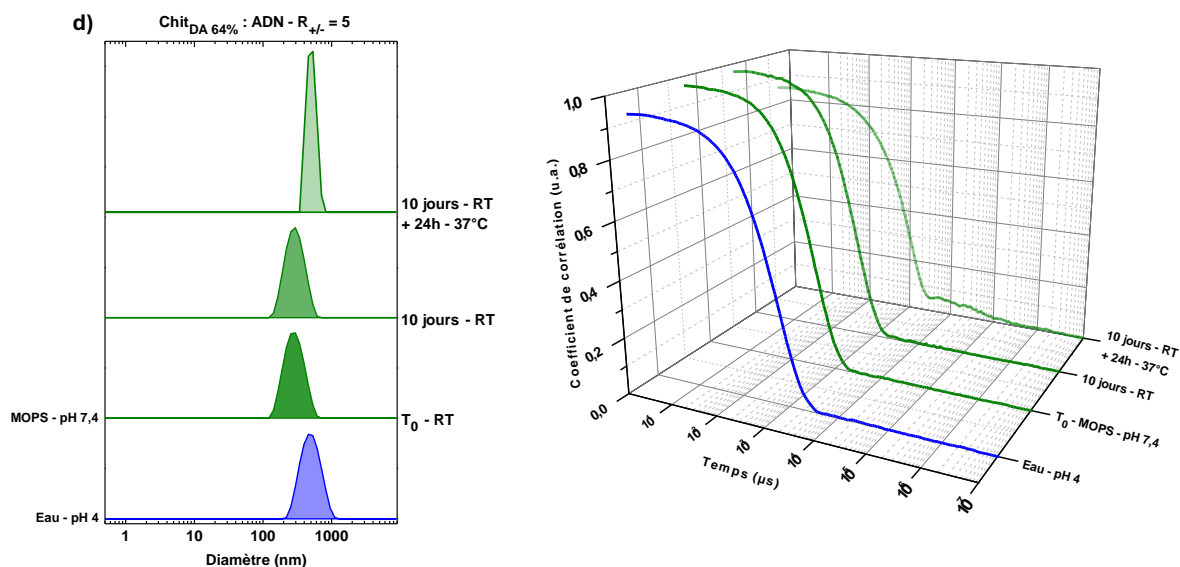


Figure 12. (gauche) Distributions de tailles et (droite) corrélogrammes des complexes a) Chit_{DA 19%} : ADN, b) Chit_{DA 28%} : ADN, c) Chit_{DA 48%} : ADN et d) Chit_{DA 64%} : ADN à un rapport de charge R_{+/-} de 5 dans l'eau à pH 4 (bleu) et après incubation en tampon MOPS à pH 7,4 (vert).

Le degré d'acétylation du chitosane est un premier levier pour améliorer la stabilité des complexes à pH physiologique. Alors que les complexes formés avec des chitosanes de DA 4% et 19% sont instables après seulement une heure d'incubation en tampon MOPS (Figure 10 et Figure 12), à partir d'un DA de 28% des complexes stables pendant 10 jours à température ambiante dans le même tampon sont obtenus (Figure 12). Pour les trois DAs concernés (28%, 48%, et 64%), la valeur de l'intensité diffusée (DCR) reste stable entre une heure et 10 jours d'incubation à température ambiante, attestant de la stabilité globale des complexes (Tableau 2). Toutefois, pour les DAs de 48% et 64%, une réduction significative du diamètre hydrodynamique est observée après dilution dans le MOPS (Tableau 2). En effet, la couronne électrostatique de chitosane, particulièrement épaisse à ces DAs pour un rapport de charge de 5, subit une contraction plus marquée à pH 7,4 en raison de l'écrantage des charges induit par les sels du tampon. Finalement, quelle que soit la valeur du DA, les complexes sont déstabilisés après 24 heures d'incubation à 37°C, ce qui se traduit par une augmentation marquée du diamètre et du PDI, des corrélogrammes multimodaux avec une variation du coefficient de corrélation à l'origine et une chute de l'intensité diffusée (Figure 12 et Tableau 2). Des résultats préliminaires ont permis de démontrer que le chitosane ne démixait pas, même à des taux de neutralisation élevés, avec l'augmentation de la température. L'agrégation induite par la température n'est donc pas attribuable à des propriétés thermosensibles du chitosane. En effet, son comportement de type LCST n'est rapporté dans la littérature que lorsqu'il est associé avec du PNIPAM [50].

En définitive, la stabilité des complexes formés avec les chitosanes ayant des DAs de 28%, 48% et 64% en tampon est directement liée à leur pH critique de solubilité, tous ces chitosanes étant solubles à pH 7,4 (Figure 11). Bien que l'augmentation du DA permette d'obtenir des complexes stables plus de 10 jours à température ambiante, elle ne permet pas de maintenir une charge suffisante à 37°C. Il est donc nécessaire d'améliorer la stabilité des complexes sur le long terme en conditions physiologiques de pH et de température.

3.2.2. Influence du rapport de charge

Les expériences préliminaires avec du Orange II ont permis de situer le rapport de charge $R_{+/-}$ optimal entre 2 et 5. Lorsque $R_{+/-} < 2$, la quantité de chitosane est insuffisante pour garantir une stabilisation efficace des complexes. En revanche, lorsque $R_{+/-} > 5$, la quantité de chitosane libre devient excessive, dépassant les 80%. Étant donné que les complexes formés avec des chitosanes de DA 28%, 48% et 64% à un $R_{+/-}$ de 5 sont stables après incubation en tampon MOPS, le rapport de charge a été réduit à 2,5 pour étudier son impact sur la stabilité des complexes (Figure 13).

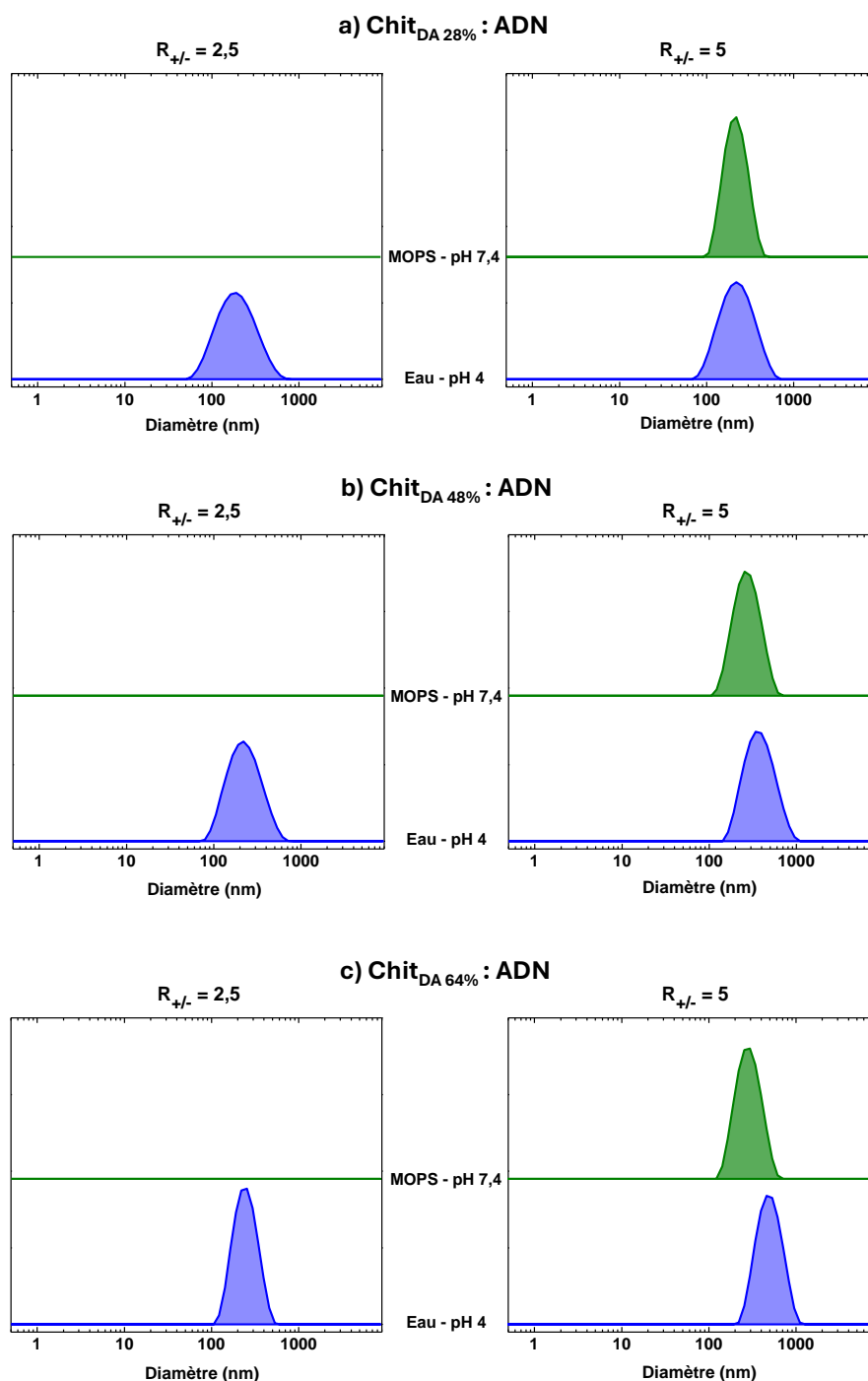


Figure 13. Distributions de tailles des complexes a) Chit_{DA 28%} : ADN, b) Chit_{DA 48%} : ADN et c) Chit_{DA 64%} : ADN à $R_{+/-} = 2,5$ (gauche) et $R_{+/-} = 5$ (droite) à pH 4 (bleu) et après 1 heure d'incubation en tampon MOPS pH 7,4 (vert).

Le rapport de charge entre les amines protonées du chitosane et les phosphates de l'ADN joue un rôle crucial dans la stabilité des complexes à pH physiologique. Les complexes à $R_{+/-} = 5$ sont stables pendant plus de 10 jours à température ambiante dans du MOPS pH 7,4 (Figure 12) alors que, quel que soit le DA du chitosane, les complexes formulés à un $R_{+/-}$ de 2,5 sont immédiatement déstabilisés dans ce même tampon (Figure 13). Le rapport de charge de 2,5 est certainement trop proche de la neutralité électrique, autrement dit l'excès de chitosane à la surface n'est pas suffisant pour stabiliser les complexes. En conclusion, le rapport de charge optimal pour les complexes chitosane/ADN est de 5. Ce rapport sera systématiquement utilisé par la suite.

3.3. Amélioration de la stabilité des complexes

L'optimisation des paramètres intrinsèques du chitosane ne permet d'obtenir qu'une stabilité limitée des complexes chitosane/ADN en conditions physiologiques. Bien que certains complexes soient stables à pH 7,4 en tampon MOPS, aucun n'a jusqu'à présent résisté à une température de 37°C. L'objectif est donc d'étudier l'influence de l'ajout d'ions zinc ou de l'utilisation de copolysaccharides à blocs linéaires chitosane-*b*-dextrane sur la stabilité des complexes en conditions physiologiques.

3.3.1. Ajout d'ions zinc

Généralités. Cette nouvelle approche consiste à trouver un moyen d'augmenter la cationicité du chitosane à pH physiologique en utilisant des liaisons de coordination. Une liaison de coordination est une liaison covalente impliquant le partage d'une paire d'électrons provenant du même atome. Ces liaisons sont généralement moins énergétiques que les liaisons covalentes simples et peuvent être réversibles. Des travaux antérieurs ont montré que les ions Zn^{2+} peuvent former des complexes de coordination à la fois avec les acides nucléiques, et avec les amines du chitosane [28]. La formation de complexes de coordination entre les amines du chitosane et des métaux tels que le cuivre, le fer ou le zinc est largement documentée [51],[52],[53]. Le "modèle en pendentif" est fréquemment évoqué, modèle selon lequel certains ions métalliques se lient de manière pendante à un groupe amino du chitosane. Domard, à partir d'analyses potentiométriques et de dichroïsme circulaire, a montré que le chitosane forme un complexe stable avec les ions Cu^{2+} de type $[CuNH_2(OH)_2]$ [54]. Ce modèle a ensuite été étendu et vérifié pour d'autres métaux comme le zinc, qui forme également des complexes de coordination via une unique amine du chitosane (Figure 14) [28].

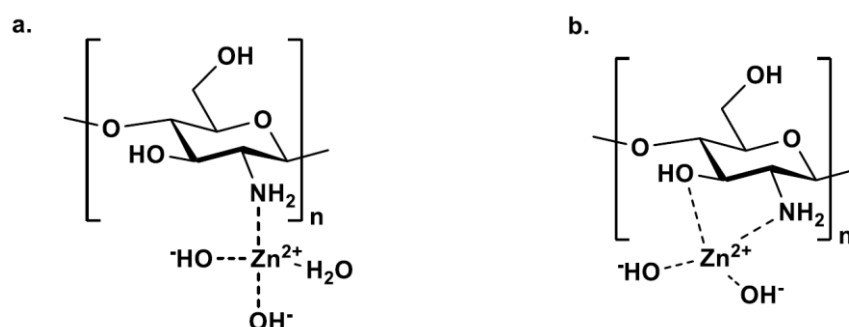


Figure 14. Structure du complexe chitosane- Zn^{2+} décrite par le modèle en pendentif impliquant a) une molécule d'eau ou b) le groupe hydroxyle du chitosane le plus proche [28],[54].

L'interaction des ions métalliques avec l'ADN a été largement étudiée entre les années 1950 et 1990 [55],[56]. Les différences de comportement des ions métalliques avec les polynucléotides ont montré que certains ions métalliques privilégient la formation de liaisons avec les phosphates, tandis que d'autres préfèrent interagir avec les bases azotées [57]. Les cations métalliques se liant à l'ADN au niveau des sites riches en électrons peuvent être classés en trois groupes principaux : ceux qui se fixent exclusivement aux groupes phosphate, comme les métaux alcalins et alcalino-terreux (K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+}), ceux qui se lient exclusivement aux bases azotées, tels que Ag^+ et Hg^{2+} , et enfin ceux qui ont la capacité de se lier à la fois aux phosphates et aux bases, avec des affinités variables : $Co^{2+} \sim Ni^{2+} < Mn^{2+} \sim Zn^{2+} < Cd^{2+} < Pb^{2+} < Cu^{2+}$ [55],[58],[59]. Le zinc est également reconnu pour sa capacité à condenser efficacement l'ADN en une forme appelée "M-ADN" (ADN métallique) en interagissant avec les bases des nucléotides (Figure 15) [56],[60],[61].

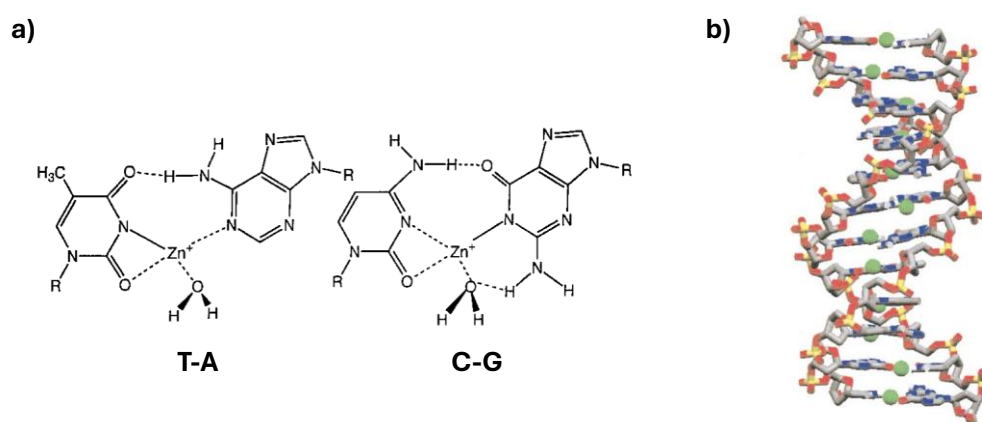


Figure 15. a) Appariement des bases en présence d'ions zinc. b) Structure de l'ADN métallique (M-ADN) avec les ions zinc représentés par des sphères vertes [61].

Bien que des ions métalliques comme le fer et le cuivre soient également naturellement présents dans l'organisme et capables de former des complexes de coordination avec les bases de l'ADN, leurs effets diffèrent de ceux du zinc. Dans le cas du fer, son incorporation entraîne la formation d'agrégats micrométriques, trop volumineux pour être utilisés dans des applications de transfection [28]. Le cuivre, en raison de ses propriétés redox, favorise la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), ce qui peut causer des dommages oxydatifs à l'ADN, entraînant des mutations ou des ruptures de brins [62]. Le zinc apparaît comme le candidat idéal pour cette étude en raison de sa capacité à interagir avec les bases azotées de l'ADN sans provoquer la formation d'agrégats ni causer des dommages à la structure de l'ADN.

Cette étude consiste à explorer l'utilisation des ions zinc comme intermédiaires dans l'interaction entre les acides nucléiques et le chitosane. Le zinc, en tant qu'intermédiaire, pourrait favoriser l'association entre les amines du chitosane et les bases des nucléotides à pH physiologique, lorsque les amines du chitosane ne sont plus protonées. De plus, la chélation du zinc par le chitosane pourrait jouer un rôle clé en préservant la charge positive des complexes à pH neutre. La capacité des ions zinc à stabiliser des complexes de chitosane avec du dextrane sulfate ou encore avec des siRNA a déjà été démontrée dans des travaux antérieurs [28],[63]. Cependant, dans ce travail, l'objectif sera d'évaluer la robustesse de cette approche sur des complexes de chitosane avec des acides nucléiques de grande taille, comme l'ADN

de thymus de veau ($M_n > 10\,000\,000$ g/mol). Le nitrate de zinc hexahydraté a été sélectionné en raison de sa solubilité supérieure dans l'eau par rapport à celle du chlorure de zinc.

Interactions de l'ADN avec le zinc et le calcium. La quantité d'ADN étant constante (0,1 g/L) lors de la formation des complexes, il a été décidé d'ajuster la quantité de zinc par rapport aux groupes phosphate de l'ADN, ce qui a permis de définir le rapport Zn:P (Zinc:Phosphate). La capacité du zinc à condenser l'ADN a été comparée à celle d'un autre cation divalent, le calcium, un métal alcalino-terreux. Pour ce faire, diverses quantités de zinc et de calcium ont été ajoutées à une solution d'ADN de thymus de veau, puis les échantillons ont été analysés par DLS (Figure 16 et Figure 17).

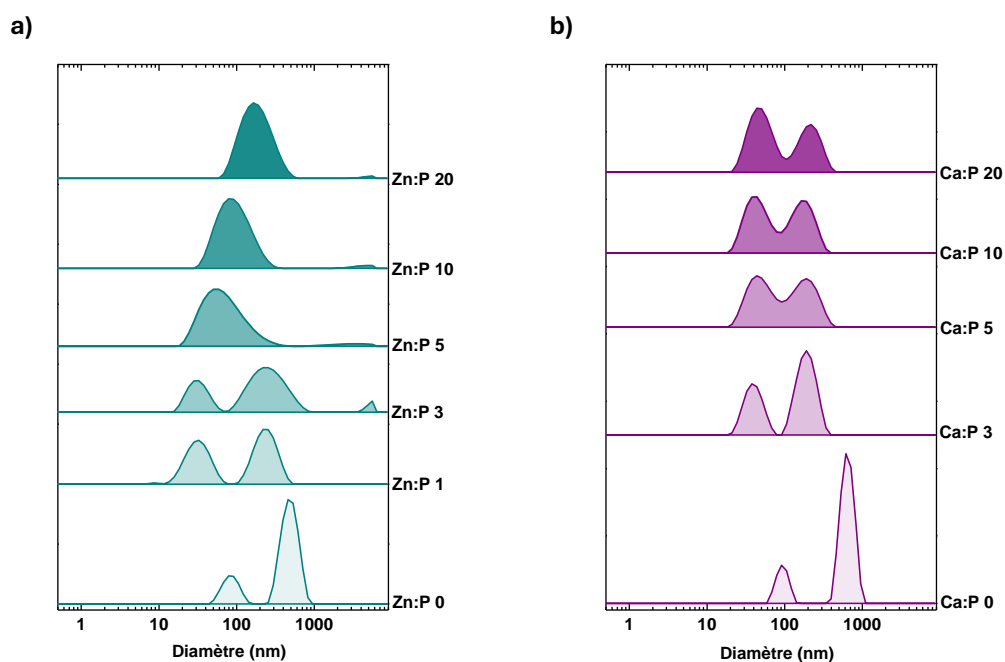


Figure 16. Distributions de tailles de l'ADN de thymus de veau à 0,1 g/L (0,3 mM en nucléotides) obtenues par DLS en présence de différentes quantités de a) zinc et b) calcium.

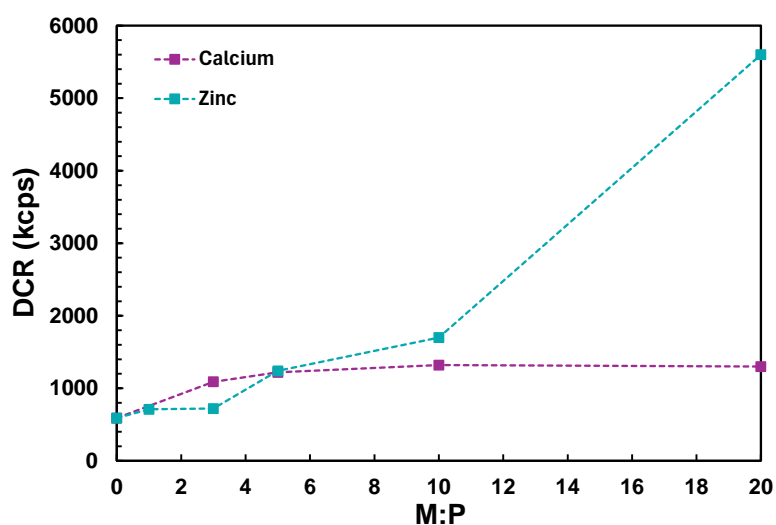


Figure 17. Intensité diffusée en fonction rapport métal/phosphate (M:P).

Alors que le zinc peut condenser l'ADN en particules nanométriques pour un rapport Zn:P supérieur à 10, la formation de nanoparticules n'a pas été observée en présence de calcium (Figure 17). La condensation de l'ADN par le zinc est observable par la présence d'une unique population sur la distribution de tailles (Figure 16) associée à une augmentation importante de l'intensité diffusée avec la concentration en zinc (Figure 17). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Tim Delas avec le zinc et le magnésium, un autre métal alcalino-terreux [28]. Comme le magnésium, le calcium interagit principalement avec l'ADN par des interactions électrostatiques avec les groupes phosphate [64]. Cependant, ces seules interactions ne suffisent pas à induire la compaction de l'ADN.

Détermination du rapport zinc:phosphate optimal. Dans un second temps, l'effet de l'incorporation des ions zinc a été étudié sur les complexes chitosane/ADN les moins stables en tampon MOPS, à savoir ceux formés par du chitosane de DA 4% et DA 19%. Les complexes ont été préparés à un rapport $R_{+/-}$ de 5 avec des rapports Zn:P variant de 3 à 20. Le zinc a été réparti de façon équimolaire dans les solutions de chitosane et d'ADN avant la formation des complexes. Avant toute chose, l'influence de l'ajout d'ions zinc dans les complexes a été étudiée à pH 4 (Figure 18).

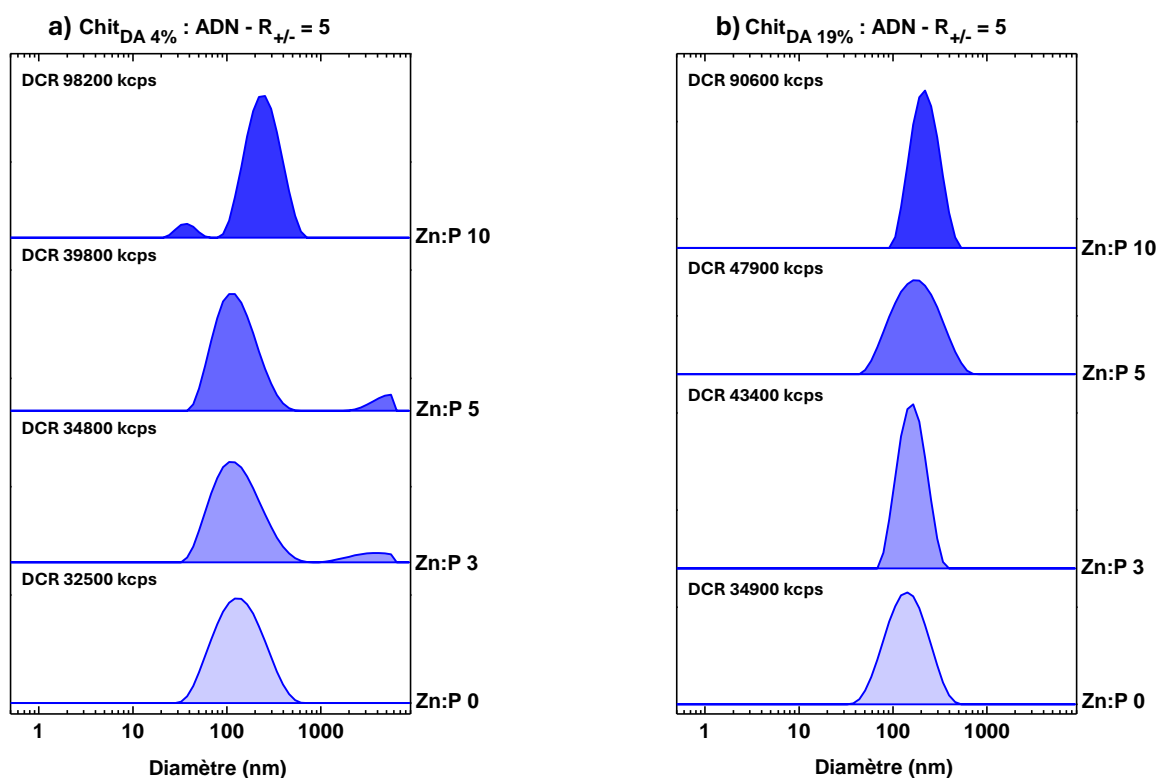


Figure 18. Distributions de tailles des complexes a) Chit_{DA 4%} : ADN et b) Chit_{DA 19%} : ADN à $R_{+/-} = 5$ dans l'eau à pH 4 à différents rapports Zn:P.

L'augmentation de la concentration en zinc s'accompagne d'une légère augmentation du diamètre hydrodynamique des complexes et d'une augmentation importante de l'intensité diffusée au-delà de Zn:P 5 (Figure 18). Ce phénomène est probablement lié à l'obtention de la forme M-ADN dont les propriétés diffusantes sont différentes de l'ADN natif en solution.

Après dilution en tampon MOPS à pH 7,4, les complexes formés avec le Chit_{DA 4%} se sont avérés instables, indépendamment de la quantité de zinc ajoutée. Des particules visibles à l'œil étant observables, les

analyses DLS n'ont donc pas été effectuées. En revanche, les complexes formés avec le Chit_{DA 19%} ne présentent pas de particules micrométriques, ce qui a permis leur analyse par DLS (Figure 19), à l'exception de ceux formulés à un rapport Zn:P de 20, où des particules en suspension ont été observées.

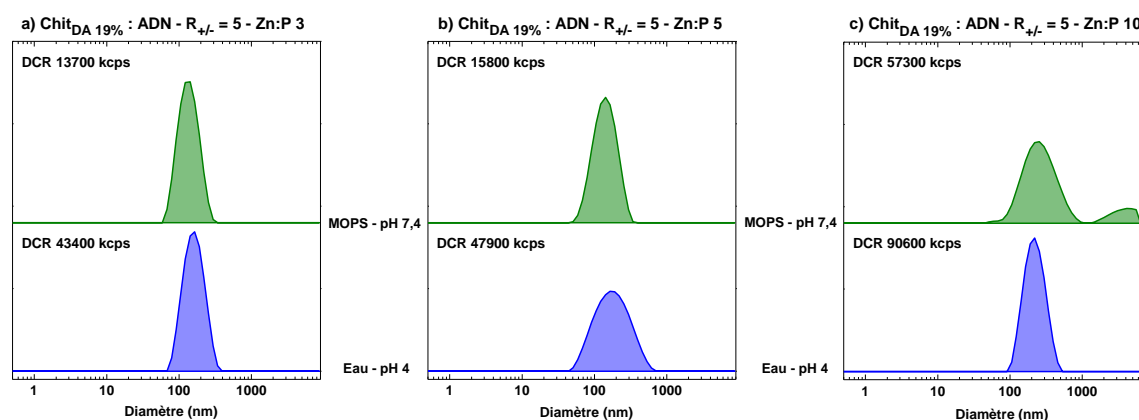


Figure 19. Distributions de tailles des complexes Chit_{DA 19%} : ADN formés à $R_{+/-} = 5$ avec différents rapports Zn:P a) Zn:P 3, b) Zn:P 5 et c) Zn:P 10, en bleu dans l'eau à pH 4 et en vert après 1 heure d'incubation en tampon MOPS à pH 7,4.

Au-delà d'un rapport Zn:P de 5, l'excès de zinc devient problématique, entraînant la formation de grosses particules (Figure 19.c), certaines visibles à l'œil et perturbant la distribution de tailles. Ce phénomène s'explique par la présence d'un excès de zinc non engagé dans la formation des complexes et qui, à partir de pH 7, commence à précipiter sous forme d'hydroxyde de zinc ($Zn(OH)_2$) [65]. Une expérience de contrôle a été réalisée par ajout de nitrate de zinc dans le tampon MOPS pH 7,4 à différentes concentrations. Il a été observé qu'au-delà d'une quantité de zinc correspondant à un rapport Zn:P de 10, les solutions devenaient turbides avec des particules qui sédimentaient, tandis qu'en dessous de ce rapport, les solutions restaient limpides. Un dernier point concernant la cytotoxicité du zinc est à considérer ; des études ayant démontré que pour des rapports Zn:P supérieurs à 10, le zinc pouvait compromettre la viabilité cellulaire [28].

Pour des rapports Zn:P de 3 et 5, la quantité de zinc est suffisante pour stabiliser les complexes à pH 7,4 (Figure 19.a et b). En l'absence de zinc, ces mêmes complexes Chit_{DA 19%} : ADN, à $R_{+/-} = 5$, s'étaient révélés instables dès leur dilution en tampon MOPS (Figure 10). L'effet stabilisant induit par l'ajout de zinc est ainsi clairement mis en évidence. Afin de déterminer le rapport Zn:P optimal, la stabilité des complexes a été suivie sur plusieurs jours (Figure 20).

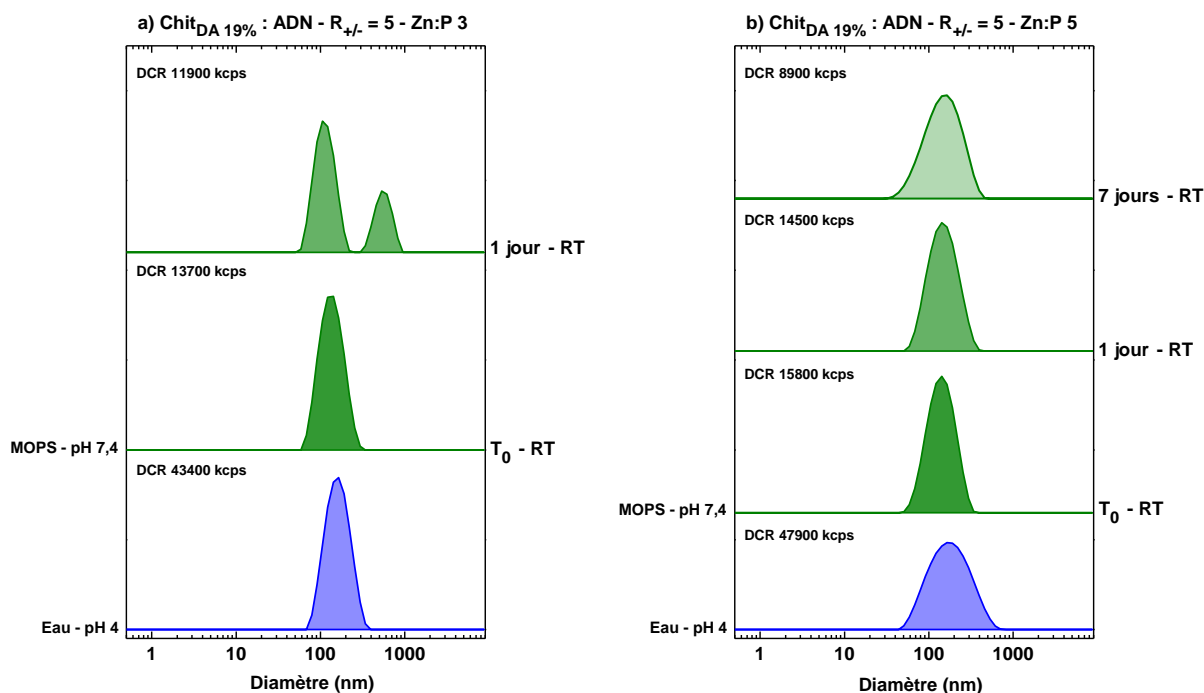
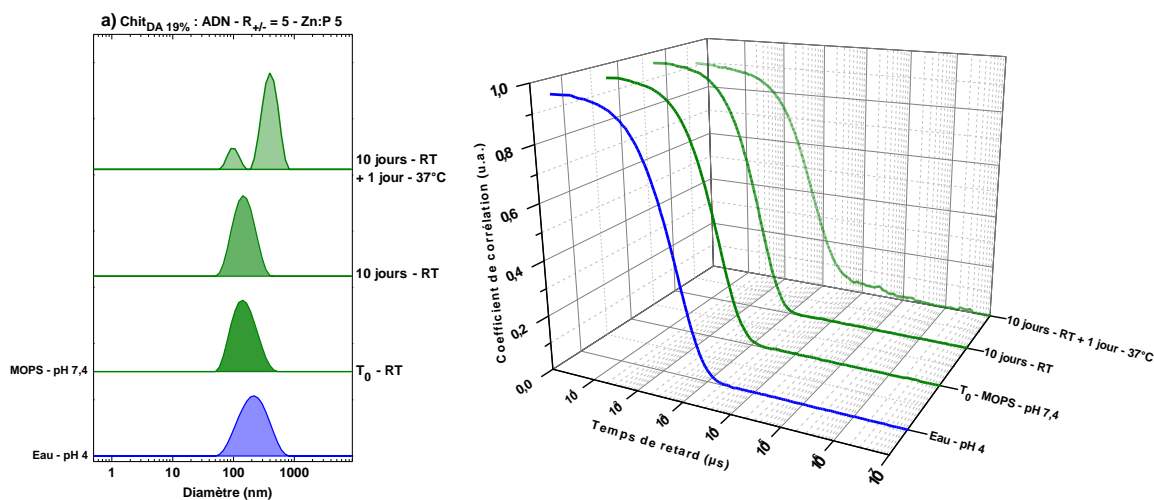


Figure 20. Distributions de tailles des complexes Chit_{DA 19%} : ADN à R_{+/-} = 5 à un rapport a) Zn:P 3 et b) Zn:P 5, en bleu dans l'eau à pH 4 et en vert après incubation en tampon MOPS à pH 7,4.

Avec un rapport Zn:P de 5, les complexes restent stables après 7 jours d'incubation à température ambiante, tandis qu'à un rapport Zn:P de 3, ils montrent des signes de déstabilisation dès le premier jour en tampon comme en témoigne la distribution de tailles bimodale (Figure 20.a). Ainsi, le rapport Zn:P optimal a été fixé à 5 et sera utilisé pour les expériences ultérieures.

Stabilité des complexes chitosane/ADN/zinc en conditions physiologiques. Après avoir démontré l'effet stabilisant du zinc sur le chitosane DA 19% à pH 7,4 et à température ambiante, l'étude a été étendue à la bibliothèque complète des chitosanes de différents DAs (Figure 21). En l'absence de zinc, ces complexes se révélaient stables pendant 10 jours à température ambiante après incubation en tampon MOPS mais se déstabilisaient dès lors que la température augmentait à 37°C (Figure 12). L'objectif est désormais de vérifier si l'ajout de zinc contribue à renforcer la stabilité des complexes en conditions de pH et de température physiologiques (Figure 21).



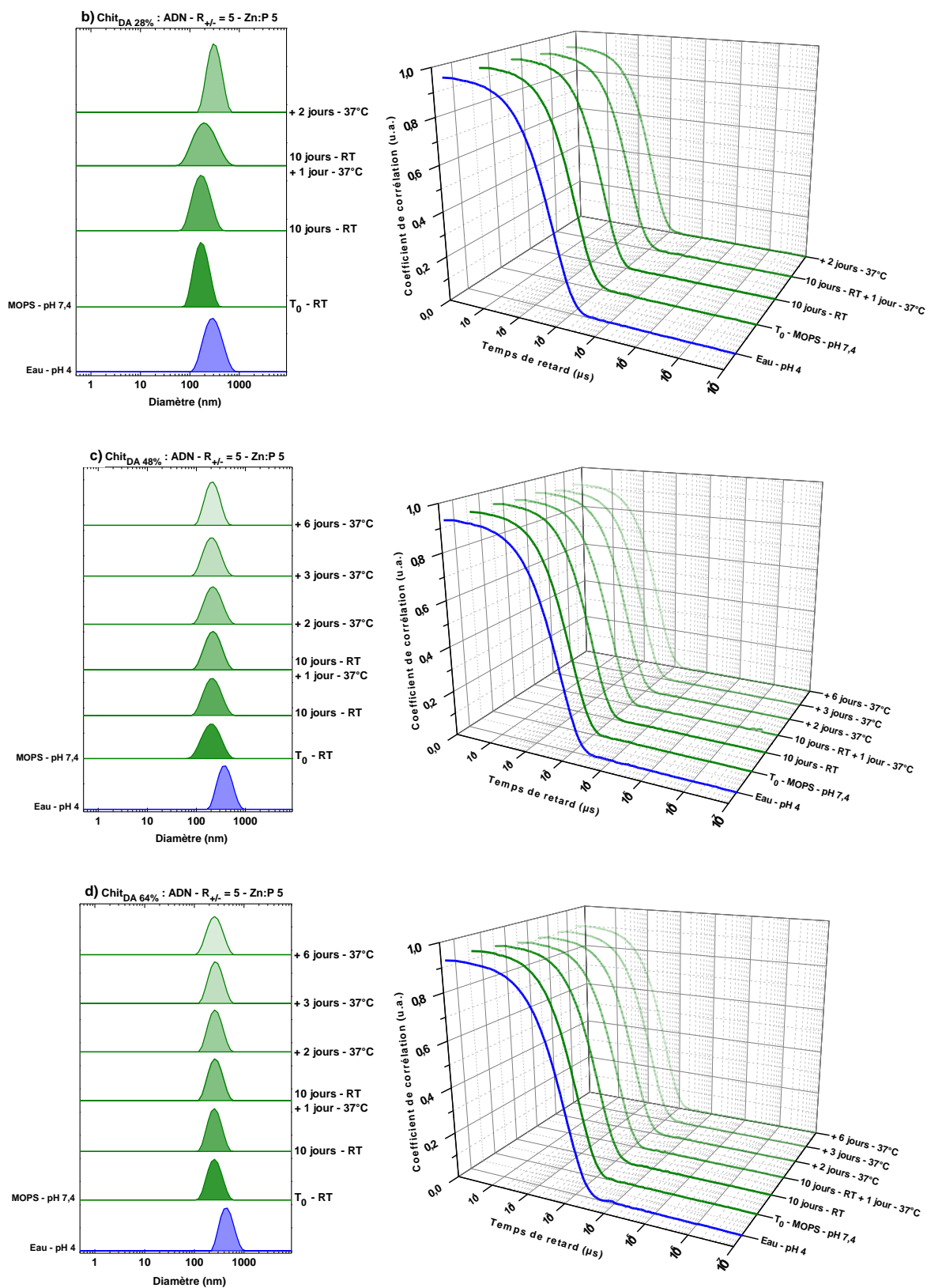


Figure 21. (gauche) Distributions de tailles et (droite) corrélogrammes des complexes a) Chit_{DA 19%} : ADN, b) Chit_{DA 28%} : ADN, c) Chit_{DA 48%} : ADN et d) Chit_{DA 64%} : ADN à R_{+/-} = 5 et Zn:P 5 dans l'eau à pH 4 (bleu) et après incubation en tampon MOPS à pH 7,4 (vert).

En présence de zinc, les complexes à base de chitosane DA 19% sont stables en tampon MOPS plus de 10 jours à température ambiante (Figure 21.a), tandis qu'en l'absence de zinc, leur stabilité est

immédiatement compromise après dilution dans ce tampon (Figure 12). Pour le chitosane DA 28%, les complexes avec le zinc demeurent stables pendant 10 jours à température ambiante, suivis de 24 heures à 37°C (Figure 21.b). Toutefois, après 48 heures à 37°C, une nette diminution de l'intensité diffusée suggère un début de déstabilisation (Tableau 3). En revanche, en présence de zinc, les complexes formés avec les chitosanes de DA 48% et 64% sont remarquablement stables, ne présentant aucun signe de déstabilisation pendant 10 jours à température ambiante suivis de 6 jours à 37°C (Figure 21.c et d). Cette stabilité est confirmée par l'analyse des distributions de tailles et des corrélogrammes, ainsi que par l'invariance du DCR et du PDI tout au long de la période de suivi (Tableau 3).

Tableau 3. Suivi DLS de l'évolution des complexes chitosane/ADN à différents DAs à $R_{+/-} = 5$ et $Zn:P = 5$.

DA	Conditions	pH	DCR (kcps)	Diamètre (nm)	PDI
19%	T ₀ - RT	4,0	53 500	175	0,24
	T ₀ - RT	7,4	15 800	135	0,20
	10 jours - RT	7,4	16 400	137	0,12
	10 jours - RT + 24h - 37°C	7,4	600	370	0,40
28%	T ₀ - RT	4,0	64 500	250	0,23
	T ₀ - RT	7,4	18 500	160	0,18
	10 jours - RT	7,4	19 600	160	0,13
	10 jours - RT + 1 jour - 37°C	7,4	20 400	180	0,18
	10 jours - RT + 2 jours - 37°C	7,4	7 600	260	0,23
48%	T ₀ - RT	4,0	77 200	340	0,19
	T ₀ - RT	7,4	22 100	190	0,15
	10 jours - RT	7,4	23 900	195	0,14
	10 jours - RT + 1 jour - 37°C	7,4	26 700	200	0,14
	10 jours - RT + 2 jours - 37°C	7,4	25 400	200	0,13
	10 jours - RT + 3 jours - 37°C	7,4	26 200	190	0,13
	10 jours - RT + 6 jours - 37°C	7,4	24 800	200	0,11
64%	T ₀ - RT	4,0	96 700	410	0,17
	T ₀ - RT	7,4	26 800	230	0,11
	10 jours - RT	7,4	29 400	240	0,10
	10 jours - RT + 1 jour - 37°C	7,4	32 800	240	0,12
	10 jours - RT + 2 jours - 37°C	7,4	35 200	240	0,10
	10 jours - RT + 3 jours - 37°C	7,4	35 200	240	0,13
	10 jours - RT + 6 jours - 37°C	7,4	31 700	240	0,11

La capacité des ions zinc à stabiliser efficacement les complexes chitosane/ADN en tampon MOPS est clairement mise en évidence dans cette étude. Cependant, lorsque le DA est trop faible, l'incorporation des ions zinc ne suffit pas à maintenir la stabilité des complexes à pH physiologique. Ce procédé de stabilisation présente l'avantage majeur de ne pas altérer les propriétés intrinsèques du chitosane, qui conserve ainsi sa biocompatibilité et sa faible toxicité, des critères essentiels pour des applications de transfection.

Comparaison de l'influence du zinc et du calcium sur la stabilité des complexes. Bien qu'il ait été établi précédemment que les ions calcium ne sont pas en mesure de condenser l'ADN de la même manière que les ions zinc (Figure 16), leur capacité à stabiliser les complexes en tampon MOPS a tout de même été évaluée et comparée à celle du zinc. Les tests ont été réalisés sur des complexes $\text{Chit}_{\text{DA } 28\%} : \text{ADN}$ avec un rapport de charge $R_{+/-} = 5$ et un rapport métal : phosphate (M:P) de 5 (Figure 22).

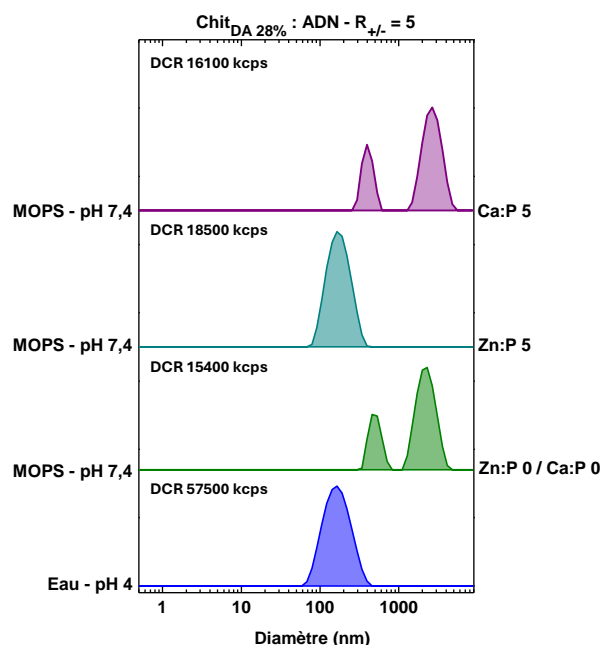


Figure 22. Distributions de tailles des complexes $\text{Chit}_{\text{DA } 28\%} : \text{ADN}$ à $R_{+/-} = 5$ en présence d'ions zinc et d'ions calcium.

Finalement, le calcium ne parvient pas à stabiliser les complexes à pH physiologique, soulignant ainsi l'importance cruciale des interactions spécifiques des ions zinc avec l'ADN et le chitosane. Contrairement au calcium, qui interagit uniquement par interactions électrostatiques avec les phosphates de l'ADN, le zinc peut former des complexes de coordination avec les amines du chitosane et les bases de l'ADN, ce qui assure une stabilisation efficace des complexes chitosane/ADN.

Influence de la force ionique. La stabilité des complexes en présence de zinc a été établie à pH et température physiologiques, il reste donc un dernier paramètre à examiner : la force ionique. Jusqu'à présent, le tampon MOPS utilisé avait une force ionique de 50 mM, alors que la concentration physiologique est de 154 mM. Par conséquent, il a été décidé d'évaluer la stabilité des complexes en les diluant dans une solution saline de NaCl à 154 mM (en l'absence de MOPS). Ces tests préliminaires ont été réalisés à température ambiante sur les complexes $\text{Chit}_{\text{DA } 19\%} : \text{ADN}$ et $\text{Chit}_{\text{DA } 28\%} : \text{ADN}$, à des rapports $R_{+/-} = 5$ et Zn:P 5 (Figure 23).

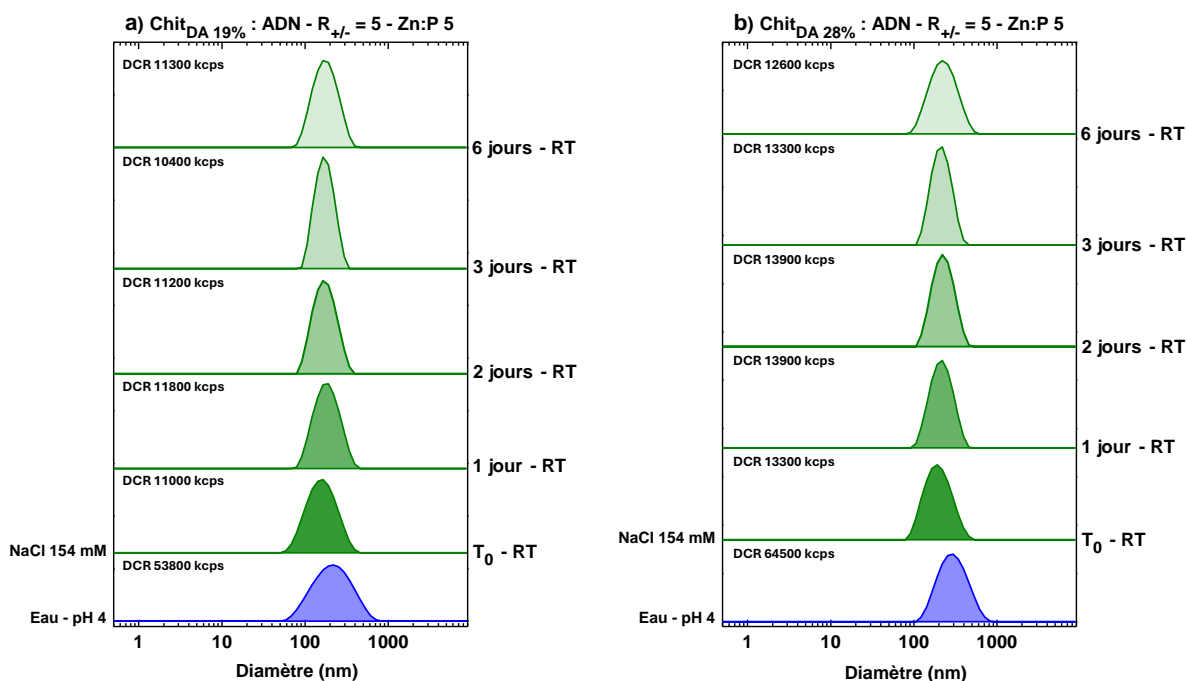


Figure 23. Distributions de tailles des complexes a) Chit_{DA 19%} : ADN et b) Chit_{DA 28%} : ADN à R_{+/-} = 5 et Zn:P 5, en bleu dans l'eau à pH 4 et en vert après incubation dans une solution de NaCl à 154 mM.

Les tailles des complexes ainsi que l'intensité diffusée n'évoluent pas pendant 6 jours à température ambiante. Les corrélogrammes associés, bien que non présentés ici, présentent un caractère monomodal, confirmant ainsi cette stabilité. Ces observations ont permis de conclure quant à la stabilité des complexes sous l'effet d'une force ionique de 154 mM à température ambiante.

Pour analyser l'effet combiné de la force ionique et du pH, les complexes Chit_{DA 19%} : ADN et Chit_{DA 28%} : ADN à R_{+/-} = 5 et Zn:P 5 ont été dilués à température ambiante dans une solution de PBS (tampon phosphate salin) à une force ionique de 154 mM et un pH de 7,4. Toutefois, dès leur dilution dans le PBS, des particules en suspension visibles à l'œil ont rapidement été observées, suggérant que les complexes s'agrègent dans ce milieu. Ce résultat est surprenant, car les tests précédents ont confirmé la stabilité des complexes à la fois à pH 7,4 et à une force ionique de 154 mM, indépendamment l'un de l'autre. Pour déterminer si cette instabilité résulte de l'association du pH et de la force ionique ou d'une spécificité du tampon PBS, des complexes Chit_{DA 19%} : ADN et Chit_{DA 48%} : ADN, à un rapport R_{+/-} = 5 et Zn:P 5, ont été dilués dans un tampon MOPS à 50 mM complété par NaCl pour atteindre une force ionique de 154 mM, et le pH ajusté à 7,4. Les complexes formés avec le chitosane DA 48 % ont été privilégiés par rapport à ceux utilisant le chitosane DA 28 %, en raison de leur meilleure stabilité en tampon MOPS 50 mM à pH 7,4. La stabilité des complexes dans le milieu MOPS/NaCl 154 mM tamponné à pH 7,4 a ensuite été suivie sur plusieurs jours à 37°C (Figure 24).

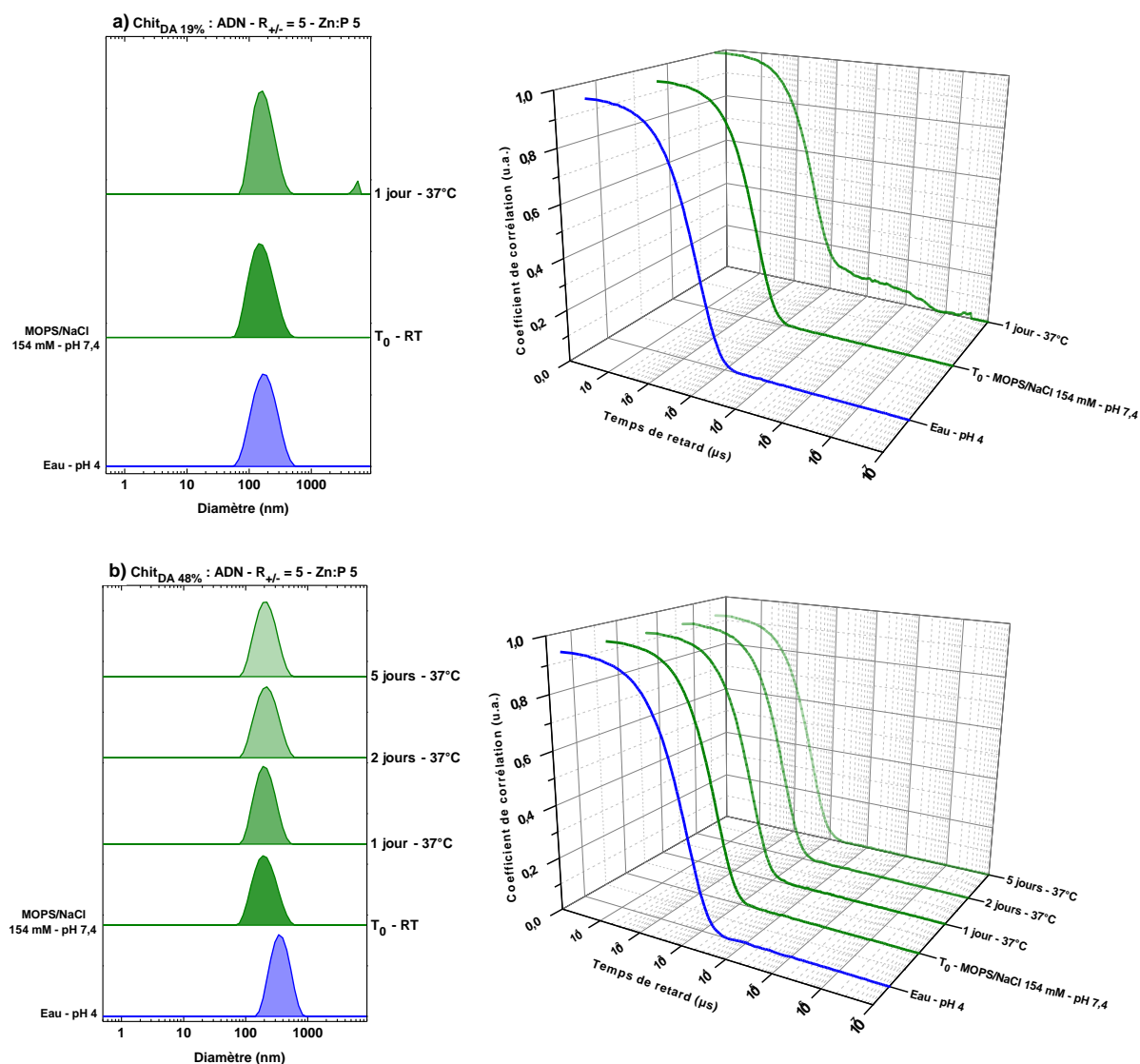


Figure 24. (gauche) Distributions de tailles et (droite) corrélogrammes des complexes a) Chit_{DA} 19% : ADN et b) Chit_{DA} 48% : ADN à R_{+/}- = 5 et Zn:P 5 dans l'eau à pH 4 (bleu) et après incubation en tampon MOPS/NaCl 154 mM à pH 7,4 (vert).

Les résultats de stabilité des complexes en tampon MOPS/NaCl à 154 mM et pH 7,4 sont comparables à ceux obtenus à une force ionique de 50 mM et pH 7,4 (Figure 21 et Figure 24). Les complexes à base de Chit_{DA} 19% sont déstabilisés par le passage à 37°C, tandis que ceux à base de Chit_{DA} 48% sont stables plus de 5 jours à 37°C en tampon MOPS/NaCl à 154 mM et pH 7,4. Ces observations soulignent que l'ajout d'ions zinc améliore la stabilité des complexes en conditions physiologiques de force ionique, de pH et de température combinés. Ces résultats indiquent également que la déstabilisation observée précédemment dans le PBS est certainement due à la composition spécifique de ce tampon, et non à l'association d'un pH de 7,4 à une force ionique de 154 mM.

Stabilité des complexes dans le PBS. Le tampon PBS est couramment utilisé pour simuler le milieu biologique en raison de son pH et de sa force ionique. Sa composition typique comprend du chlorure de sodium (NaCl) à une concentration de 137 mM, du chlorure de potassium (KCl) à 2,7 mM, du dihydrogénophosphate de potassium (KH₂PO₄) à 1,8 mM, et de l'hydrogénophosphate de sodium (Na₂HPO₄) à 10 mM. Pour identifier l'impact de chacun de ces sels sur la stabilité des complexes, le PBS

a été décomposé en trois solutions distinctes. Les complexes formés entre le chitosane de DA 19% avec l'ADN en présence de zinc ont d'abord été dilués au cinquième dans une solution S1, contenant uniquement du NaCl et du KCl aux concentrations mentionnées précédemment. Ensuite, un autre échantillon des mêmes complexes a été dilué dans une solution S2, comprenant du NaCl, du KCl et du KH_2PO_4 . Enfin, les complexes ont été dilués dans une solution S3, correspondant au PBS avec du NaCl, du KCl, du KH_2PO_4 et du Na_2HPO_4 . La stabilité des complexes $\text{Chit}_{\text{DA } 19\%} : \text{ADN}$ a été suivie pendant plusieurs jours à température ambiante dans ces différentes solutions (Figure 25).

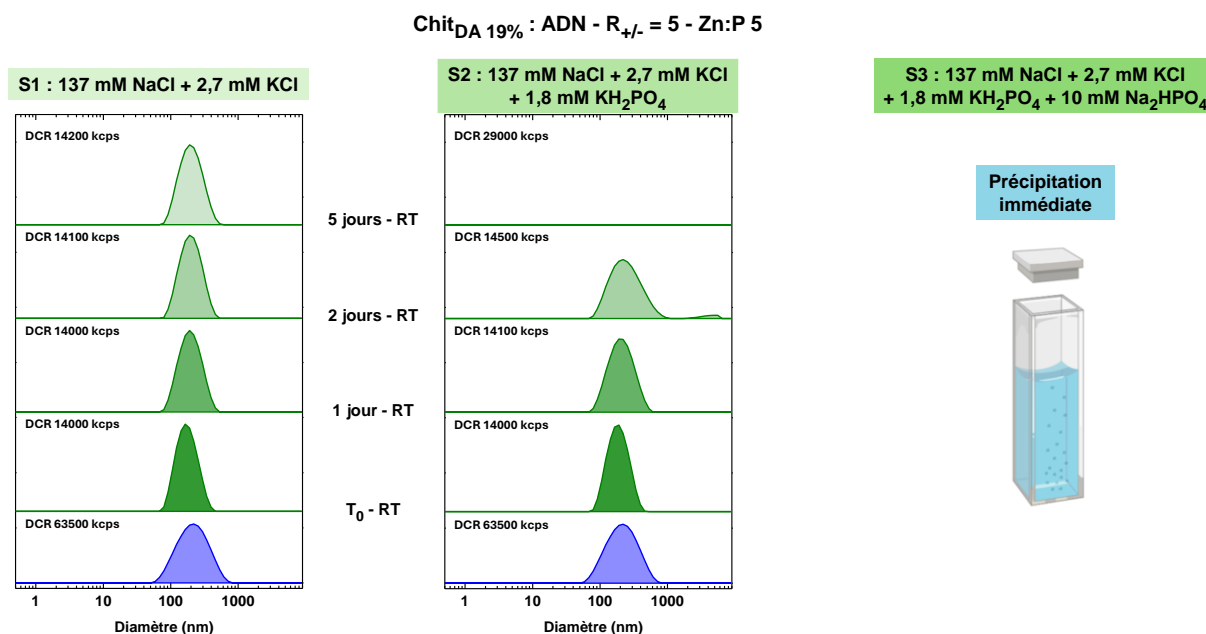


Figure 25. Distributions de tailles des complexes $\text{Chit}_{\text{DA } 19\%} : \text{ADN}$ à $R_{+/-} = 5$ et $\text{Zn:P } 5$ dans (bleu) de l'eau à pH 4 et (vert) dans (de gauche à droite) les solutions S1 (NaCl + KCl), S2 (NaCl + KCl + KH_2PO_4) et S3 (NaCl + KCl + KH_2PO_4 + Na_2HPO_4).

La stabilité des complexes $\text{Chit}_{\text{DA } 19\%} : \text{ADN}$ à $R_{+/-} = 5$ et $\text{Zn:P } 5$ a précédemment été établie sur une période de 10 jours à température ambiante (Figure 21). Dans la présente étude, il a été observé que ces complexes sont stables pendant plus de 5 jours à température ambiante dans la solution S1, qui ne contient que du NaCl et du KCl. En revanche, une déstabilisation notable des complexes se manifeste dès 2 jours dans la solution S2, qui inclut du dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4), avec une agrégation totale des complexes après 5 jours d'incubation (Figure 25). Ce premier résultat indique clairement que les ions dihydrogénophosphate ont un effet néfaste sur la stabilité des complexes. Après dilution dans la solution S3, les complexes précipitent immédiatement, formant des particules en suspension visibles à l'œil nu. En conséquence, les solutions n'ont pas été analysées par DLS. Cette observation suggère que les ions phosphate présents dans la composition du PBS, et notamment les ions hydrogénophosphate, compromettent la stabilité des complexes. Une hypothèse possible serait une compétition entre les ions phosphate du PBS et les groupes phosphate de l'ADN vis-à-vis de la complexation électrostatique avec le chitosane et de la coordination avec le zinc, perturbant ainsi les interactions essentielles à la cohésion des complexes.

Les complexes $\text{Chit}_{\text{DA } 48\%} : \text{ADN}$ à $R_{+/-} = 5$ et $\text{Zn:P } 5$, ont démontré une stabilité remarquable en conditions physiologiques de pH et de force ionique, en restant stables pendant plus de 5 jours à 37°C

dans un tampon MOPS/NaCl à 154 mM et pH 7,4 (Figure 24). Par conséquent, leur stabilité et leur résistance au PBS ont été évaluées. Les mêmes expériences visant à étudier l'impact des différents composants du PBS ont été réalisées en dissolvant les complexes Chit_{DA 48%} : ADN dans les solutions S1, S2 et S3 décrites précédemment (Figure 26).

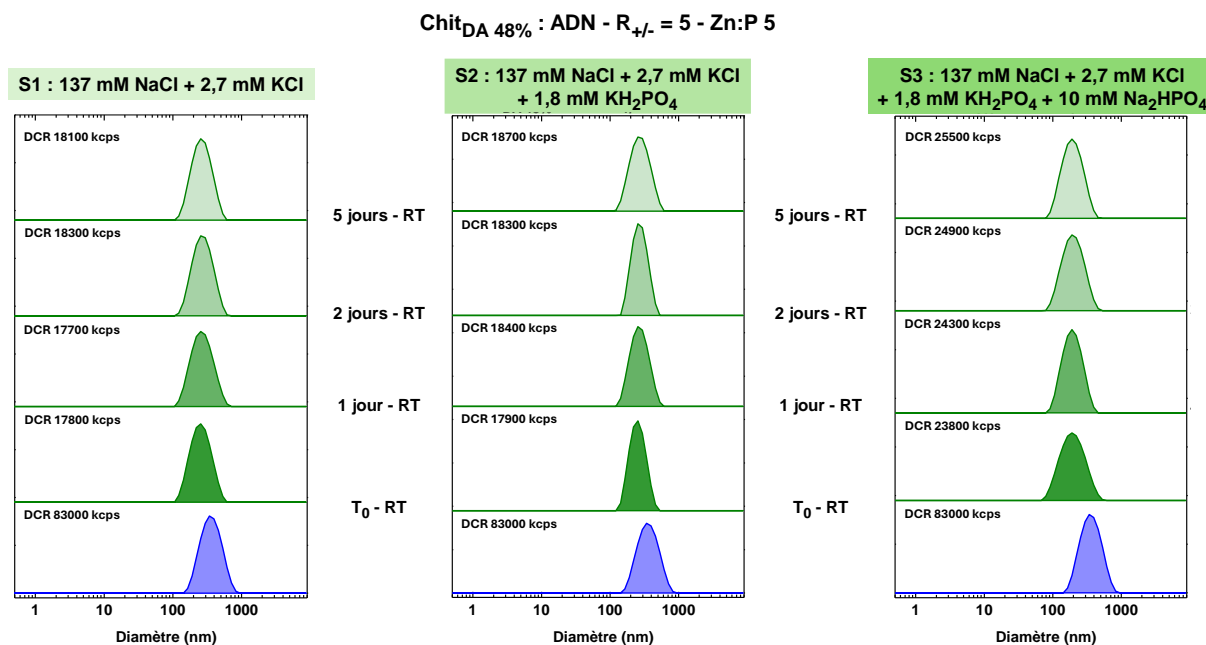


Figure 26. Distributions de tailles des complexes Chit_{DA 48%} : ADN à R_{+/-} = 5 et Zn:P 5 dans (bleu) de l'eau à pH 4 et (vert) dans (de gauche à droite) les solutions S1 (NaCl + KCl), S2 (NaCl + KCl + KH₂PO₄) et S3 (NaCl + KCl + KH₂PO₄ + Na₂HPO₄).

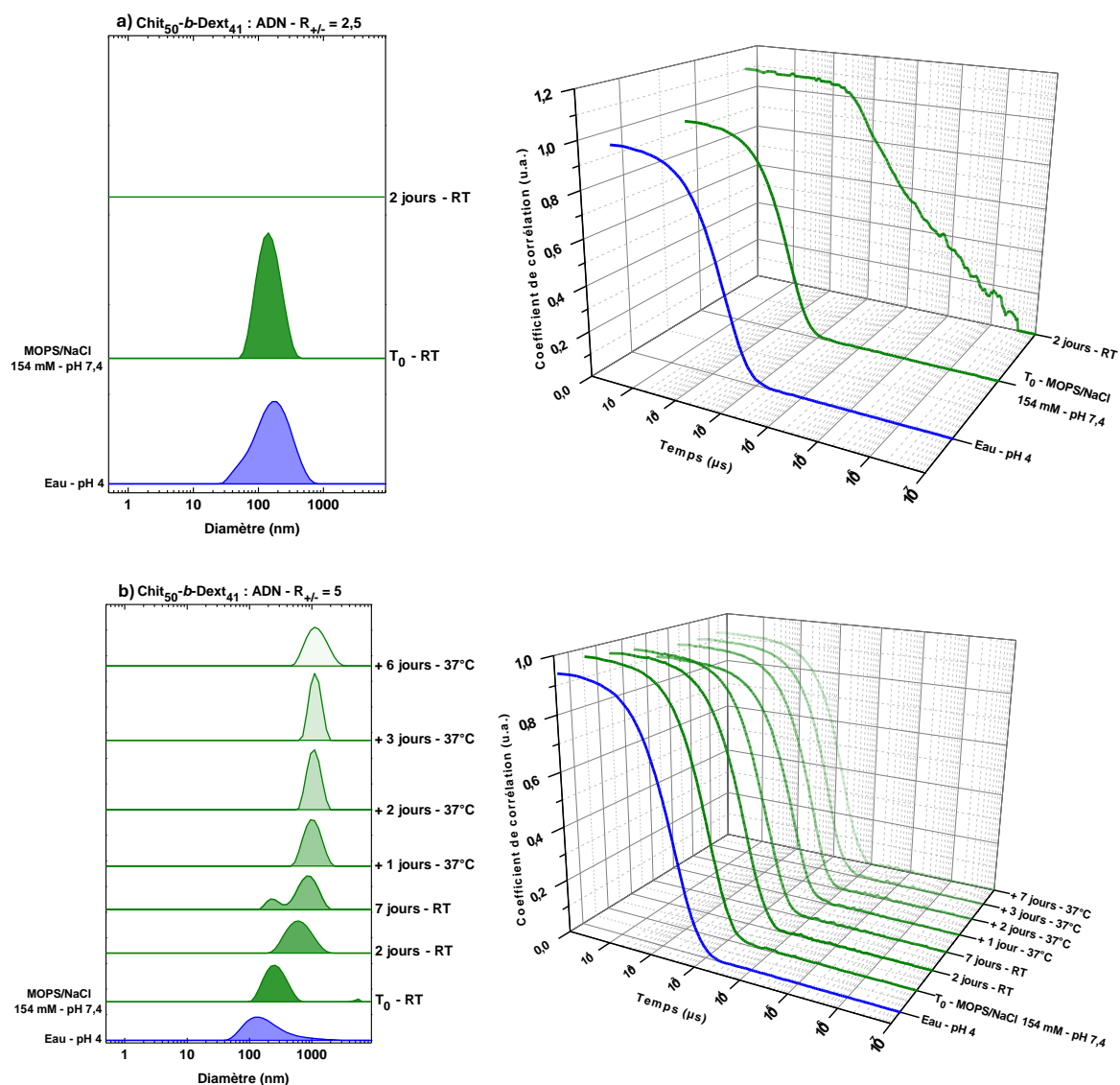
Les complexes formés à partir d'un chitosane de DA 48% en présence de zinc présentent une stabilité remarquable qui leur permet de résister à la déstabilisation induite par les ions phosphate présents dans le PBS. En effet, ces complexes ont conservé leur intégrité même après une incubation de cinq jours à température ambiante dans la solution S3, qui est une reconstitution d'une solution de PBS (Figure 26). À notre connaissance, il s'agit d'une des rares démonstrations de la stabilité de complexes à base de chitosane non modifié chimiquement dans un tampon PBS.

3.3.2. Copolymère chitosane-*b*-dextrane

L'agrégation et la déstabilisation des complexes sont principalement attribuées à l'insolubilité du chitosane à pH physiologique. Pour pallier cette limitation, une stratégie alternative consiste à utiliser les copolysaccharides à blocs linéaires chitosane-*b*-dextrane décrits dans le chapitre précédent pour la formation des complexes. Ces copolysaccharides présentent un avantage majeur : leur pH critique de solubilité est plus élevé que celui du chitosane seul, avoisinant un pH de 7,4, ce qui les rend plus adaptés aux conditions physiologiques. De plus, ces copolysaccharides conservent les propriétés essentielles du chitosane, en particulier l'intégrité de ses amines latérales, responsables de l'interaction et de la complexation avec les acides nucléiques. Cette approche permet ainsi d'améliorer la stabilité des complexes grâce à la présence du bloc dextrane tout en conservant les capacités de complexation du chitosane.

Pour évaluer l'efficacité de complexation de ces copolysaccharides, deux d'entre eux ont été sélectionnés pour cette étude : le Chit₅₀-*b*-Dext₄₁ et le Chit₅₀-*b*-Dext₈₆. Les copolysaccharides basés sur du chitosane avec un DP de 50 ont été privilégiés par rapport à ceux ayant un DP de 25, en raison de leur capacité de complexation supposée meilleure. Il convient de noter que le Chit₅₀ utilisé dans cette étude a un DA de 4%. Comme mentionné précédemment, un faible degré d'acétylation ne permet pas de former des complexes stables en conditions physiologiques. L'objectif est donc d'évaluer si l'ajout de dextrane améliore la stabilité des complexes.

Détermination du rapport de charge optimal. Dans un premier temps, l'objectif était de déterminer le rapport de charge optimal entre les copolysaccharides et l'ADN de thymus de veau. Pour ce faire, des complexes à base de Chit₅₀-*b*-Dext₄₁ ont été formés à des rapports de charge $R_{+/-}$ de 2,5, 5 et 10. Leur stabilité après dilution dans un tampon MOPS/NaCl à 154 mM et pH 7,4 a ensuite été suivie sur plusieurs jours par DLS (Figure 27 et Tableau 4).



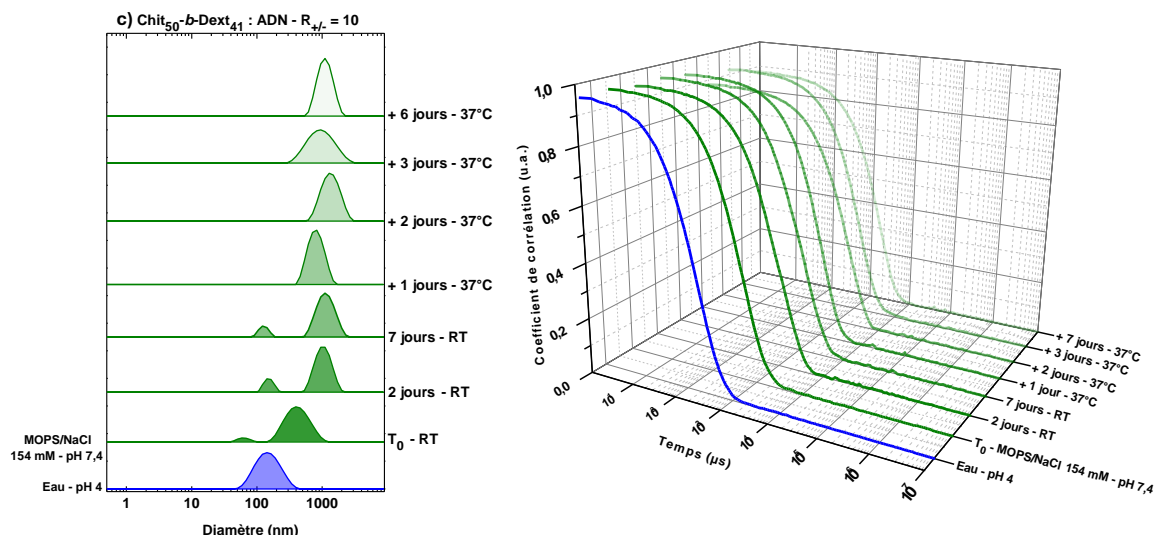


Figure 27. (gauche) Distributions de tailles et (droite) corrélogrammes des complexes $\text{Chit}_{50}\text{-}b\text{-Dext}_{41}$: ADN obtenus à différents rapports $R_{+/-}$. a) $R_{+/-} = 2,5$, b) $R_{+/-} = 5$ et c) $R_{+/-} = 10$.

Tableau 4. Suivi DLS de l'évolution des complexes $\text{Chit}_{50}\text{-}b\text{-Dext}_{41}$: ADN à différents $R_{+/-}$ en tampon MOPS/NaCl à 154 mM et pH 7,4.

$R_{+/-}$	Conditions	pH	DCR (kcps)	Diamètre (nm)	PDI
2,5	T_0 - RT	4,0	22 000	140	0,26
	T_0 - RT	7,4	6 000	135	0,18
	2 jours - RT	7,4	3 100	1 800	1,0
5	T_0 - RT	4,0	22 200	145	0,26
	T_0 - RT	7,4	13 700	255	0,19
	2 jours - RT	7,4	15 500	550	0,25
	7 jours - RT	7,4	15 200	595	0,24
	7 jours - RT + 1 jour - 37°C	7,4	18 400	900	0,17
	7 jours - RT + 2 jours - 37°C	7,4	18 800	1 000	0,14
	7 jours - RT + 3 jours - 37°C	7,4	19 100	1 050	0,10
	7 jours - RT + 6 jours - 37°C	7,4	17 600	1 090	0,11
10	T_0 - RT	4,0	15 700	130	0,25
	T_0 - RT	7,4	16 100	330	0,30
	2 jours - RT	7,4	17 800	620	0,40
	7 jours - RT	7,4	17 300	690	0,45
	7 jours - RT + 1 jour - 37°C	7,4	19 500	680	0,20
	7 jours - RT + 2 jours - 37°C	7,4	24 600	1020	0,31
	7 jours - RT + 3 jours - 37°C	7,4	20 500	800	0,24
	7 jours - RT + 6 jours - 37°C	7,4	22 500	970	0,17

Dans un premier temps, l'analyse se concentre sur les caractéristiques des complexes à pH 4. À titre de rappel, les complexes obtenus avec du chitosane de DP 252 et de DA 4% à pH 4 présentaient un diamètre hydrodynamique de 110 nm, associé à un PDI de 0,24 (Figure 3). Les complexes formés à partir des copolysaccharides sont moins bien définis que ceux obtenus avec le chitosane seul comme en témoignent les asymétries observées sur les distributions de tailles (Figure 27). Concernant les diamètres des

complexes à pH 4, ceux formés à partir des copolysaccharides présentent des dimensions légèrement supérieures à celles des complexes obtenus avec le chitosane de DA 4% (Tableau 4). Ce résultat est étonnant, car, contrairement aux complexes polyélectrolytes (PEC) formés entre le chitosane et l'ADN, les copolysaccharides et l'ADN sont supposés former des micelles de complexes polyioniques (PIC) avec le dextrane jouant le rôle de couronne hydrophile stabilisante. Les micelles PIC sont connues pour générer des structures plus organisées que les PECs, notamment grâce à un cœur dense formé par les interactions électrostatiques, avec des diamètres typiquement compris entre 50 et 100 nm [66]. Les PECs présentent des diamètres plus larges, généralement compris dans une plage de 100 à 500 nm. Les complexes obtenus avec les copolysaccharides présentent davantage les caractéristiques des PECs que celles des micelles PIC, malgré la présence du dextrane. Cela peut s'expliquer par la taille du bloc polycationique, ici le chitosane, qui est insuffisante. Avec une masse molaire inférieure à 10 000 g/mol, le chitosane ne parvient pas à complexer fortement les molécules d'ADN de thymus de veau, dont la masse molaire dépasse les 10 000 000 g/mol [35]. Dans ces conditions, la formation de PECs est favorisée par rapport à celle de PICs. L'obtention de micelles PIC serait néanmoins possible en utilisant des acides nucléiques plus petits comme les siRNA ou plus flexibles comme l'ARN messager (ARNm), permettant ainsi une meilleure correspondance entre la taille des blocs polyélectrolytes et favorisant l'organisation en structures micellaires.

Concernant les différents rapports de charge testés, il est évident que le rapport $R_{+/-} = 2,5$ est insuffisant, les complexes se déstabilisant dès 2 jours à température ambiante en tampon MOPS/NaCl à 154 mM et pH 7,4 (Figure 27.a). Pour les rapports $R_{+/-} = 5$ et $R_{+/-} = 10$, l'évolution des complexes a été suivie jusqu'à 7 jours à température ambiante, puis pendant 6 jours supplémentaires à 37°C. À ces rapports, les complexes copolysaccharides/ADN montrent une première augmentation de taille après dilution dans le tampon MOPS, suivie d'une nouvelle hausse après passage à 37°C, accompagnée d'une augmentation du PDI. Ces effets sont particulièrement prononcés à un $R_{+/-}$ de 10, où l'augmentation du PDI est encore plus marquée (Tableau 4). La taille des complexes semble se stabiliser avec le temps suggérant un phénomène d'agrégation limitée. Finalement, les complexes obtenus à partir de Chit₅₀-b-Dext₄₁ semblent plus stables et mieux définis à un rapport $R_{+/-}$ de 5. Afin de statuer quant au rapport de charge optimal pour la formation de complexes entre les copolysaccharides et l'ADN, des expériences similaires ont été réalisées en utilisant le Chit₅₀-b-Dext₈₆, en faisant varier le rapport de charge de 2,5 à 10 (Figure 28 et Tableau 5).

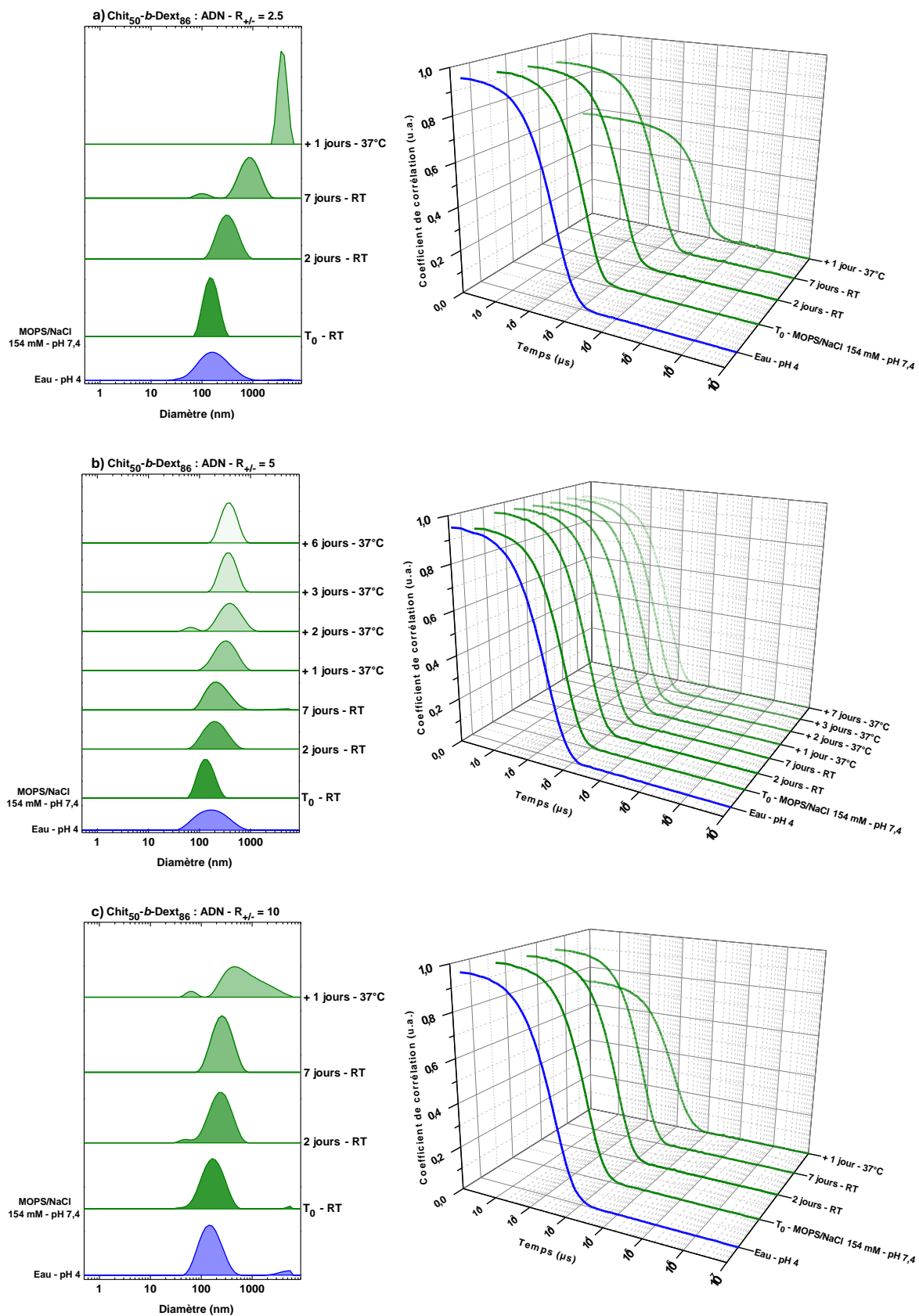


Figure 28. (gauche) Distributions de tailles et (droite) corrélogrammes des complexes Chit₅₀-b-Dext₈₆ : ADN obtenus à différents rapports R_{+/-}. a) R_{+/-} = 2,5, b) R_{+/-} = 5 et c) R_{+/-} = 10.

Tableau 5. Suivi DLS de l'évolution des complexes Chit₅₀-*b*-Dext₈₆ : ADN à différents R_{+/-} en tampon MOPS/NaCl à 154 mM et pH 7,4.

R _{+/-}	Conditions	pH	DCR (keps)	Diamètre (nm)	PDI
2,5	T ₀ - RT	4,0	18 900	145	0,27
	T ₀ - RT	7,4	4 700	140	0,19
	2 jours - RT	7,4	7 300	275	0,24
	7 jours - RT	7,4	7 200	650	0,30
	7 jours - RT + 1 jour - 37°C	7,4	17 500	3 500	0,15
5	T ₀ - RT	4,0	15 400	140	0,26
	T ₀ - RT	7,4	7 700	130	0,15
	2 jours - RT	7,4	12 500	180	0,18
	7 jours - RT	7,4	14 200	210	0,18
	7 jours - RT + 1 jour - 37°C	7,4	15 500	280	0,23
	7 jours - RT + 2 jours - 37°C	7,4	16 500	295	0,25
	7 jours - RT + 3 jours - 37°C	7,4	16 800	305	0,22
7 jours - RT + 6 jours - 37°C	7,4	16 700	305	0,24	
10	T ₀ - RT	4,0	15 000	140	0,26
	T ₀ - RT	7,4	13 700	155	0,22
	2 jours - RT	7,4	20 100	200	0,19
	7 jours - RT	7,4	22 000	225	0,19
	7 jours - RT + 1 jour - 37°C	7,4	45 000	425	0,50

Une fois encore, le rapport R_{+/-} = 2,5 s'avère insuffisant pour stabiliser les complexes (Figure 28). A R_{+/-} = 10 les complexes se déstabilisent après seulement une journée à 37°C (Figure 28.c). Le rapport de charge R_{+/-} = 5 semble donc être le plus approprié en termes de stabilité. Globalement, le comportement colloïdal des complexes avec le Chit₅₀-*b*-Dext₈₆ est similaire à celui observé avec le Chit₅₀-*b*-Dext₄₁, à savoir que les complexes les plus stables et les mieux définis sont obtenus à R_{+/-} = 5.

À R_{+/-} = 2,5, le rapport de charge n'est pas suffisant pour condenser efficacement l'ADN. En revanche, à R_{+/-} = 10, il y a une quantité importante de copolymères en excès. Il a été démontré précédemment que les copolymères Chit₅₀-*b*-Dext₄₁ et Chit₅₀-*b*-Dext₈₆ ont des pHs critiques de solubilité de 7,1 et 7,2 respectivement. Ainsi, à pH 7,4, ces copolymères se trouvent en limite de solubilité. Dans ces conditions, ils peuvent s'autoassembler en nanoparticules, qui semblent être mieux définies et plus stables lorsque le bloc de dextrane est plus long, comme en témoigne la formation de particules de plus petites tailles (Tableau 4 et Tableau 5). Le rapport de charge optimal est donc fixé à R_{+/-} = 5. Dans ces conditions, le copolymère est presque totalement engagé dans la complexation avec l'ADN. Finalement, il apparaît une nouvelle fois que les complexes résultant de l'association des copolysaccharides avec l'ADN de thymus de veau sont globalement moins bien définis que ceux obtenus à partir de chitosane pur. Cela s'explique principalement par une complexation moins efficace due à la plus faible taille du bloc de chitosane complexant [35].

Influence du dextrane sur la stabilité des complexes copolymères/chitosane. Pour mieux évaluer l'influence du bloc dextrane sur la stabilité des complexes formés, une comparaison a été

effectuée entre les complexes précédemment formés avec les deux copolysaccharides Chit₅₀-*b*-Dext₄₁ et Chit₅₀-*b*-Dext₈₆ à un rapport de charge $R_{+/-} = 5$, et ceux formés avec du Chit₅₀ de DA 4% (Figure 29).

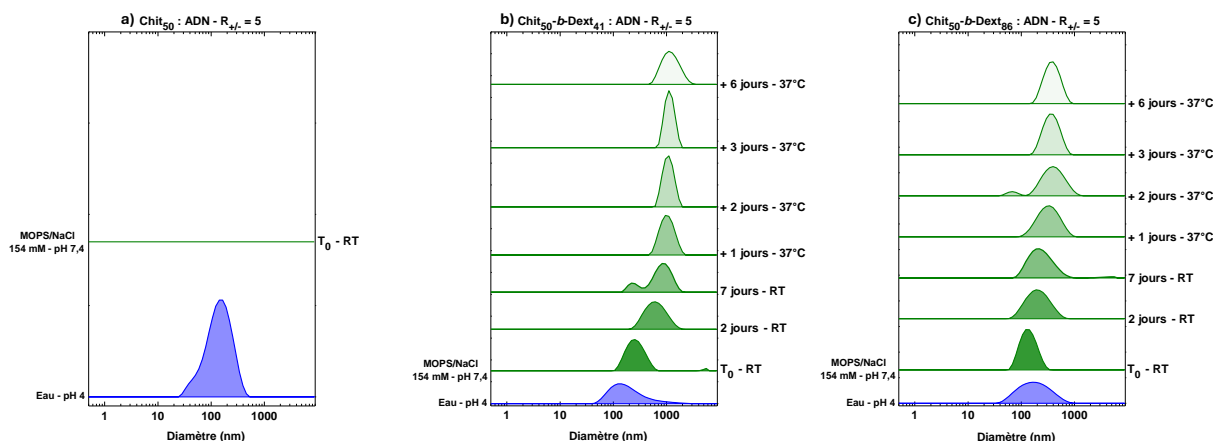


Figure 29. Distributions de tailles des complexes à $R_{+/-} = 5$ avec différentes longueurs du bloc dextrane (a) Chit₅₀, (b) Chit₅₀-*b*-Dext₄₁ et (c) Chit₅₀-*b*-Dext₈₆.

Les complexes formés avec du Chit₅₀ seul à un rapport $R_{+/-} = 5$ se révèlent totalement instables en tampon MOPS/NaCl à 154 mM et pH 7,4, entraînant une agrégation et une précipitation immédiates, observables visuellement (Figure 30).



Figure 30. Photographie des complexes Chit₅₀ : ADN à $R_{+/-} = 5$ après dilution en tampon MOPS/NaCl à 154 mM et pH 7,4.

En revanche, le greffage d'un bloc de dextrane à l'extrémité du chitosane engendre une stabilisation significative des complexes à température ambiante comme à 37°C. La présence d'un bloc de dextrane à l'extrémité du chitosane permet de passer de complexes initialement instables, qui précipitent immédiatement après dilution en tampon, à des complexes stables pendant plus de 7 jours à température ambiante, suivis de 6 jours à 37°C. Par ailleurs, les complexes formés avec le Chit₅₀-*b*-Dext₈₆, dont le bloc de dextrane est deux fois plus long, sont plus stables que ceux issus du Chit₅₀-*b*-Dext₄₁. Ces résultats soulignent l'efficacité du greffage de dextrane pour améliorer la stabilité des complexes et suggèrent que l'allongement de la chaîne de dextrane est une stratégie efficace pour augmenter cette stabilité sur le long terme.

De manière similaire à l'effet observé avec les ions zinc, le greffage d'un bloc de dextrane à l'extrémité réductrice du chitosane permet de stabiliser les complexes à base de chitosane, tout en préservant ses propriétés de complexation et sans le dénaturer. Ce greffage contribue à limiter l'agrégation et à maintenir une certaine stabilité des complexes dans le temps. Cependant, bien que cette approche soit

efficace, il faut admettre que les complexes stabilisés par les ions zinc présentent une meilleure stabilité que ceux formés avec les copolysaccharides chitosane-*b*-dextrane. En effet, les complexes stabilisés par le zinc présentent des diamètres de particules remarquablement constants au cours du temps, traduisant une meilleure homogénéité et une moindre tendance à l'agrégation ou à la modification de taille. Cette stabilité accrue des complexes à base de zinc pourrait s'expliquer par des interactions plus fortes ou un meilleur contrôle des structures formées.

Ajout d'ions zinc dans les complexes copolymères/ADN. L'influence combinée des ions zinc et du dextrane a été étudiée en incorporant des ions zinc dans les formulations de complexes à base de copolysaccharides chitosane-*b*-dextrane (Figure 31). Pour cette évaluation, un rapport Zn:P de 5 a été utilisé, similaire à celui employé pour les complexes chitosane/ADN. Cette association pourrait constituer une approche complémentaire pour renforcer la stabilité des complexes, en tirant parti des propriétés bénéfiques du zinc et du dextrane.

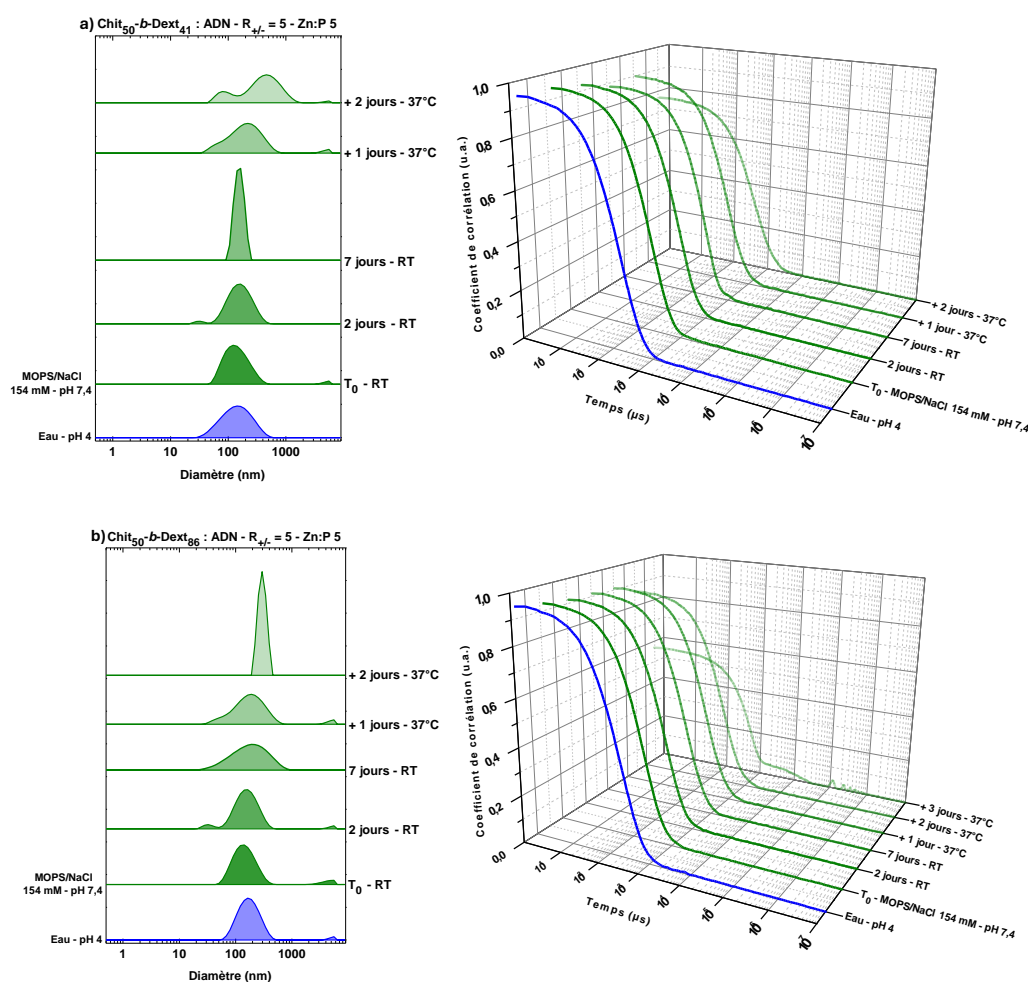


Figure 31. Distributions de tailles et corrélogrammes des complexes a) Chit₅₀-*b*-Dext₄₁ : ADN et b) Chit₅₀-*b*-Dext₈₆ : ADN à R_{+/-} = 5 et Zn:P 5.

L'effet des ions zinc a, dans un premier temps, été évalué sur les complexes préparés à partir de Chit₅₀ DA 4%, mais ceux-ci se sont révélés instables dès leur dilution en tampon (données non présentées). Ce résultat est en accord avec les observations précédentes faites sur le Chit₂₅₂ DA 4 % ; quelle que soit la masse molaire, le zinc ne parvient pas à stabiliser des complexes de très faible DA. L'ajout d'ions zinc

aux complexes formés à partir de copolymères Chit₅₀-*b*-dextrane, quelle que soit la longueur du bloc dextrane, n'a pas permis d'améliorer la stabilité des complexes en tampon. Au contraire, l'ajout de zinc semble empirer la situation puisque les complexes en présence de zinc sont complètement déstabilisés après 2 jours à 37°C (Figure 31) alors que sans zinc ces mêmes complexes sont stables plus de 6 jours à 37°C (Figure 29). Ce phénomène inattendu est particulièrement intrigant et demeure pour l'instant sans explication précise. Plusieurs hypothèses ont été envisagées : i) la déshydratation du dextrane par les ions zinc, bien que cette option soit peu probable compte tenu de leur faible concentration (1,5 mM) ou ii) le fait que le dextrane pourrait interférer avec les interactions entre le bloc chitosane, le zinc et l'ADN. Ce comportement, en contraste avec l'effet stabilisant du zinc observé sur les complexes chitosane/ADN, suggère que le rôle du dextrane dans ces systèmes est plus complexe que prévu.

4. CONCLUSION

Cette étude a permis d'identifier plusieurs paramètres clés pour améliorer la stabilité des complexes chitosane/ADN en conditions physiologiques, sans altérer les propriétés intrinsèques du chitosane. Premièrement, le degré d'acétylation du chitosane s'est révélé être un important levier pour l'optimisation de la stabilité des complexes. Les résultats ont montré que les complexes formés avec des chitosanes de DAs supérieurs à 30% restent stables en tampon MOPS à pH 7,4 plus de 10 jours à température ambiante alors que pour des DAs inférieurs à 30% les complexes sont immédiatement déstabilisés après dilution dans le même tampon. L'amélioration de la stabilité des complexes à base de chitosane de haut DA est directement liée au pH critique de solubilité du chitosane qui augmente avec le DA. Bien que l'augmentation du DA du chitosane permette de prolonger la stabilité des complexes pendant plus de 10 jours à température ambiante, elle ne permet pas de les stabiliser à 37°C. Les chitosanes de hauts DAs sont solubles à tout pH à température ambiante mais néanmoins leurs groupements amine sont fortement déprotonés à pH 7,4. Cela souligne la nécessité d'introduire une charge permanente au sein des complexes pour assurer leur stabilité à long terme dans des conditions physiologiques de pH et de température. Les cations divalents comme le zinc ont la capacité de former des complexes de coordination avec les amines du chitosane et les bases de l'ADN. L'incorporation d'ions zinc dans les formulations de complexes a considérablement renforcé leur stabilité en conditions physiologiques grâce aux liaisons de coordination. Avec des chitosanes présentant des DAs élevés, supérieurs à 40%, l'ajout de zinc a permis d'obtenir des complexes stables plus de 6 jours en conditions physiologiques de pH, de force ionique et de température. Ce procédé de stabilisation présente un avantage clé : il préserve les propriétés intrinsèques du chitosane, notamment sa biocompatibilité et sa faible toxicité. Ce travail a également mis en évidence la singularité du tampon PBS, qui s'est avéré particulièrement déstabilisant pour les complexes en raison de la présence des ions phosphate. Cependant, les complexes formés avec du chitosane de DA 48% en présence de zinc ont démontré une stabilité remarquable dans le PBS pendant plus de cinq jours à température ambiante. À notre connaissance, ces résultats sont une des rares démonstrations de stabilité de complexes à base de chitosane non modifié chimiquement dans un tampon PBS. Parallèlement, l'ajout d'un bloc de dextrane à l'extrémité du chitosane contribue également à améliorer la stabilité des complexes en conditions physiologiques. Avec un bloc de dextrane quatre fois plus long que celui du chitosane, les complexes sont stables en conditions physiologiques plus de 7 jours à température ambiante, suivis de 6 jours à 37

°C. La présence du bloc dextrane contribue à limiter l'agrégation et à maintenir une certaine stabilité des complexes dans le temps. Ces résultats mettent en lumière l'efficacité du greffage de dextrane à l'extrémité réductrice du chitosane pour renforcer la stabilité des complexes et suggèrent que l'allongement de la chaîne de dextrane est une stratégie efficace pour améliorer cette stabilité à long terme. Les ions zinc et le dextrane constituent deux leviers distincts permettant l'amélioration de la stabilité des complexes. Chacun de ces éléments agit de manière indépendante pour renforcer la structure des complexes : le zinc favorise la cohésion des complexes chitosane/ADN en formant des liaisons de coordination avec les amines du chitosane et les bases azotées de l'ADN, tandis que le dextrane, grâce à ses propriétés hydrophiles, améliore la solubilité du chitosane et la dispersion des complexes en milieu aqueux. Cependant, malgré leur potentiel stabilisant respectif, aucune synergie entre les deux n'a été observée. Cela souligne la complexité des interactions mises en jeu dans ces systèmes et donc la nécessité d'étudier plus en détail les interactions spécifiques entre le zinc, le chitosane et l'ADN.

REFERENCES

- [1] M. D. Buschmann, A. Merzouki, M. Lavertu, M. Thibault, M. Jean, et V. Darras, « Chitosans for delivery of nucleic acids », *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 65, n° 9, p. 1234-1270, août 2013, doi: 10.1016/j.addr.2013.07.005.
- [2] A. S. Kritchenkov, S. Andranovič, et Y. A. Skorik, « Chitosan and its derivatives: vectors in gene therapy », *Russ. Chem. Rev.*, vol. 86, n° 3, p. 231-239, mars 2017, doi: 10.1070/RCR4636.
- [3] H. Yin, R. L. Kanasty, A. A. Eltoukhy, A. J. Vegas, J. R. Dorkin, et D. G. Anderson, « Non-viral vectors for gene-based therapy », *Nat Rev Genet*, vol. 15, n° 8, p. 541-555, août 2014, doi: 10.1038/nrg3763.
- [4] P. Sorlier, A. Denuzière, C. Viton, et A. Domard, « Relation between the Degree of Acetylation and the Electrostatic Properties of Chitin and Chitosan », *Biomacromolecules*, vol. 2, n° 3, p. 765-772, sept. 2001, doi: 10.1021/bm015531+.
- [5] C. Schatz et T. Delas, « Fundamental and Practical Aspects in the Formulation of Colloidal Polyelectrolyte Complexes of Chitosan and siRNA », in *Design and Delivery of SiRNA Therapeutics*, vol. 2282, H. J. Ditzel, M. Tuttolomondo, et S. Kauppinen, Éd., in *Methods in Molecular Biology*, vol. 2282, New York, NY: Springer US, 2021, p. 297-327. doi: 10.1007/978-1-0716-1298-9_17.
- [6] H.-Q. Mao *et al.*, « Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency », *Journal of Controlled Release*, vol. 70, n° 3, p. 399-421, févr. 2001, doi: 10.1016/S0168-3659(00)00361-8.
- [7] J. Malmo, H. Sörgård, K. M. Vårum, et S. P. Strand, « siRNA delivery with chitosan nanoparticles: Molecular properties favoring efficient gene silencing », *Journal of Controlled Release*, vol. 158, n° 2, p. 261-268, mars 2012, doi: 10.1016/j.jconrel.2011.11.012.
- [8] F. C. MacLaughlin *et al.*, « Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery », *Journal of Controlled Release*, vol. 56, n° 1-3, p. 259-272, déc. 1998, doi: 10.1016/S0168-3659(98)00097-2.
- [9] S. Nimesh, M. M. Thibault, M. Lavertu, et M. D. Buschmann, « Enhanced Gene Delivery Mediated by Low Molecular Weight Chitosan/DNA Complexes: Effect of pH and Serum », *Mol Biotechnol*, vol. 46, n° 2, p. 182-196, oct. 2010, doi: 10.1007/s12033-010-9286-1.
- [10] A. Jintapattanakit, S. Mao, T. Kissel, et V. B. Junyaprasert, « Physicochemical properties and biocompatibility of N-trimethyl chitosan: Effect of quaternization and dimethylation », *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 70, n° 2, p. 563-571, oct. 2008, doi: 10.1016/j.ejpb.2008.06.002.
- [11] A. Guțoaia *et al.*, « Fine-tuned PEGylation of chitosan to maintain optimal siRNA-nanoplex bioactivity », *Carbohydrate Polymers*, vol. 143, p. 25-34, juin 2016, doi: 10.1016/j.carbpol.2016.01.010.
- [12] S. Y. Chae, S. Son, M. Lee, M.-K. Jang, et J.-W. Nah, « Deoxycholic acid-conjugated chitosan oligosaccharide nanoparticles for efficient gene carrier », *Journal of Controlled Release*, vol. 109, n° 1-3, p. 330-344, déc. 2005, doi: 10.1016/j.jconrel.2005.09.040.
- [13] W. G. Liu *et al.*, « N-Alkylated Chitosan as a Potential Nonviral Vector for Gene Transfection », *Bioconjugate Chem.*, vol. 14, n° 4, p. 782-789, juill. 2003, doi: 10.1021/bc020051g.
- [14] L. Han, C. Tang, et C. Yin, « Enhanced antitumor efficacies of multifunctional nanocomplexes through knocking down the barriers for siRNA delivery », *Biomaterials*, vol. 44, p. 111-121, mars 2015, doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.12.020.
- [15] Y. K. Park *et al.*, « Galactosylated chitosan-graft-dextran as hepatocyte-targeting DNA carrier », *Journal of Controlled Release*, vol. 69, n° 1, p. 97-108, oct. 2000, doi: 10.1016/S0168-3659(00)00298-4.
- [16] Y. Cao, Y. F. Tan, Y. S. Wong, M. W. J. Liew, et S. Venkatraman, « Recent Advances in Chitosan-Based Carriers for Gene Delivery », *Marine Drugs*, vol. 17, n° 6, p. 381, juin 2019, doi: 10.3390/md17060381.
- [17] S. Gao *et al.*, « Galactosylated low molecular weight chitosan as DNA carrier for hepatocyte-targeting », *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 255, n° 1-2, p. 57-68, avr. 2003, doi: 10.1016/S0378-5173(03)00082-6.
- [18] G.-W. Jeong *et al.*, « Anticancer effect of gene/peptide co-delivery system using transferrin-grafted LMWSC », *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 488, n° 1-2, p. 165-173, juill. 2015, doi: 10.1016/j.ijpharm.2015.04.057.
- [19] K. Wong *et al.*, « PEI-g-chitosan, a Novel Gene Delivery System with Transfection Efficiency Comparable to Polyethylenimine in Vitro and after Liver Administration in Vivo », *Bioconjugate Chem.*, vol. 17, n° 1, p. 152-158, janv. 2006, doi: 10.1021/bc0501597.

- [20] P. Garg *et al.*, « Triphenylamine coupled chitosan with high buffering capacity and low viscosity for enhanced transfection in mammalian cells, in vitro and in vivo », *J. Mater. Chem. B*, vol. 1, n° 44, p. 6053, 2013, doi: 10.1039/c3tb20939c.
- [21] T. H. Kim, J. E. Ihm, Y. J. Choi, J. W. Nah, et C. S. Cho, « Efficient gene delivery by urocanic acid-modified chitosan », *Journal of Controlled Release*, vol. 93, n° 3, p. 389-402, déc. 2003, doi: 10.1016/j.jconrel.2003.08.017.
- [22] A. Domard, M. Rinaudo, et C. Terrassin, « New method for the quaternization of chitosan », *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 8, n° 2, p. 105-107, avr. 1986, doi: 10.1016/0141-8130(86)90007-3.
- [23] X. Jiang, H. Dai, K. W. Leong, S. Goh, H. Mao, et Y. Yang, « Chitosan-g-PEG/DNA complexes deliver gene to the rat liver via intrabiliary and intraportal infusions », *The Journal of Gene Medicine*, vol. 8, n° 4, p. 477-487, avr. 2006, doi: 10.1002/jgm.868.
- [24] H. Fang, L. Lin, J. Chen, J. Wu, H. Tian, et X. Chen, « Zinc ion coordination significantly improved the transfection efficiency of low molecular weight polyethylenimine », *Biomater. Sci.*, vol. 7, n° 4, p. 1716-1728, 2019, doi: 10.1039/C9BM00039A.
- [25] S. Liu *et al.*, « Zinc Coordinated Cationic Polymers Break Up the Paradox between Low Molecular Weight and High Transfection Efficacy », *Biomacromolecules*, vol. 19, n° 11, p. 4270-4276, nov. 2018, doi: 10.1021/acs.biomac.8b01140.
- [26] W. Tiyaboonchai et N. Limpeanchob, « Formulation and characterization of amphotericin B–chitosan–dextran sulfate nanoparticles », *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 329, n° 1-2, p. 142-149, févr. 2007, doi: 10.1016/j.ijpharm.2006.08.013.
- [27] D. Wu et T. Delair, « Stabilization of chitosan/hyaluronan colloidal polyelectrolyte complexes in physiological conditions », *Carbohydrate Polymers*, vol. 119, p. 149-158, mars 2015, doi: 10.1016/j.carbpol.2014.11.042.
- [28] T. Delas, « Formulation et stabilisation de complexes colloïdaux de polyélectrolytes à base de chitosane et de siRNA », 2021. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.theses.fr/2021BORD0071/document>
- [29] J. P. Dworkin et S. L. Miller, « A kinetic estimate of the free aldehyde content of aldoses », *Carbohydrate Research*, vol. 329, n° 2, p. 359-365, nov. 2000, doi: 10.1016/S0008-6215(00)00204-4.
- [30] E. Courtecuisse, S. Bourasseau, B. E. Christensen, et C. Schatz, « Synthesis of linear chitosan-block-dextran copolysaccharides with dihydrazide and dioxyamine linkers », *Carbohydrate Polymers*, vol. 345, p. 122576, déc. 2024, doi: 10.1016/j.carbpol.2024.122576.
- [31] L. Vachoud, N. Zydowicz, et A. Domard, « Formation and characterisation of a physical chitin gel », *Carbohydrate Research*, vol. 302, n° 3-4, p. 169-177, août 1997, doi: 10.1016/S0008-6215(97)00126-2.
- [32] A. Hirai, H. Odani, et A. Nakajima, « Determination of degree of deacetylation of chitosan by ¹H NMR spectroscopy », p. 87-94, 1991.
- [33] P. Morandi, S. Bertholon, G. David, A. Lebrun, K. Parra, et C. Negrell, « Selective acylation of chitosan oligomers by several cyclic anhydrides as a ¹³C NMR quantification method », *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, vol. 7, p. 100498, juin 2024, doi: 10.1016/j.carpta.2024.100498.
- [34] E. Tsuchida et K. Abe, « Interactions Between Macromolecules in Solution and Intermacromolecular Complexes ».
- [35] T. Delas *et al.*, « Effects of Chain Length of Chitosan Oligosaccharides on Solution Properties and Complexation with siRNA », *Polymers*, vol. 11, n° 8, p. 1236, juill. 2019, doi: 10.3390/polym11081236.
- [36] J. E. Godfrey et H. Eisenberg, « The flexibility of low molecular weight double-stranded dna as a function of length », *Biophysical Chemistry*, vol. 5, n° 3, p. 301-318, sept. 1976, doi: 10.1016/0301-4622(76)80042-7.
- [37] A. N. Zelikin et V. A. Izumrudov, « Polyelectrolyte Complexes Formed by Calf Thymus DNA and Aliphatic Ioneners: Unexpected Change in Stability upon Variation of Chain Length of Ioneners of Different Charge Density », *Macromol. Biosci.*, vol. 2, n° 2, p. 78-81, févr. 2002, doi: 10.1002/1616-5195(20020201)2:2<78::AID-MABI78>3.0.CO;2-7.
- [38] G. Lamarque, J.-M. Lucas, C. Viton, et A. Domard, « Physicochemical Behavior of Homogeneous Series of Acetylated Chitosans in Aqueous Solution: Role of Various Structural Parameters », *Biomacromolecules*, vol. 6, n° 1, p. 131-142, janv. 2005, doi: 10.1021/bm0496357.
- [39] R. W. Wilson et V. A. Bloomfield, « Counterion-induced condensation of deoxyribonucleic acid. A light-scattering study », *Biochemistry*, vol. 18, n° 11, p. 2192-2196, mai 1979, doi: 10.1021/bi00578a009.

- [40] D. Matulis, I. Rouzina, et V. A. Bloomfield, « Thermodynamics of DNA binding and condensation: isothermal titration calorimetry and electrostatic mechanism 1 Edited by I. Tinoco », *Journal of Molecular Biology*, vol. 296, n° 4, p. 1053-1063, mars 2000, doi: 10.1006/jmbi.1999.3470.
- [41] M. Kalloniatis et C. Luu, *Visual Acuity*, Kolb H., Fernandez E., Nelson R. in *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*. University of Utah Health Sciences Center, 1995.
- [42] A. S. Michaels, L. Mir, et N. S. Schneider, « A Conductometric Study of Polycation–Polyanion Reactions in Dilute Aqueous Solution », *J. Phys. Chem.*, vol. 69, n° 5, p. 1447-1455, mai 1965, doi: 10.1021/j100889a003.
- [43] M. Sedláč, « What Can Be Seen by Static and Dynamic Light Scattering in Polyelectrolyte Solutions and Mixtures? », *Langmuir*, vol. 15, n° 12, p. 4045-4051, juin 1999, doi: 10.1021/la981189j.
- [44] A. Drogoz, L. David, C. Rochas, A. Domard, et T. Delair, « Polyelectrolyte Complexes from Polysaccharides: Formation and Stoichiometry Monitoring », *Langmuir*, vol. 23, n° 22, p. 10950-10958, oct. 2007, doi: 10.1021/la7008545.
- [45] B. D. Gummow et G. A. F. Roberts, « Studies on chitosan-induced metachromasy, 2. The reversal of metachromasy by co-solutes », *Makromol. Chem.*, vol. 186, n° 6, p. 1245-1253, juin 1985, doi: 10.1002/macp.1985.021860613.
- [46] K. Bowman et K. W. Leong, « Chitosan nanoparticles for oral drug and gene delivery », *Int J Nanomedicine*, vol. 1, n° 2, p. 117-128, juin 2006.
- [47] M. Thibault *et al.*, « Excess polycation mediates efficient chitosan-based gene transfer by promoting lysosomal release of the polyplexes », *Biomaterials*, vol. 32, n° 20, p. 4639-4646, juill. 2011, doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.03.010.
- [48] C.-Q. Xiao, Q. Huang, Y. Zhang, H.-Q. Zhang, et L. Lai, « Binding thermodynamics of divalent metal ions to several biological buffers », *Thermochimica Acta*, vol. 691, p. 178721, sept. 2020, doi: 10.1016/j.tca.2020.178721.
- [49] K. M. Vårum, M. H. Ottøy, et O. Smidsrød, « Water-solubility of partially N-acetylated chitosans as a function of pH: effect of chemical composition and depolymerisation », *Carbohydrate Polymers*, vol. 25, n° 2, p. 65-70, janv. 1994, doi: 10.1016/0144-8617(94)90140-6.
- [50] H. Bao, L. Li, W. C. Leong, et L. H. Gan, « Thermo-Responsive Association of Chitosan- graft -Poly(*N*-isopropylacrylamide) in Aqueous Solutions », *J. Phys. Chem. B*, vol. 114, n° 32, p. 10666-10673, août 2010, doi: 10.1021/jp105041z.
- [51] M. Rhazi, J. Desbrières, A. Tolaimate, M. Rinaudo, P. Vottero, et A. Alagui, « Contribution to the study of the complexation of copper by chitosan and oligomers », *Polymer*, vol. 43, n° 4, p. 1267-1276, févr. 2002, doi: 10.1016/S0032-3861(01)00685-1.
- [52] M. Rhazi, J. Desbri, A. Alagui, et M. E. Meray, « Influence of the nature of the metal ions on the complexation with chitosan. Application to the treatment of liquid waste », *European Polymer Journal*, 2002.
- [53] R. B. Hernández *et al.*, « Coordination study of chitosan and Fe³⁺ », *Journal of Molecular Structure*, vol. 877, n° 1-3, p. 89-99, avr. 2008, doi: 10.1016/j.molstruc.2007.07.024.
- [54] A. Domard, « pH and c.d. measurements on a fully deacetylated chitosan: application to Cu^{II}–polymer interactions », *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 9, n° 2, p. 98-104, avr. 1987, doi: 10.1016/0141-8130(87)90033-X.
- [55] G. L. Eichhorn et Y. A. Shin, « Interaction of metal ions with polynucleotides and related compounds. XII. The relative effect of various metal ions on DNA helicity », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 90, n° 26, p. 7323-7328, déc. 1968, doi: 10.1021/ja01028a024.
- [56] J. S. Lee, L. J. P. Latimer, et R. S. Reid, « A cooperative conformational change in duplex DNA induced by Zn²⁺ and other divalent metal ions », *Biochem. Cell Biol.*, vol. 71, n° 3-4, p. 162-168, mars 1993, doi: 10.1139/093-026.
- [57] G. L. Eichhorn, « Metal Ions as Stabilizers or Destabilizers of the Deoxyribonucleic Acid Structure », *Nature*, vol. 194, n° 4827, p. 474-475, mai 1962, doi: 10.1038/194474a0.
- [58] V. G. Kanellis et C. G. Dos Remedios, « A review of heavy metal cation binding to deoxyribonucleic acids for the creation of chemical sensors », *Biophys Rev*, vol. 10, n° 5, p. 1401-1414, oct. 2018, doi: 10.1007/s12551-018-0455-y.
- [59] J. Duguid, V. A. Bloomfield, J. Benevides, et G. J. Thomas, « Raman spectroscopy of DNA-metal complexes. I. Interactions and conformational effects of the divalent cations: Mg, Ca, Sr, Ba, Mn, Co, Ni, Cu, Pd, and Cd », *Biophysical Journal*, vol. 65, n° 5, p. 1916-1928, nov. 1993, doi: 10.1016/S0006-3495(93)81263-3.
- [60] V. A. Sorokin, V. A. Valeev, E. L. Usenko, Ya. P. Rakovsky, et V. V. Andrushchenko, « Specific features of Zn²⁺, Co²⁺ and Ni²⁺ ion binding to DNA in alkaline solutions », *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 55, p. 137-141, avr. 2013, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2013.01.001.

- [61] P. Aich *et al.*, « M-DNA: a complex between divalent metal ions and DNA which behaves as a molecular wire », *Journal of Molecular Biology*, vol. 294, n° 2, p. 477-485, nov. 1999, doi: 10.1006/jmbi.1999.3234.
- [62] M. P. Cervantes-Cervantes, J. V. Calderón-Salinas, A. Albores, et J. L. Muñoz-Sánchez, « Copper Increases the Damage to DNA and Proteins Caused by Reactive Oxygen Species », *BTER*, vol. 103, n° 3, p. 229-248, 2005, doi: 10.1385/BTER:103:3:229.
- [63] D. Wu *et al.*, « Zinc-Stabilized Chitosan-Chondroitin Sulfate Nanocomplexes for HIV-1 Infection Inhibition Application », *Mol. Pharmaceutics*, vol. 13, n° 9, p. 3279-3291, sept. 2016, doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.6b00568.
- [64] K. Serec, S. D. Babić, R. Podgornik, et S. Tomić, « Effect of magnesium ions on the structure of DNA thin films: an infrared spectroscopy study », *Nucleic Acids Res*, vol. 44, n° 17, p. 8456-8464, sept. 2016, doi: 10.1093/nar/gkw696.
- [65] A. Krężel et W. Maret, « The biological inorganic chemistry of zinc ions », *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 611, p. 3-19, déc. 2016, doi: 10.1016/j.abb.2016.04.010.
- [66] S. Katayose et K. Kataoka, « Water-Soluble Polyion Complex Associates of DNA and Poly(ethylene glycol)-Poly(L-lysine) Block Copolymer », *Bioconjugate Chem.*, vol. 8, n° 5, p. 702-707, sept. 1997, doi: 10.1021/bc9701306.

Chapitre 4 : Evaluation biologique des complexes chitosane/ADN *in vitro*

1. INTRODUCTION

Les complexes formés entre le chitosane et les acides nucléiques suscitent un intérêt croissant dans le domaine biomédical, en tant que systèmes non viraux prometteurs pour la délivrance de gènes. Le chitosane présente des caractéristiques avantageuses, telles que sa biocompatibilité et sa biodégradabilité, qui permettent une interaction favorable avec les tissus biologiques [1],[2],[3]. En milieu acide, la protonation de ses amines primaires permet la formation de complexes stables avec les acides nucléiques, encapsulant et protégeant ces derniers contre la dégradation par les nucléases tout en facilitant leur internalisation dans les cellules [4]. Cependant, pour permettre l'expression des gènes transportés, ces complexes doivent surmonter plusieurs barrières, notamment l'internalisation cellulaire, l'échappement des compartiments endo-lysosomaux, et la dissociation des complexes. L'internalisation des polyplexes se fait principalement par endocytose non spécifique, un processus qui dépend majoritairement des caractéristiques de surface des complexes, notamment leur densité de charge [5]. Étant donné que les membranes cellulaires sont chargées négativement, l'internalisation repose sur des interactions électrostatiques entre les complexes et ces membranes. Toutefois, à pH physiologique, le faible taux de protonation du chitosane réduit la densité de charge des complexes, limitant leurs interactions avec les membranes et diminuant l'efficacité de l'internalisation [6]. La faible densité de charge du chitosane à pH physiologique entraîne également son insolubilité ce qui conduit à la déstabilisation des complexes dans de telles conditions [7],[8],[9]. Ainsi, la formulation des polyplexes est généralement effectuée en milieu acide afin d'optimiser la complexation avec les acides nucléiques et d'assurer une stabilité colloïdale avant leur introduction dans des milieux de culture, dont le pH et la force ionique sont proches des conditions physiologiques [10]. Une fois internalisés, les complexes doivent s'échapper des endosomes avant leur fusion avec les lysosomes pour éviter la dégradation des acides nucléiques qu'ils transportent. Contrairement à la polyéthylèneimine (PEI), le chitosane ne possède *a priori* pas un grand pouvoir tampon entre pH 4,5 et 5,5, ce qui rend moins probable un échappement endosomal par le mécanisme d'éponge à protons [11]. Cependant, d'autres mécanismes sont envisagés, notamment la dégradation enzymatique du chitosane, qui pourrait provoquer une augmentation de l'osmolarité dans les endosomes, entraînant ainsi un afflux d'eau, le gonflement des endosomes et la rupture de leurs membranes [12]. La dernière étape critique pour la délivrance de gènes est la dissociation des complexes, qui permet la libération des acides nucléiques. Cette dissociation est étroitement liée à la stabilité des polyplexes. Des complexes trop stables empêcheraient la libération efficace des acides nucléiques, d'où l'importance de moduler la masse molaire et le degré d'acétylation (DA) du chitosane afin de contrôler la stabilité des polyplexes [13]. Le mécanisme précis à l'origine de la dissociation des complexes n'est pas complètement élucidé. Cependant, il a été suggéré qu'une compétition avec les polyanions présents dans le cytoplasme pourrait contribuer à la libération des acides nucléiques. Ces polyanions formeraient des complexes plus stables avec le chitosane que l'ADN, ce qui favoriserait ainsi le relargage de ce dernier [14],[15]. Le rapport de charge, représenté par le rapport entre les groupes amine chargés du chitosane et les phosphates de l'ADN, est également un facteur clé à prendre en considération. Une augmentation de ce rapport renforce la stabilité des complexes en améliorant l'interaction électrostatique entre le chitosane et les acides nucléiques [6]. De surcroît, un excès de chitosane libre semble jouer un rôle protecteur en préservant les complexes des

enzymes lysosomales [16]. Ainsi, les polyplexes à base de chitosane sont généralement formulés avec des rapports N:P compris entre 3 et 10, voire plus, pour maximiser l'efficacité de transfection [8],[12]. La stabilité des polyplexes est donc un levier important pour améliorer l'efficacité de transfection. Un compromis doit être trouvé entre la protection de l'acide nucléique véhiculé, l'efficacité d'internalisation et la libération intracellulaire. Nimesh *et coll.* ont démontré une forte corrélation entre l'internalisation et l'efficacité de transfection en fonction du pH [17]. Les taux de transfection diminuent lorsque le pH augmente, mais ils restent relativement élevés même à pH 7,1, malgré une internalisation plus faible des complexes. Cela suggère qu'à pH physiologique, bien que moins de complexes soient internalisés, ceux qui le sont présentent une meilleure capacité de dissociation [17]. Malgré ces défis, les systèmes chitosane/ADN présentent un fort potentiel, dont l'efficacité de transfection à pH physiologique pourrait être améliorée en renforçant la stabilité des complexes dans ces conditions.

L'objectif de ce chapitre est d'évaluer l'efficacité de transfection des systèmes chitosane/ADN présentés dans le chapitre précédent. Dans un premier temps, les systèmes les plus stables, notamment ceux formés avec des chitosanes de DAs supérieurs à 40 % associés aux ions zinc, ainsi que ceux à base de chitosane-*b*-dextrane seront étudiés. En lien avec les résultats obtenus, des ajustements supplémentaires ont été apportés aux formulations pour optimiser les taux de transfection. Parallèlement, l'internalisation et le devenir intracellulaire des complexes ont été suivis par microscopie confocale de fluorescence, afin de mieux comprendre leur comportement dans un environnement biologique. L'efficacité de transfection des systèmes chitosane/ADN varie considérablement en fonction des types cellulaires utilisés, les meilleures performances étant généralement observées en présence de cellules HEK 293 et IB-3-1, par rapport à des lignées telles que 9HTEo ou HeLa [7]. Les tests effectués dans cette étude ont été réalisés avec des cellules HEK 293 en suspension, un modèle cellulaire bien établi pour la transfection. Le plasmide utilisé code pour la protéine fluorescente eGFP, permettant une quantification rapide et précise des taux de transfection.

2. SECTION EXPERIMENTALE

2.1. Matériels

Le plasmide pEGFP-C1 (4 700 pb - Annexe 1) a été amplifié dans une culture d'*E. coli* JM109 sous pression de sélection de la kanamycine et a été purifié en utilisant le kit NucleoBond Xtra Maxi EF de Macherey Nagel selon les instructions du fabricant. Le plasmide pEGFP-C1 purifié a été dissous dans de l'eau stérile déionisée, et sa pureté ainsi que sa concentration ont été déterminées par spectrophotométrie UV (Nanodrop 1000, ThermoFisher Scientific). Les chitosanes et copolysaccharides utilisés sont ceux précédemment synthétisés à partir du chitosane (41 kg/mol, degré d'acétylation (DA) de 4%) obtenu auprès de Stellar Biosol (Gujarat, Inde, lot de chitosane 144/090605). La polyéthylèneimine (PEI) linéaire de 25 kg/mol provient de chez Polysciences (réf. 23966, lot 661897). Les cellules de mammifères HEK 293 (FreeStyle 293-F, réf. R79007), le milieu d'expression (FreeStyle 293, réf. 12338018), la Rhodamine-NHS (réf. 46406) et les filaments d'actine avec la Phalloïdine couplée au fluorophore Alexa Fluor 488 (réf. R37110) ont été achetés chez ThermoFisher Scientific. Le Hoechst 33342 (réf. 14533) a été acheté chez Sigma-Aldrich. Le kit de marquage du plasmide Label IT Cy 5 (réf.

MIR 3725) a été fourni par Mirus Bio. Tous les autres produits chimiques ont été obtenus à partir de sources commerciales et sont de qualité analytique.

2.2. Préparation des complexes

En l'absence de zinc, les complexes de chitosane (ou chitosane-*b*-dextrane) avec le plasmide purifié ont été formés en ajoutant 40 μL de plasmide à une concentration de 0,3 g/L dans 80 μL de solution de chitosane (concentration finale en plasmide de 0,1 g/L, volume final de complexes de 120 μL). Le chitosane a été préalablement solubilisé à 2 g/L (et à 10 g/L pour le chitosane-*b*-dextrane) dans de l'eau avec une quantité stœchiométrique de HCl pour assurer la protonation complète des résidus de glucosamine. Le pH de la solution de chitosane (ou chitosane-*b*-dextrane) a été vérifié et ajusté à 4 et la concentration ajustée en fonction du rapport de charge ($R_{+/-}$) ciblé. Les complexes étant formés à des rapports $R_{+/-} > 1$, la solution de plasmide a été ajoutée rapidement à la solution de chitosane (ou chitosane-*b*-dextrane) à l'aide d'une micropipette. Les solutions de chitosane et de plasmide ont systématiquement été filtrées sur des membranes en acétate de cellulose de 0,22 μm de porosité. Les formulations ont été réalisées dans des microtubes plastiques de 2 mL, placés dans un ThermoMixer Comfort Eppendorf réglé à 1200 rpm et 25°C.

La formation des complexes en présence de zinc a été réalisée dans des conditions similaires. Le nitrate de zinc hexahydraté a été dissous dans de l'eau milli-Q à une concentration de 5 g/L, et la concentration finale a été ajustée en fonction du rapport Zn:P (zinc:phosphate) souhaité. La solution de zinc a également été filtrée sur des membranes en acétate de cellulose de 0,22 μm de porosité. Pour un rapport Zn:P donné, la moitié du volume nécessaire de zinc a été ajoutée à la solution de chitosane, et l'autre moitié à la solution de plasmide, avant de mélanger les deux solutions. Le volume final du mélange a de nouveau été fixé à 120 μL .

2.3. Electrophorèse sur gel

Des gels d'agarose à 1,2 % massique ont été préparés et soumis à une électrophorèse de 60 V pendant 1h30 en tampon Tris-HCl (40 mM, pH 8,4). Le tampon a été préparé sans EDTA pour éviter la chélation du zinc présent dans les complexes. Les complexes préparés à pH 4 ont été centrifugés pendant 30 minutes à 18 000 x g et 20°C et les surnageants analysés par électrophorèse sur gel. Un volume de 18 μL de surnageant a été mélangé à 2 μL de tampon de chargement sans EDTA (0,2 % de bleu de bromophénol et 50 % de glycérol). Ensuite, 10 μL de ce mélange ont été déposés dans les puits. Le colorant SybrSafe a été ajouté lors de la préparation du gel pour révéler la présence de l'ADN après migration.

2.4. Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

La DLS a été utilisée pour évaluer la stabilité des complexes de chitosane et de plasmide. Les complexes ont été dilués au cinquième dans un tampon MOPS/NaCl à 154mM et pH 7,4 et incubés dans un ThermoMixer Comfort Eppendorf, réglé à 1200 rpm, à 25°C ou 37°C selon les besoins. Les complexes ont été analysés par diffusion dynamique de la lumière à 25°C à l'aide d'un ZetaSizer Nano ZS (Malvern Panalytical Ltd, Malvern, UK) équipé d'un laser ayant une longueur d'onde $\lambda = 632,8 \text{ nm}$ et d'une détection à un angle de 173°. Les analyses ont été effectuées sur 100 μL de solution dans des cuvettes en plastique de taille ultra-micro. Trois mesures ont été effectuées pour chaque échantillon. Les diamètres

hydrodynamiques moyens (Z -avg) et les indices de polydispersité (PDI) ont été déterminés en utilisant la méthode des cumulants. Le diamètre hydrodynamique moyen est calculé à partir du premier cumulant (a_1) et le PDI à partir du second (a_2), selon la formule $PDI = \frac{a_2}{a_1^2}$. Les distributions de tailles moyennées en intensité sont obtenues par analyse NNLS (non-negative least squares).

2.5. Transfection des cellules HEK 293

Les cellules HEK 293 en suspension ont été cultivées dans un milieu sans sérum dans des erlenmeyers à baffles de 250 mL placés dans un incubateur à 37°C, 120 rpm et 8% de CO₂. Les cellules ont été passées tous les 2 à 3 jours dans un milieu sans sérum. La concentration et la viabilité cellulaire ont été suivies à l'aide d'un compteur de cellules automatique et analyseur de viabilité Norma XS (Iprasense) sur des lames de comptage cellulaire composées de 4 chambres de 100 µm. La veille de l'ajout des complexes, les cellules ont été passées à une concentration de 1 million de cellules par millilitre (Mc/mL). Le jour de la transfection, la viabilité cellulaire était supérieure à 90 %. Les tests de transfection ont été effectués dans des plaques de culture cellulaire de 24 puits de 1 mL de volume. 450 µL de cellules en suspension ont été prélevés et ajoutés dans chaque puits. Six réplicats ont été effectués par condition. Les complexes chitosane/plasmide à une concentration de 0,1 g/L en plasmide ont été dilués dans une solution saline de NaCl à 154 mM à un rapport volumique de 1:10. Après 15 minutes d'incubation à température ambiante, 50 µL de la suspension de complexes sont déposés sur les cellules. La concentration finale en plasmide est de 1 µg/mL dans les puits. Les plaques de culture sont ensuite incubées pendant 48 heures à 37°C, 120 rpm et 8% de CO₂. Au terme de cette période, les cellules sont remises en suspension par pipettage, puis un prélèvement de 50 µL est effectué. La concentration et la viabilité des cellules sont mesurées à l'aide du compteur automatique Norma XS, et l'efficacité de transfection est ensuite évaluée par cytométrie de flux.

Pour chaque série de tests, des contrôles positifs et négatifs ont été mis en place. Le contrôle négatif consiste à remplacer le volume de complexes par un volume équivalent de PBS, tandis que le contrôle positif utilise la PEI, un agent de transfection commercial. La PEI et le plasmide sont mélangés dans un rapport massique de 3:1 dans du PBS, avec une concentration finale en plasmide de 0,01 mg/mL. Après 15 minutes d'incubation à température ambiante, 50 µL de complexes PEI/plasmide sont déposés sur les cellules dans les conditions décrites précédemment avec les complexes chitosane/plasmide.

2.6. Analyse par cytométrie de flux

Les suspensions cellulaires ont été injectées dans un cytomètre (Accury C6, BD Biosciences) pour l'analyse de la distribution cellulaire, de la viabilité et de la fluorescence. L'eGFP a été excitée avec un laser à 488 nm et la fluorescence a été enregistrée sur le canal FL1 (533/30 nm). La fluorescence des cellules a été analysée comme suit. Un premier écran de FSC-A en fonction du temps a été tracé afin de détecter toute dysfonction ou hétérogénéité pendant l'injection. Ensuite, les événements FSC-H ont été tracés en fonction de FSC-A afin de détecter et d'éliminer les doublets ou les agrégats cellulaires. Les événements ont ensuite été filtrés comme illustré Figure 1.

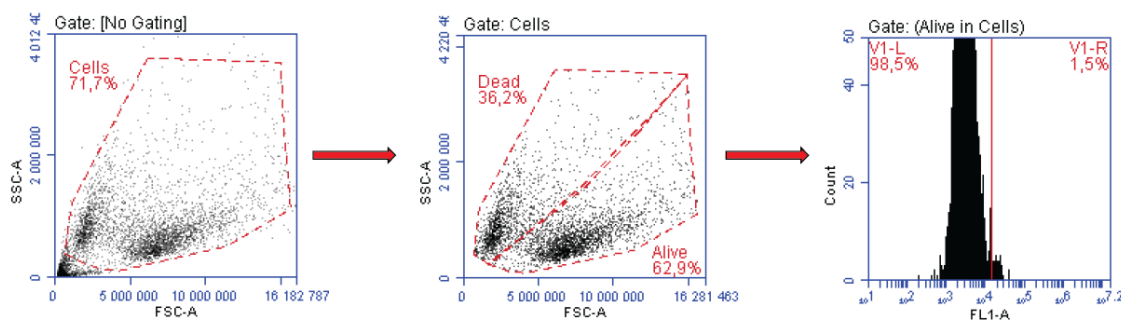


Figure 1. Procédure de traitement des événements en cytométrie. Pour le contrôle négatif (cellules non transfectées), la population cellulaire a été sélectionnée afin d'éliminer les petits débris et artefacts. Par la suite, deux régions de tri (gates) ont été définies pour séparer les cellules "vivantes" des cellules "mortes". Enfin, les cellules "vivantes" sélectionnées ont été analysées en fonction de leur intensité de fluorescence [18].

Le contrôle négatif a servi de référence pour établir les limites (trait vertical rouge) entre les cellules non fluorescentes (à gauche) et les cellules fluorescentes (à droite) (Figure 1). Les filtres et les limites définis sur l'échantillon de contrôle négatif ont été appliqués à tous les échantillons.

2.7. Marquage du chitosane et du plasmide

Le chitosane a été marqué à la Rhodamine B selon le protocole suivant. Le chitosane a été dissous à une concentration de 5 g/L (ou 10 g/L dans le cas des copolymères chitosane-*b*-dextrane) dans de l'eau milli-Q à laquelle a été ajoutée la quantité stœchiométrique de HCl par rapport aux fonctions amines. Un excès de 10% a été ajouté pour assurer la protonation complète des unités glucosamine. La solution a été laissée sous agitation pendant une nuit, et son pH a été ajusté à 6. Un volume approprié d'une solution de Rhodamine-NHS à 25 g/L dans le DMSO a ensuite été ajouté à la solution de chitosane dans le but de marquer une amine sur 100. La solution est restée sous agitation à l'abri de la lumière pendant une demi-journée. La solution finale a ensuite été dialysée contre de l'eau à l'aide d'une membrane en cellulose régénérée ayant un seuil de coupure de 3,5 kDa. Le chitosane-Rhodamine a été récupéré par lyophilisation et analysé par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) afin de confirmer le greffage de la Rhodamine (Figure 2).

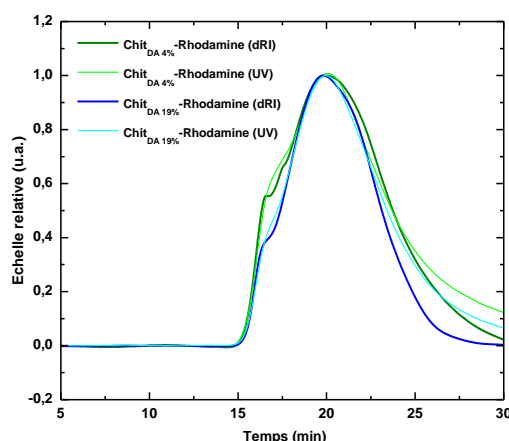


Figure 2. Chromatogrammes SEC du Chit_{DA 4%}-Rhodamine et du Chit_{DA 19%}-Rhodamine en tampon acétate (0,2 M AcOH/0,15 M AcONa, pH 4,5) avec détection réfractométrique (dRI) et UV à 584 nm.

Le plasmide pEGFP-C1 a été marqué à la Cyanine 5 en utilisant le kit Label IT Cy 5 de Mirus Bio selon les instructions du fabricant.

2.8. Marquage des cellules HEK 293

Le noyau et le cytosquelette des cellules ont été marqués respectivement avec du Hoechst 33342 et de l'Alexa Fluor 488. Après incubation des complexes dans les suspensions cellulaires pendant 5 heures, 24 heures ou 48 heures, 50 μL par réplicats ont été prélevés pour l'analyse par cytométrie de flux. Puis, les six réplicats de chaque condition ont été combinés (6 x 450 μL) et répartis dans deux microtubes Eppendorf de 1,5 mL. Les suspensions cellulaires ont ensuite été centrifugées à 200 x g pendant 5 minutes à 20 °C pour éliminer le milieu de culture et récupérer un culot de cellules. Pour la fixation, 500 μL de paraformaldéhyde à 4% ont été ajoutés aux culots, qui ont été remis en suspension et incubés pendant 15 minutes à température ambiante. Après centrifugation à 200 x g pendant 5 minutes à 20 °C, le surnageant a été éliminé. Les culots ont été lavés avec 1 mL de PBS 1X, suivi d'un nouveau cycle de centrifugation de 5 minutes à 200 x g et 20 °C pour retirer le surnageant. Pour la perméabilisation, 500 μL d'une solution de Triton X-100 à 0,1 % et de sérum de veau fœtal (SVF) à 5 % dans du PBS ont été ajoutés aux culots cellulaires. Après dispersion des culots et incubation pendant 15 minutes à température ambiante, les solutions ont été centrifugées à 200 x g pendant 5 minutes à 20 °C, puis le surnageant a été éliminé. Par la suite, 100 μL d'une solution d'Alexa Fluor 488 à une concentration de 2 gouttes/mL (recommandation fabricant) dans du PBS ont été ajoutés aux culots. Après remise en suspension et incubation pendant 25 minutes à l'abri de la lumière, 100 μL d'une solution de Hoechst 33342 à une concentration de 0,01 g/L dans du PBS ont été ajoutés. Les échantillons ont de nouveau été incubés pendant 5 minutes. Enfin, 500 μL de PBS ont été ajoutés aux solutions, suivis d'une centrifugation à 200 x g pendant 5 minutes à 20 °C. Les surnageants ont été éliminés, et les culots ont été lavés une dernière fois avec 500 μL de PBS. Après un dernier cycle de centrifugation de 5 minutes à 200 x g et 20 °C, les surnageants ont été éliminés en veillant à conserver un petit volume (environ 50 μL) pour remettre les cellules en suspension. Pour la préparation des lames, 10 μL des suspensions cellulaires ont été déposés sur une lame de verre et étalés à l'aide d'une pointe de pipette. Une goutte de milieu de montage Fluoromount a été ajoutée avant le dépôt d'une lamelle de verre. Les lames ont été laissées à sécher une nuit à température ambiante, à l'abri de la lumière, puis conservées à 4 °C jusqu'à l'analyse par microscopie confocale.

2.9. Microscopie confocale

Les images de microscopie confocale à balayage laser ont été acquises sur un microscope inversé Leica TCS SP5 équipé d'un objectif à immersion d'huile HCX PL APO 63x, NA 1,4 en mode fluorescence. Les réglages des sorties des lasers ainsi que des photomultiplicateurs ont été optimisés comme suit : le fluorochrome Hoechst 33342 a été excité avec une diode laser à 405 nm (12,5%) et sa fluorescence mesurée sur une fenêtre d'émission allant de 410 nm à 470 nm, l'Alexa Fluor 488 a été excité avec un laser Argon à 488 nm (10%) tandis que son émission a été collectée sur une gamme allant de 495 à 550 nm, la Rhodamine B a été excitée à l'aide d'un laser solide DPSS à 561 nm et son émission collectée entre 570-610 nm et enfin la Cyanine 5 a été excitée avec un laser Hélium-Néon à 633 nm et sa lumière émise collectée entre 640-750 nm. Les cellules ont également été observées avec un laser Hélium-Néon à 633 nm (10%) en mode transmission pour acquérir des images en fond clair. Toutes les images ont été collectées à l'aide du microscope en mode séquentiel (3 ou 4 canaux utilisés) pour éviter la superposition des spectres d'émission des différents fluorochromes avec un format de 512*512 pixels. Afin d'évaluer la

distribution 3D des fluorochromes dans les cellules, une série de 50 images couvrant une profondeur de 6-10 μm a été enregistrée à 600 Hz. Le traitement des images de fluorescence et la reconstruction 3D ont été réalisés à l'aide du logiciel FIJI ImageJ. Les configurations de gain et d'*offset* des photomultiplicateurs ont été effectuées sur les cellules de contrôle afin de corriger le signal d'auto-fluorescence en vert, rouge et fuchsia.

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Complexes chitosane/plasmide

Les complexes chitosane/acides nucléiques suscitent un grand intérêt en raison de leur potentiel en tant que vecteurs de délivrance de gènes. Grâce à sa nature cationique, le chitosane peut interagir avec les acides nucléiques, tels que l'ADN génomique ou plasmidique, pour former des complexes stables. Dans cette étude, les complexes ont été préparés avec le plasmide pEGFP-C1, qui code pour la protéine fluorescente verte, afin de permettre une évaluation directe et rapide de l'efficacité de transfection. Les méthodes de formulation des complexes chitosane/plasmide sont similaires à celles employées dans le chapitre précédent pour la formation de complexes avec l'ADN de thymus de veau. Le rapport de charge $R_{+/-}$, qui prend en compte uniquement les amines protonées du chitosane, a été utilisé de manière systématique pour la formulation des polyplexes.

Dans un premier temps, la stœchiométrie de complexation des complexes chitosane/plasmide a été déterminée par électrophorèse sur gel d'agarose. La méthode de détermination de la stœchiométrie par mesure du potentiel zêta, utilisée précédemment pour les complexes chitosane/ADN de thymus de veau, n'est pas appropriée en présence de plasmide en raison des volumes importants de solutions de complexes qu'elle requiert. L'électrophorèse sur gel est une alternative particulièrement avantageuse, car elle nécessite de très faibles quantités d'acides nucléiques. Tant que la stœchiométrie de complexation n'est pas atteinte, une partie du plasmide reste libre, car n'étant pas entièrement complexé avec le chitosane. Après 30 minutes de centrifugation à 18 000 x g à 20 °C, les complexes chitosane/ADN se retrouvent dans la fraction sédimentée, tandis que le plasmide non complexé, s'il est présent, demeure dans le surnageant. Les surnageants des suspensions de complexes préparés à pH 4 ont été déposés sur gel afin de quantifier la quantité d'ADN libre en fonction du rapport de charge. Le plasmide présent dans les surnageants migre vers l'électrode positive sous l'effet du champ électrique, ce qui se traduit par l'apparition de bandes visibles sur le gel après révélation par irradiation UV. En revanche, lorsque le plasmide est entièrement complexé avec le chitosane, aucune bande caractéristique n'apparaît sur le gel. La Figure 3 présente les électrophorèses des surnageants des complexes préparés avec des chitosanes ayant des degrés d'acétylation (DA) allant de 4 à 64 %.

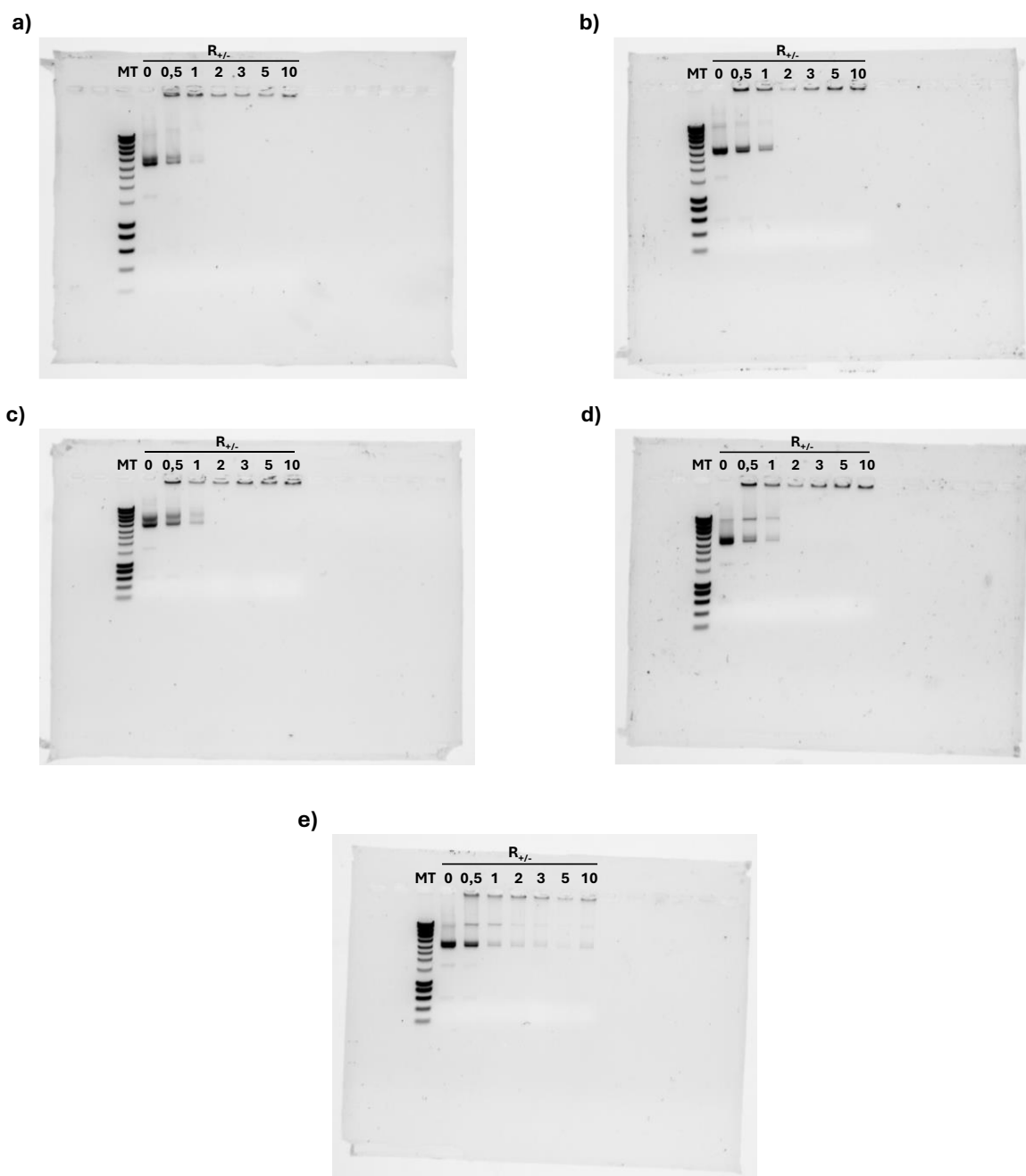


Figure 3. Gels d'électrophorèse présentant la migration de plasmide présent dans les surnageants des complexes à base de chitosane a) DA 4%, b) DA 19%, c) DA 28%, d) DA 48% et e) DA 64% en fonction du rapport de charge $R_{+/-}$. La dénomination « MT » correspond au marqueur de taille SmartLadder (200 to 10 000 pb) utilisé.

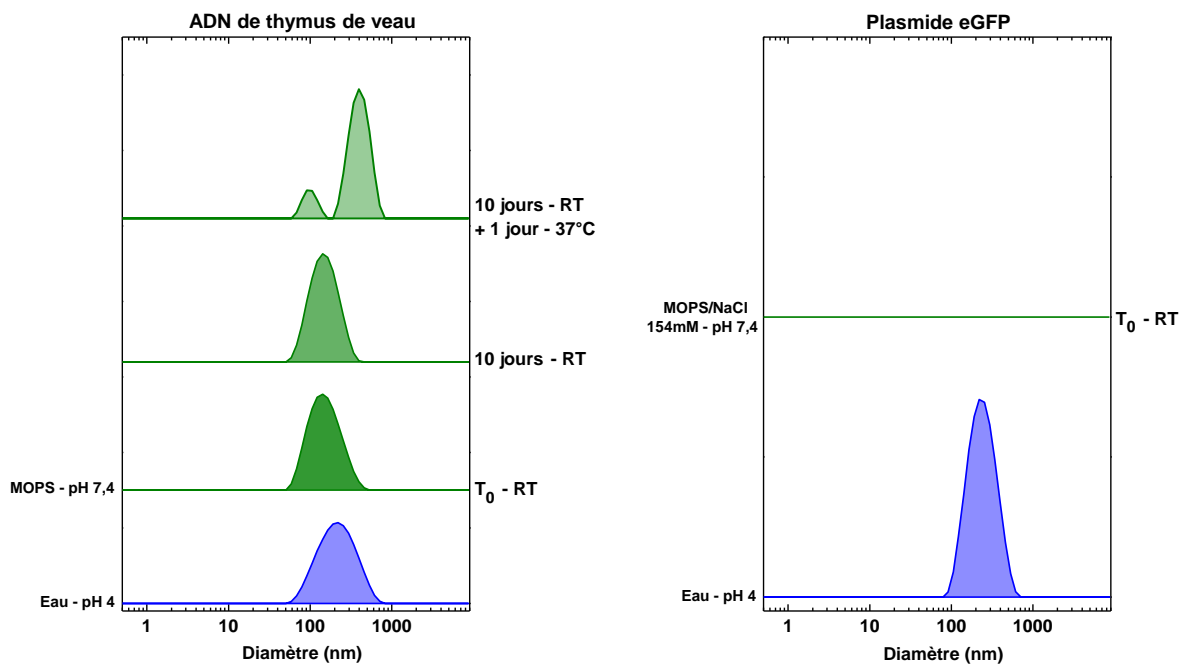
Pour les chitosanes de DA 4%, 19%, 28% et 48%, les résultats sont explicites : une diminution progressive de l'intensité de la bande caractéristique du plasmide, (correspondant au marqueur de taille de 7 000 pb soit 2 300 000 g/mol), est observée jusqu'à disparition complète pour des rapports de charge $R_{+/-}$ supérieurs à 1 (Figure 3). En revanche, pour le chitosane de DA 64%, bien qu'une diminution de l'intensité de la bande soit visible, une légère bande persiste à tous les rapports de charge, même les plus élevés. Cela est certainement en lien avec la plus faible densité de charge du chitosane de DA 64%, entraînant une complexation moins efficace avec le plasmide. L'espacement plus important des charges le long de la chaîne réduit les forces coopératives nécessaires à une complexation optimale.

La décision d'utiliser le rapport de charge $R_{+/-}$, plutôt que le rapport amine/phosphate (N:P), se confirme être pertinente, la stœchiométrie optimale étant logiquement atteinte à un $R_{+/-}$ de 1 pour tous les chitosanes.

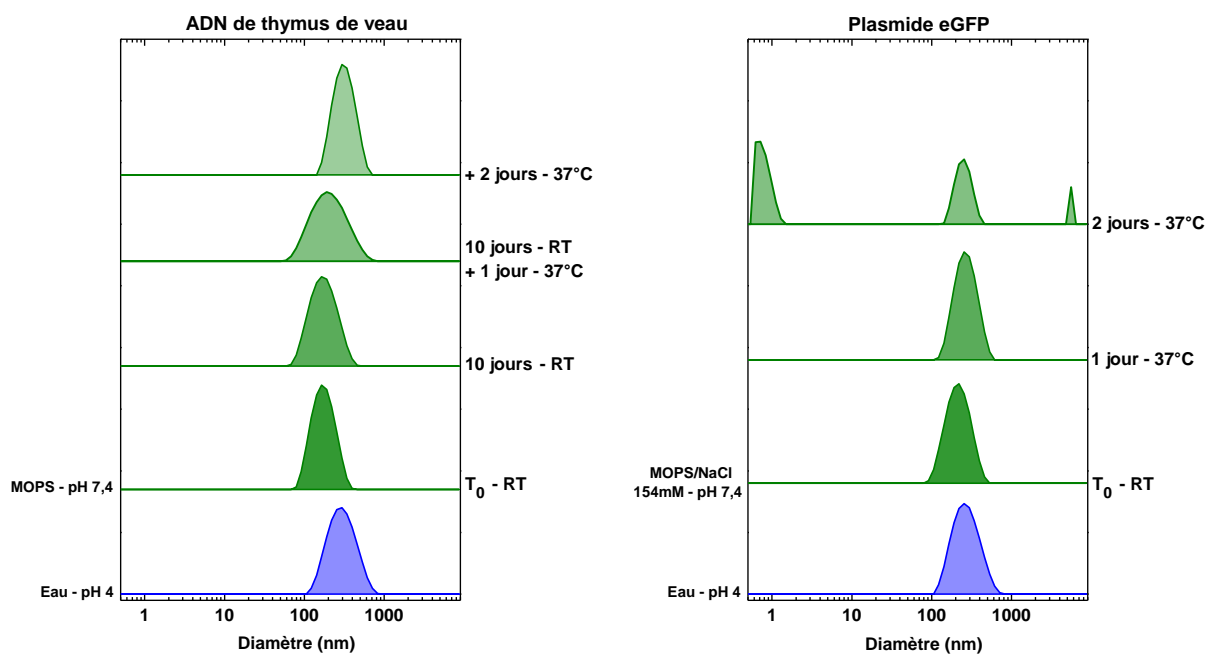
3.2. De l'ADN de thymus de veau vers le plasmide

Après détermination de la stœchiométrie de complexation en présence de plasmide, il est désormais nécessaire de vérifier la pertinence de la transposition des conditions de formulation optimisées sur les complexes chitosane/ADN de thymus de veau à ceux formés avec le plasmide. L'ADN de thymus de veau, molécule linéaire de plus de 10 000 000 g/mol, se distingue du plasmide, qui est plus petit, circulaire et qui présente une conformation superenroulée. Ces différences structurales étant susceptibles d'influencer les propriétés de complexation, les tailles caractéristiques et la stabilité en tampon des complexes formés avec le plasmide ont été suivies sur plusieurs jours et comparées à celles des complexes formés avec l'ADN de thymus de veau (Figure 4 et Tableau 1). Plusieurs conditions de formulation ont été sélectionnées en fonction des résultats obtenus dans le chapitre précédent. L'objectif est de tester les formulations les plus stables avec le plasmide ($R_{+/-} = 5$, Zn:P 5), tout en réalisant plusieurs contrôles dans des conditions de stabilité moins favorables à des fins de comparaison.

a) Chitosane DA 19% - $R_{v/l} = 5$ - Zn:P 5



b) Chitosane DA 28% - $R_{v/l} = 5$ - Zn:P 5



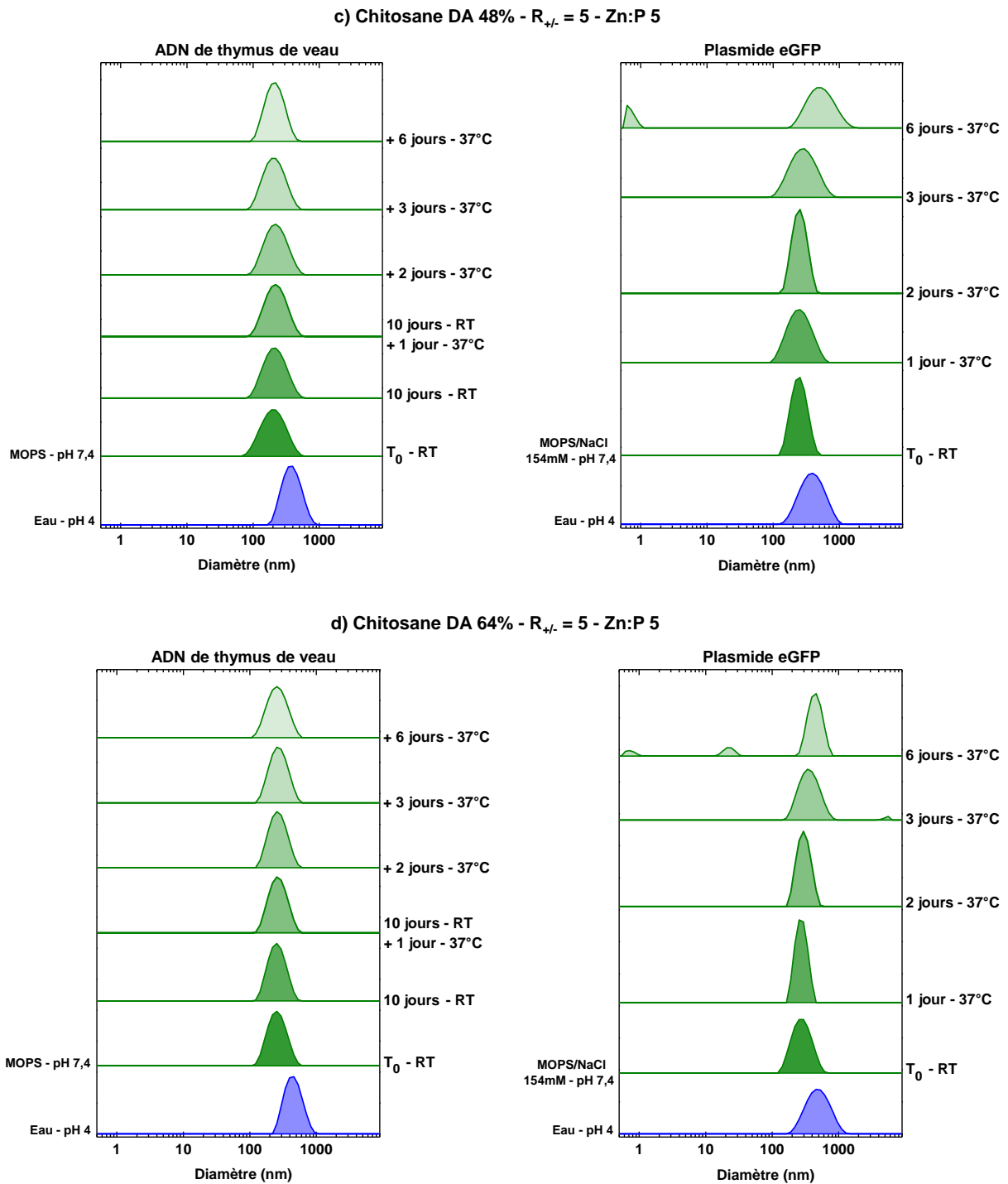


Figure 4. Distributions de tailles des complexes (gauche) chitosane/ADN et (droite) chitosane/plasmide à $R_{+/-} = 5$ et Zn:P 5 dans l'eau à pH 4 (bleu) et après dilution au cinquième dans un tampon MOPS à pH 7,4 (vert). (a) Chit_{DA} 19%, (b) Chit_{DA} 28%, (c) Chit_{DA} 48% et (d) Chit_{DA} 64%.

Tableau 1. Comparaison des caractéristiques obtenues par DLS des complexes chitosane/ADN de thymus de veau et chitosane/plasmide à R_{+/} = 5 et Zn:P 5. T₀ – RT : analyse effectuée après 1 heure d'incubation à température ambiante.

DA	Acide nucléique	Conditions	pH	DCR (keps)	Diamètre (nm)	PDI
19%	ADN	T ₀ - RT	4,0	53 500	175	0,24
		T ₀ - RT	7,4	15 800	135	0,20
		10 jours - RT	7,4	16 400	137	0,12
		10 jours - RT + 24h - 37°C	7,4	600	370	0,40
	Plasmide	T ₀ - RT	4,0	63 300	215	0,20
		T ₀ - RT	7,4	11 600	4 500	1,0
28%	ADN	T ₀ - RT	4,0	64 500	250	0,23
		T ₀ - RT	7,4	18 500	160	0,18
		10 jours - RT	7,4	19 600	160	0,13
		10 jours - RT + 1 jour - 37°C	7,4	20 400	180	0,18
		10 jours - RT + 2 jours - 37°C	7,4	7 600	260	0,23
		T ₀ - RT	4,0	71 000	240	0,19
	Plasmide	T ₀ - RT	7,4	21 000	200	0,10
		1 jour - 37°C	7,4	4 200	250	0,06
		2 jours - 37°C	7,4	200	950	0,82
		T ₀ - RT	4,0	77 200	340	0,19
48%	ADN	T ₀ - RT	7,4	22 100	190	0,15
		10 jours - RT	7,4	23 900	195	0,14
		10 jours - RT + 1 jour - 37°C	7,4	26 700	200	0,14
		10 jours - RT + 2 jours - 37°C	7,4	25 400	200	0,13
		10 jours - RT + 3 jours - 37°C	7,4	26 200	190	0,13
		10 jours - RT + 6 jours - 37°C	7,4	24 800	200	0,11
		T ₀ - RT	4,0	68 000	330	0,23
	Plasmide	T ₀ - RT	7,4	18 500	235	0,10
		1 jour - 37°C	7,4	18 200	235	0,12
		2 jours - 37°C	7,4	17 000	240	0,12
3 jours - 37°C		7,4	13 900	260	0,17	
6 jours - 37°C		7,4	100	480	0,52	
64%	ADN	T ₀ - RT	4,0	96 700	410	0,17
		T ₀ - RT	7,4	26 800	230	0,11
		10 jours - RT	7,4	29 400	240	0,10
		10 jours - RT + 1 jour - 37°C	7,4	32 800	240	0,12
		10 jours - RT + 2 jours - 37°C	7,4	35 200	240	0,10
		10 jours - RT + 3 jours - 37°C	7,4	35 200	240	0,13
		10 jours - RT + 6 jours - 37°C	7,4	31 700	240	0,11
	Plasmide	T ₀ - RT	4,0	89 200	400	0,22
		T ₀ - RT	7,4	13 200	255	0,15
		1 jour - 37°C	7,4	12 300	265	0,05
2 jours - 37°C		7,4	7 500	285	0,11	
3 jours - 37°C		7,4	5 900	350	0,23	
6 jours - 37°C	7,4	200	550	0,53		

A pH 4, il n'y a pas de différences significatives en termes de propriétés colloïdales (taille, PDI, intensité diffusée) entre les complexes obtenus avec le plasmide et ceux formés avec l'ADN de thymus de veau (Tableau 1). Cependant après dilution en tampon MOPS et après 1 heure d'incubation à température ambiante, les complexes formés avec le plasmide présentent des tailles hydrodynamiques légèrement supérieures (+ 20%). A 37°C, la déstabilisation est de façon générale plus marquée avec le plasmide qu'avec l'ADN de thymus de veau. Les complexes à base de Chit_{DA 19%} et de plasmide sont moins stables, même à température ambiante, que ceux formés avec l'ADN de thymus de veau (Figure 4). En présence de chitosane de DA 28%, les complexes formés avec le plasmide présentent une stabilité réduite, comme en témoigne une diminution de l'intensité diffusée après seulement 1 jour à 37 °C, associée à une légère augmentation du diamètre des particules (Figure 4 et Tableau 1). Pour les chitosanes de DA 48% et 64%, les complexes formés avec l'ADN de thymus de veau sont remarquablement stables plus de 6 jours en tampon MOPS à 37°C, sans présenter aucun signe de déstabilisation. En revanche, avec le plasmide, une diminution significative de l'intensité diffusée est observée après 3 jours à 37 °C avec le chitosane de DA 48%, et dès 2 jours avec le chitosane de DA 64%, associée à une augmentation progressive du diamètre des particules (Figure 4 et Tableau 1).

La stœchiométrie de complexation des différents chitosanes avec le plasmide ayant été préalablement vérifiée, la diminution de la stabilité des complexes chitosane/plasmide par rapport aux complexes chitosane/ADN de thymus de veau ne peut être imputée à ce paramètre. En d'autres termes, le chitosane complexe l'ADN de la même manière qu'il soit linéaire ou circulaire. Une seconde hypothèse, en lien avec les différences structurales entre l'ADN génomique et l'ADN plasmidique, peut être proposée. Il est supposé que la condensation de l'ADN par complexation avec le chitosane soit plus difficile à obtenir pour le plasmide en raison de sa conformation superenroulée. Dans ces conditions, l'auto-assemblage des molécules de plasmide sous forme de particules colloïdales est moins bien défini, entraînant des tailles de particules plus grandes que celles obtenues avec l'ADN de thymus de veau. Bien que légèrement moins stables, les complexes chitosane/plasmide démontrent un comportement relativement similaire à celui des complexes formés entre le chitosane et l'ADN de thymus de veau dans les conditions précédemment définies. Tous les systèmes étudiés par la suite ont donc été formulés avec le plasmide pEGFP-C1.

3.3. Essais de transfection

Dans le chapitre précédent, les complexes chitosane/ADN ont été optimisés pour leur stabilité. L'objectif est désormais d'évaluer leur activité biologique. Pour ce faire, les complexes ont été formulés avec un plasmide codant pour la protéine verte fluorescente (eGFP), permettant de déterminer directement l'efficacité de transfection. Les cellules HEK 293 en suspension ont été sélectionnées en raison de leur haute efficacité de transfection avec les complexes chitosane/ADN, contrairement à d'autres lignées cellulaires comme 9HTEo ou HeLa [7]. Des contrôles positifs et négatifs, essentiels pour évaluer la performance et la fiabilité des expériences, ont été mis en place. Pour le contrôle positif, des complexes PEI-1 (25 kDa)/plasmide ont été utilisés car présentant des taux de transfection particulièrement élevés en présence de cellules HEK 293 (> 70 %) [20],[21]. Le contrôle négatif a été réalisé en remplaçant le volume de complexes normalement ajouté aux cellules par un volume identique de tampon PBS. Plusieurs essais de transfection successifs ont été effectués, et les paramètres ont été ajustés en fonction

des résultats obtenus à chaque étape. Contrairement à l'approche physicochimique, où l'objectif est d'optimiser les caractéristiques colloïdales des complexes, la démarche ici vise avant tout à obtenir des niveaux de transfection élevés, sans se focaliser sur l'optimisation des propriétés colloïdales.

Transfection n°1. Dans le chapitre précédent, il a été démontré que le DA du chitosane et la concentration en zinc influencent de manière significative la stabilité des complexes. En modulant ces deux paramètres, il est possible de tester une large gamme de formulations présentant différents niveaux de stabilité. Mais qu'en est-il réellement de l'impact de la stabilité colloïdale des particules chitosane/plasmide sur l'efficacité de transfection de ces systèmes ? En d'autres termes, les particules étant les mieux définies en termes de taille et de PDI sont-elles les plus efficaces en transfection ?

Dans un premier temps, l'efficacité de transfection de huit formulations de complexes a été évaluée. Les chitosanes avec des DAs de 48% et 64%, qui forment des complexes particulièrement stables en conditions physiologiques à un rapport de charge $R_{+/-} = 5$ (Figure 4), ont été évalués biologiquement, avec et sans zinc, afin d'étudier l'influence de ce dernier sur l'efficacité de transfection. Pour les complexes à base de chitosane de DA 28%, présentant une stabilité intermédiaire, plusieurs conditions de formulations ont été testées : des rapports de charge de 2,5 et 5 en présence de zinc (Zn:P 5) ont été évalués, ainsi qu'un rapport de charge de 5 en l'absence de zinc. Ces différentes conditions permettent à la fois d'évaluer l'impact du rapport de charge sur la transfection ainsi que celui du zinc. Finalement, les complexes à base de chitosane de DA 19%, à $R_{+/-} = 5$ en présence de zinc (Zn:P 5), fortement instables en conditions physiologiques (Figure 4) ont été évalués. Après 48 heures d'incubation en présence de cellules HEK 293, ces dernières ont été analysées par cytométrie de flux pour déterminer le pourcentage de cellules exprimant l'eGFP (Figure 5).

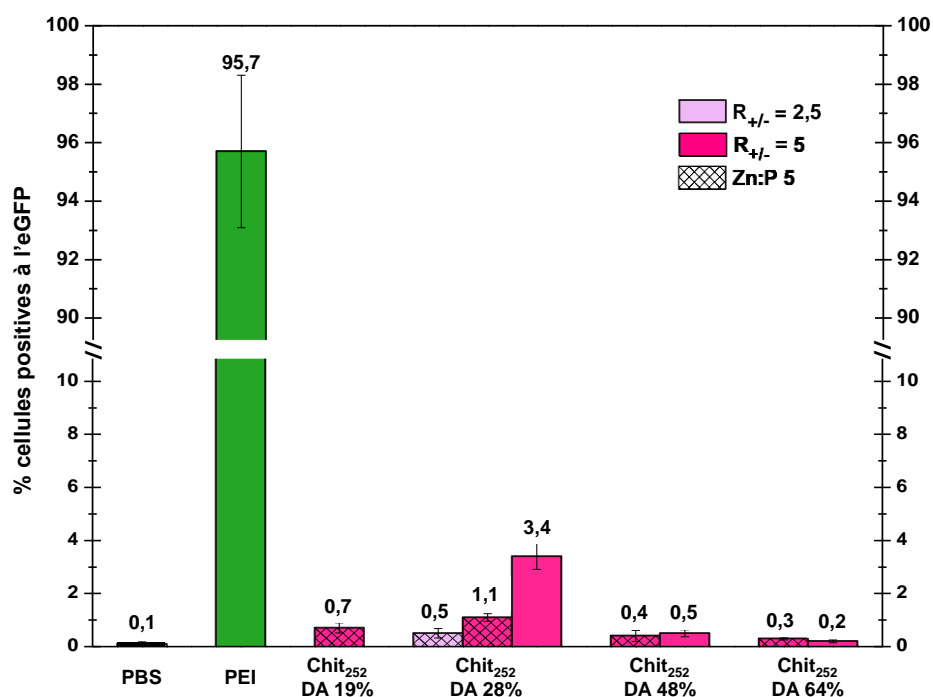


Figure 5. Efficacité de transfection des complexes chitosane/plasmide déterminée par cytométrie de flux. L'influence du DA, du rapport de charge $R_{+/-}$ et du rapport Zn:P a été étudiée.

Les complexes à base de PEI-1 (25 kDa) affichent une efficacité de transfection supérieure à 95%, validant ainsi le choix de ce système comme contrôle positif. En comparaison, tous les systèmes à base de chitosane présentent moins de 5% de cellules positives à l'eGFP (Figure 5). Le système le plus performant, avec un taux de transfection de 3,4%, est celui formulé avec du chitosane de DA 28% à un rapport de charge $R_{+/-}$ de 5 sans zinc ajouté. Le taux de transfection de ce même système formulé avec du zinc chute à 1,1%. Un rapport de charge de 5 semble être plus performant qu'un rapport de charge de 2,5 comme le démontrent les résultats obtenus avec le chitosane de DA 28% (Figure 5). Tous les autres systèmes, et notamment les systèmes les plus stables en conditions physiologiques, à savoir ceux à base de chitosane de DA 48% et 64%, présentent des taux de transfection inférieurs à 1% avec ou sans zinc. Ces premiers résultats suggèrent que des complexes physico-chimiquement très stables sont inefficaces en termes de transfection, remettant ainsi en question l'utilité du zinc pour des applications de transfection.

Ces premières conclusions conduisent à plusieurs hypothèses : l'internalisation des complexes est-elle peu efficace en raison de rapports de charge trop faibles ? les complexes se dissocient-ils avant l'internalisation et le plasmide est-il libéré avant d'atteindre les cellules ? Alternativement, les complexes sont-ils bien internalisés mais trop stables pour libérer le plasmide ? Ces questions doivent être approfondies afin de mieux comprendre les mécanismes limitant l'efficacité de transfection de ces systèmes.

Stabilité des complexes PEI/plasmide. La forte stabilité des complexes de chitosane en présence de zinc est l'une des hypothèses avancées pour expliquer les faibles taux de transfection observés. Il est donc pertinent d'examiner la stabilité des complexes PEI/plasmide, qui affichent des taux de transfection supérieurs à 90 %. Les complexes préparés dans du PBS ont été analysés par DLS, et leur stabilité a été suivie sur plusieurs heures (Figure 6).

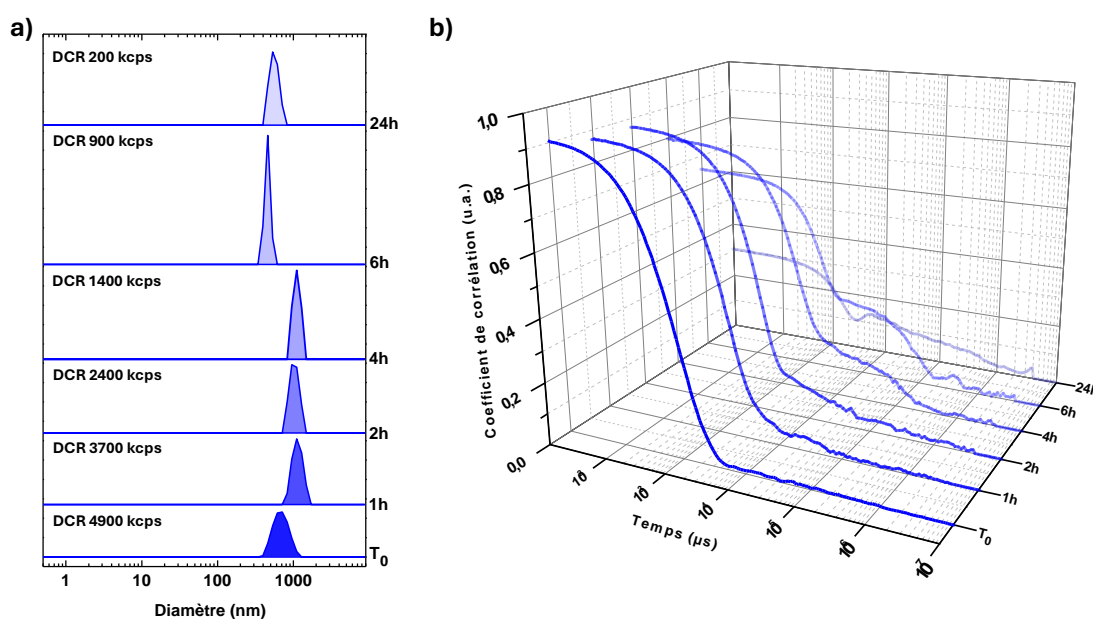


Figure 6. a) Distributions de taille et b) corrélogrammes des complexes PEI/plasmide formulé à un rapport massique de 3:1 ($R_{+/-} = 9$, en tenant compte d'un taux de protonation de la PEI de 40% à pH 7,4) après incubation à température ambiante en tampon PBS à pH 7,4.

Les complexes formés entre la PEI et le plasmide ont une taille d'environ 600 nm dans le PBS, nettement supérieure à celle des complexes à base de chitosane, qui est comprise entre 150 et 250 nm en tampon MOPS/NaCl 154mM pH 7,4 (Figure 4). Après une heure d'incubation à température ambiante, les complexes de PEI commencent à s'agréger, entraînant une augmentation significative de leur diamètre hydrodynamique et l'apparition d'un second mode de relaxation sur le corrélogramme (Figure 6). Au fil des heures, une déstabilisation progressive est observée, menant à une agrégation totale des complexes après 24 heures en tampon PBS à température ambiante, qui se manifeste par une valeur d'ordonnée à l'origine inférieure à 0,4 et une nette diminution de l'intensité diffusée (DCR). Cela souligne que, bien que ces complexes soient très efficaces en transfection, ils sont également hautement instables en conditions physiologiques. Ce constat remet donc en question la nécessité de formuler des complexes chitosane/plasmide particulièrement stables pour atteindre des taux de transfection élevés.

Transfection n°2. Un second essai de transfection a été réalisé en excluant le zinc des formulations de complexes. Des complexes de chitosane présentant des DAs de 4%, 19%, 28%, 48% et 64% ont été évalués à divers rapports de charge (Figure 7). Le chitosane de DA 4% a été inclus dans l'étude en raison de l'instabilité des complexes qu'il forme avec le plasmide. En comparaison avec un rapport de charge de 5, un $R_{+/-}$ de 2,5 pourrait favoriser la dissociation des complexes, tandis qu'un $R_{+/-}$ de 10 devrait offrir une meilleure protection contre la dégradation du plasmide par les nucléases et augmenter les interactions entre les particules de complexes et la membrane cellulaire. Ainsi, ces conditions visent à déterminer si les faibles taux de transfection précédemment observés avec ces systèmes sont en lien avec une faible internalisation ou une stabilité élevée des complexes dans les cellules.

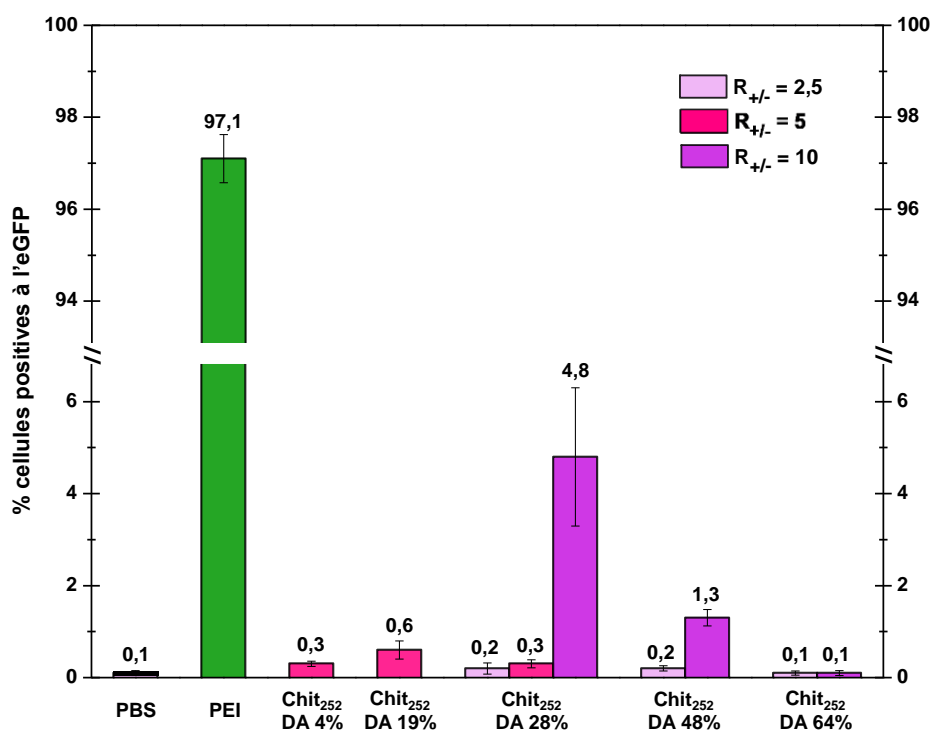


Figure 7. Efficacité de transfection des systèmes chitosane/plasmide à différents rapports de charge déterminée par cytométrie de flux.

Une nouvelle fois, les taux de transfection des systèmes à base de chitosane demeurent très faibles par rapport au système de référence PEI/plasmide. Cependant, plusieurs conclusions émergent de ce second essai : i) la diminution du rapport de charge de 5 à 2,5 n'améliore pas l'efficacité de transfection ; au contraire, elle la diminue, comme le montrent les taux de transfection des systèmes à base de chitosane de DA 28% et 48% (Figure 7), ii) l'augmentation du rapport de charge entraîne une augmentation significative des taux de transfection, comme indiqué par l'efficacité de transfection des systèmes formulés avec des chitosanes de DA 28% et 48% (Figure 7), iii) l'augmentation du DA au-delà de 28% semble avoir un effet négatif, entraînant une nette diminution des taux de transfection des complexes à base de chitosane de DA 48% et 64% à $R_{+/-} = 10$ (Figure 7). Pour ces raisons, les chitosanes de DA 48% et 64% ne seront plus utilisés par la suite. Un dernier point porte sur la différence observée entre les taux de transfection obtenus lors du premier essai et ceux du second pour des systèmes identiques. Le taux de transfection du système à base de chitosane de DA 28% à un $R_{+/-}$ de 5, en l'absence de zinc, était de 3,4 % lors du premier essai (Figure 5), alors qu'il chute à 0,3 % lors du second (Figure 7). Cette variation met en évidence une limite dans la comparaison des taux de transfection entre des essais réalisés à des dates différentes. Malgré cela, les comparaisons et conclusions basées sur plusieurs conditions testées au cours d'un même essai restent pertinentes et fiables.

Transfection n°3. A la suite de ces résultats, un troisième essai de transfection, impliquant les chitosanes de DA 4%, 19%, et 28%, a été mis en place. Des complexes entre ces trois chitosanes et du plasmide ont été formulés à des $R_{+/-}$ de 10 et 15, dans le but d'évaluer si des taux de transfection plus élevés pouvaient être atteints en augmentant le rapport de charge, comme cela a pu être observé avec de la PEI [22]. Le pourcentage de cellules positives à l'eGFP a été déterminé par cytométrie de flux à l'issue de 48 heures d'incubation (Figure 8).

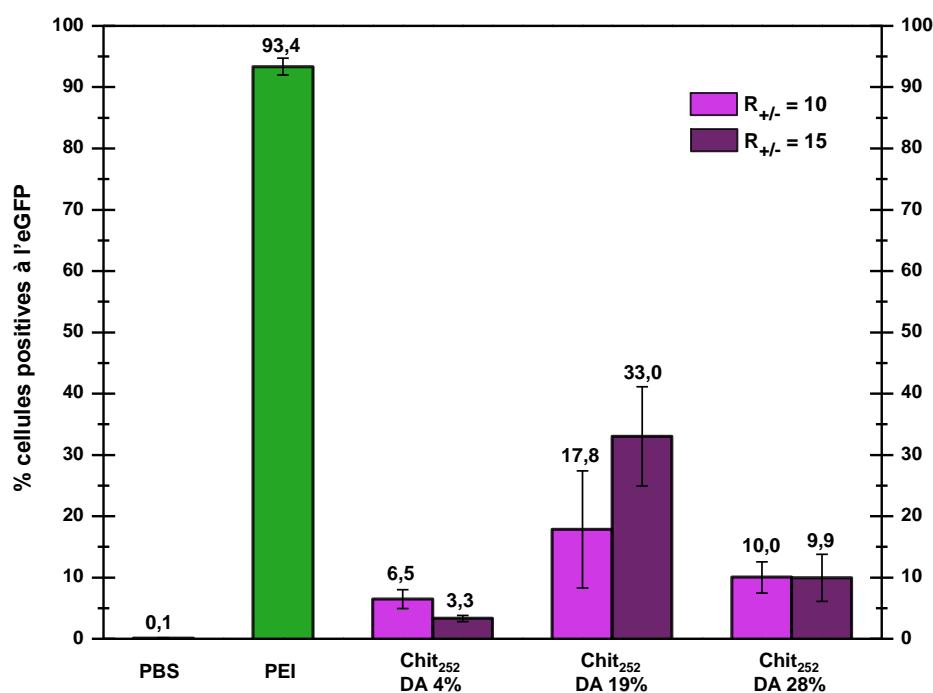


Figure 8. Efficacité de transfection des systèmes chitosane/plasmide à des rapports de charge de 10 déterminée par cytométrie de flux.

Les taux de transfection obtenus lors de cette troisième série se sont révélés nettement supérieurs à ceux obtenus précédemment. Cependant, il est à noter, qu'à systèmes identiques, les valeurs ne sont toujours pas comparables à celles obtenues lors de l'essai précédent. En effet, précédemment, les complexes à base de chitosane de DA 28% à $R_{+/-} = 10$ donnaient lieu à moins de 5% de taux de transfection (Figure 7), tandis que dans ce nouvel essai, 10% des cellules sont positives à l'eGFP (Figure 8). Cela souligne à nouveau l'importance de limiter les comparaisons aux taux de transfection obtenus dans une même série, à moins de pouvoir s'appuyer sur une moyenne calculée à partir de plusieurs essais effectués dans les mêmes conditions.

Concernant les conclusions de cette troisième expérience, les formulations à base de chitosane de DA 19% à un rapport de charge de 15 se sont avérées être les plus prometteuses pour la transfection de cellules HEK 293, avec un taux de transfection presque deux fois supérieur à celui obtenu à un rapport de charge de 10 (Figure 8). À l'inverse, pour les complexes formés par le chitosane de DA 4%, l'augmentation du rapport de charge n'a pas apporté d'amélioration, au contraire, le pourcentage de cellules positives à l'eGFP a été divisé par deux (Figure 8). Quant au chitosane de DA 28 %, les taux de transfection sont restés identiques aux deux rapports de charge testés. En conclusion, il est essentiel de trouver un équilibre concernant le DA du chitosane, qui, comme l'ont montré les précédents essais de transfection, ne doit ni être trop élevé ni trop faible afin de garantir une efficacité de transfection optimale. Le chitosane de DA 19% apparaît comme le meilleur choix. L'étape suivante implique, d'une part, la validation des 33% de cellules positives à l'eGFP obtenus avec les complexes formés par le chitosane de DA 19% à $R_{+/-} = 15$ (Figure 8). D'autre part, il est essentiel d'approfondir la compréhension du mécanisme d'internalisation des complexes pour s'assurer que les différences de taux de transfection entre les complexes à base de PEI et ceux à base de chitosane ne résultent pas simplement de différences de taux d'internalisation.

3.4. Suivi de l'internalisation par microscopie confocale

Suivi de l'internalisation du chitosane. La microscopie confocale de fluorescence est une méthode couramment employée pour visualiser l'internalisation des complexes polyélectrolytes au sein des cellules [18]. Pour ce faire, il est nécessaire de marquer à la fois les complexes et les composants cellulaires, notamment le noyau et le cytosquelette. Le marquage des complexes est effectué avant leur complexation avec le plasmide, en utilisant de la Rhodamine B greffée aux amines du chitosane. Pour préserver les propriétés de complexation du chitosane, seule une amine sur 100 est marquée à la Rhodamine B. Concernant les cellules, le noyau est marqué au Hoechst 33342 et le cytosquelette à l'Alexa Fluor 488. Le marquage des composants cellulaires est effectué post-transfection. Des images sont acquises par microscopie confocale de fluorescence après 5 heures, 24 heures et 48 heures d'incubation des complexes en présence des cellules. À la fin de la transfection, et avant le marquage des cellules, les suspensions cellulaires sont analysées par cytométrie de flux afin de déterminer le pourcentage de cellules positives à l'eGFP (Figure 9). Pour cette expérience, trois formulations de complexes différentes ont été évaluées : des complexes à base de chitosane de DA 4% à $R_{+/-} = 15$, et des complexes à base de chitosane de DA 19% à des rapports de charge de 5 et 15. Ces diverses conditions permettent d'évaluer simultanément l'impact du rapport de charge et du DA sur l'internalisation.

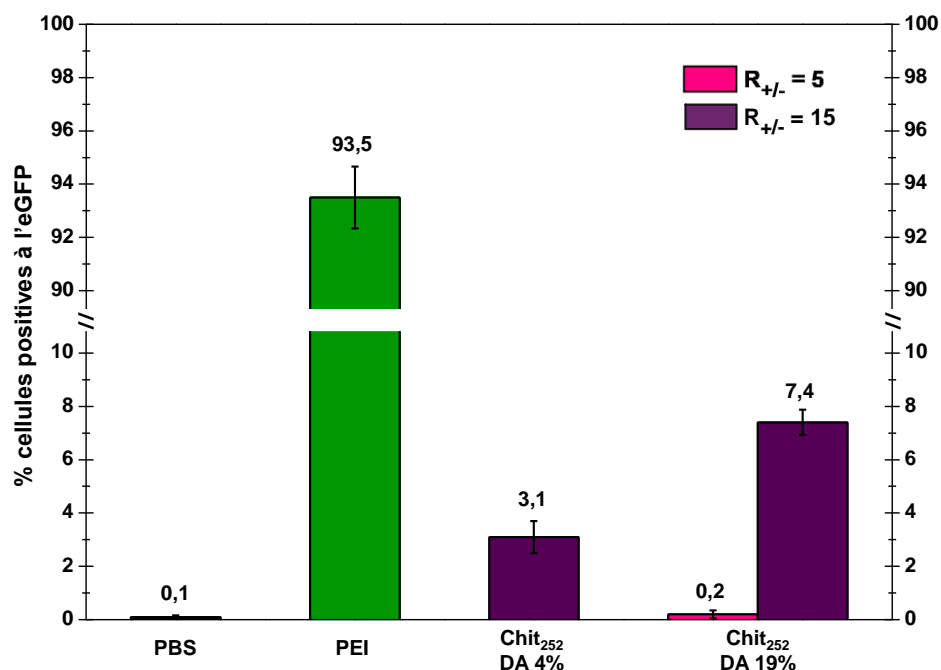
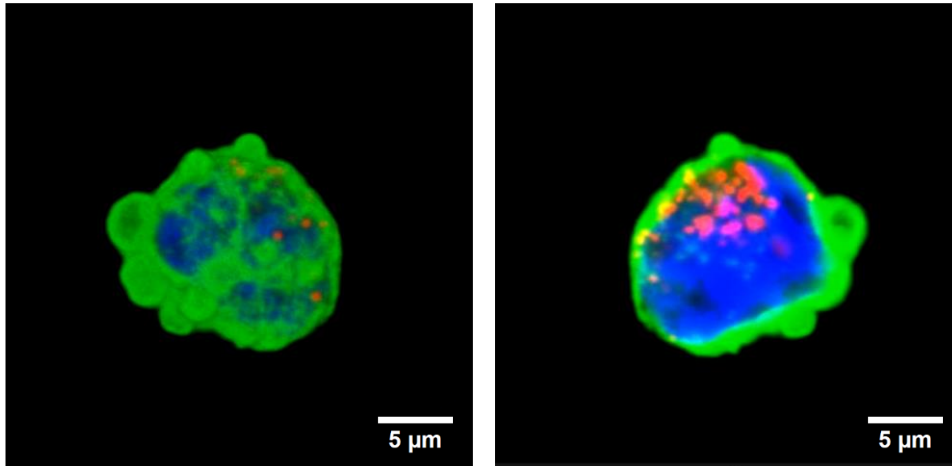


Figure 9. Efficacité de transfection des systèmes chitosane/plasmide à des rapports de charge de 5 et 15 déterminée par cytométrie de flux.

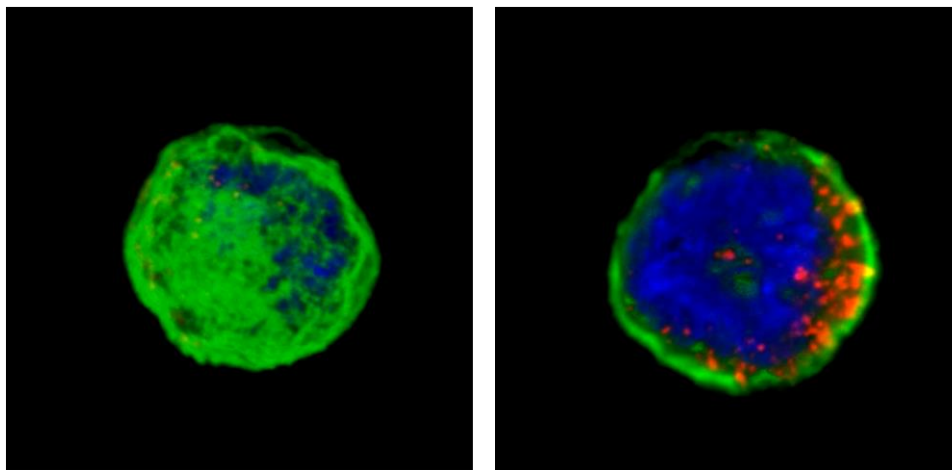
Conformément aux attentes, le système de transfection le plus performant est celui impliquant le chitosane de DA 19% formulé avec du plasmide à un rapport de charge de 15 (Figure 9). En effet, l'efficacité de transfection diminue avec le DA du chitosane, mais augmente avec le rapport de charge. Lors de la transfection précédente, les complexes à base de chitosane de DA 19% à $R_{+/-} = 15$ généraient plus de 30% de cellules positives à l'eGFP (Figure 8), tandis que cette fois-ci, dans les mêmes conditions, l'efficacité de ce système est seulement de 7% (Figure 9). Cela souligne une fois de plus les variations importantes observées d'une expérience à l'autre et met en évidence la nécessité de réaliser plusieurs réplicats avant de pouvoir tirer des conclusions fiables.

Les images obtenues par microscopie confocale ont démontré un début d'internalisation des complexes dès 5 heures d'incubation, indépendamment des conditions de formulation utilisées (données non montrées). Cependant, il est plus pertinent de s'intéresser aux images obtenues après 48 heures de transfection pour évaluer l'efficacité d'internalisation des différents systèmes. Le noyau des cellules, marqué au Hoechst 33342, apparaît en bleu sur les images de microscopie, tandis que le cytosquelette, marqué à l'Alexa Fluor 488, est vert. Les complexes de chitosane, marqués à la Rhodamine B, sont quant à eux représentés par des points et/ou des zones rouges au sein des cellules. Pour s'assurer que les zones rouges, représentant les complexes, sont localisées à l'intérieur de la cellule et non à sa surface, des reconstructions 3D des cellules ont été réalisées en superposant environ cinquante images prises à différentes hauteurs (z). Ces reconstructions 3D permettent une visualisation complète de la cellule, tant de son extérieur que de son intérieur, ce qui permet de distinguer les complexes présents à la surface de ceux réellement internalisés présents sur les coupes transversales (Figure 10).

a) Chitosane DA 4% - $R_{+/-} = 15$ - 48h transfection



b) Chitosane DA 19% - $R_{+/-} = 5$ - 48h transfection



c) Chitosane DA 19% - $R_{+/-} = 15$ - 48h transfection

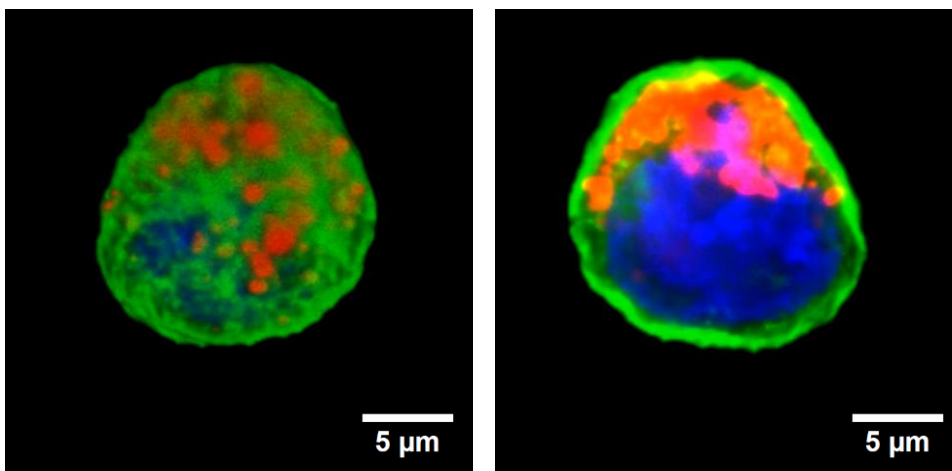


Figure 10. Reconstructions 3D obtenues par microscopie confocale de fluorescence des cellules après 48 heures de transfection : (gauche) extérieur des cellules, (droite) coupe transversale des cellules. Le bleu correspond au noyau des cellules, le vert au cytosquelette et le rouge au chitosane. a) chitosane DA 4%, $R_{+/-} = 15$, b) chitosane DA 19%, $R_{+/-} = 5$ et c) chitosane DA 19%, $R_{+/-} = 15$.

L'internalisation des complexes a été confirmée par la présence de nombreux points ou zones rouges sur les coupes transversales des cellules, et ce, pour les trois formulations testées (Figure 10). Cependant, des différences notables apparaissent entre ces trois formulations de complexes. Les systèmes à base de chitosane de DA 19% à $R_{+/-} = 5$, qui sont les moins efficaces en termes de transfection avec moins de 1% de cellules positives à l'eGFP (Figure 9), présentent également la plus faible densité de zones rouges à l'intérieur des cellules (Figure 10.b). En revanche, les systèmes formulés avec du chitosane de DA 19% à un rapport de charge de 15 affichent logiquement la plus grande concentration de complexes internalisés (Figure 10.c). Cela démontre l'importance cruciale du rapport de charge pour optimiser l'internalisation des complexes. Un rapport de charge plus élevé améliore non seulement la protection des acides nucléiques contre la dégradation enzymatique mais favorise également une meilleure interaction entre les complexes et les membranes cellulaires, facilitant l'internalisation par endocytose non spécifique.

La couleur magenta observée dans certaines zones, en particulier avec le chitosane de DA 19% à $R_{+/-} = 15$, semble indiquer la présence de chitosane dans le noyau des cellules (Figure 10.c). Cependant, malgré cette abondante présence de chitosane à l'intérieur des cellules, y compris au sein du noyau, l'efficacité de transfection reste très faible, avec au maximum 7% de cellules exprimant l'eGFP (Figure 9). Cette observation soulève des interrogations concernant l'internalisation des complexes et leur devenir dans les cellules. En effet, Nimesh *et coll.* ont précédemment démontré que le chitosane peut pénétrer dans les cellules seul, sans nécessiter la présence d'acides nucléiques [17]. Deux hypothèses pourraient alors expliquer les faibles taux de transfection observés : i) les complexes se sont dissociés avant l'internalisation, le plasmide ne serait donc pas co-internalisé avec le chitosane, ou ii) bien que le plasmide ait été efficacement internalisé avec le chitosane, les complexes ne parviennent pas à se dissocier efficacement pour libérer le plasmide dans le cytoplasme.

Suivi de l'internalisation du chitosane et du plasmide. Afin de s'assurer de l'internalisation conjointe du chitosane et du plasmide, un nouvel essai de transfection a été effectué et à nouveau suivi par microscopie confocale. Dans ce contexte, en plus du chitosane marqué à la Rhodamine B, le plasmide a également été marqué à la Cyanine 5. Ce double marquage permet non seulement de suivre l'internalisation des complexes avec précision, mais aussi de vérifier la colocalisation du plasmide et du chitosane à l'intérieur des cellules. Les complexes formés par les chitosanes de DA 4% et 19% à un rapport de charge de 15 ont été réévalués, ainsi que, pour la première fois, ceux formés par le copolysaccharide à blocs Chit₅₀-*b*-Dext₈₆ (Figure 11). Les amines du bloc de chitosane de ce copolymère ont également été marquées à la Rhodamine B. L'utilisation du copolymère chitosane-*b*-dextrane pour la formation de complexes avec le plasmide a pour objectif d'améliorer leur stabilité en conditions physiologiques et d'augmenter leur furtivité. En effet, le dextrane, grâce à ses propriétés hydrophiles et à sa capacité à limiter l'agrégation, joue un rôle clé dans la solubilité et la dispersion des complexes en milieu aqueux. Ici, la composition du Chit₅₀-*b*-Dext₈₆ a été choisie, peut-être à tort (?), pour ses remarquables propriétés de stabilisation des complexes.

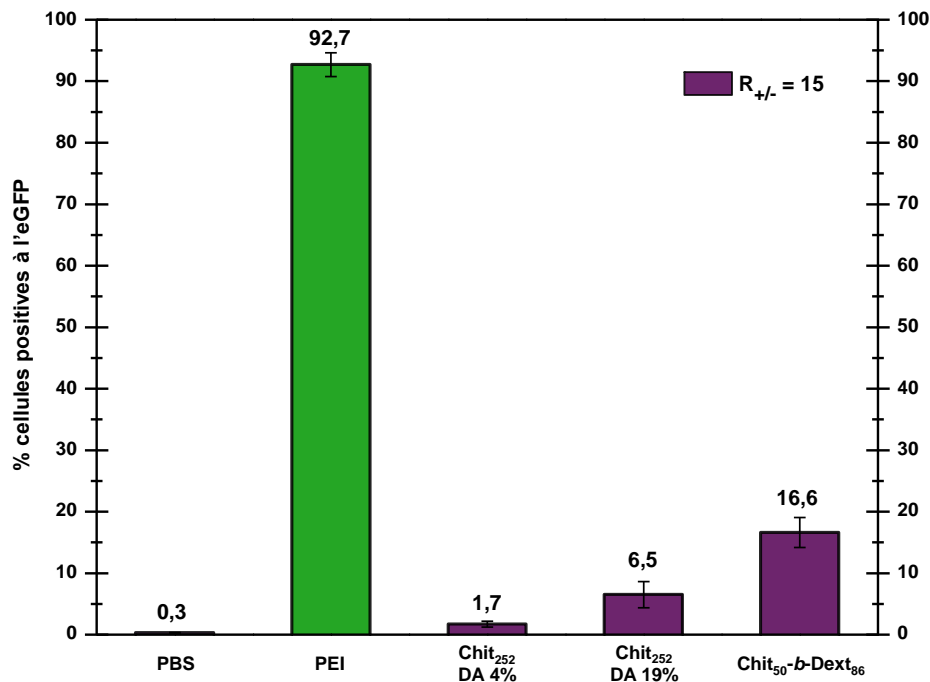


Figure 11. Efficacité de transfection des systèmes chitosane/plasmide et chitosane-*b*-dextrane/plasmide formulés à un rapport de charge de 15 déterminée par cytométrie de flux.

L'analyse des taux de transfection des complexes formés par les chitosanes de DA 4% et 19% révèle des pourcentages de cellules positives à l'eGFP identiques à ceux obtenus lors de l'essai précédent (Figure 9 et Figure 11). Cette observation semble suggérer que les résultats du troisième essai de transfection (Figure 8), qui affichent des taux dépassant 30% pour le chitosane de DA 19% à $R_{+/-} = 15$, étaient anormalement élevés ; l'efficacité de transfection réelle de ces systèmes se situant plutôt aux alentours de 7%. Cependant, un résultat notable est le taux de transfection de plus de 16% obtenu avec les complexes formés par le copolysaccharide Chit₅₀-*b*-Dext₈₆. Ce taux dépasse de manière significative ceux obtenus avec le chitosane seul, suggérant ainsi une amélioration de l'efficacité de transfection due au greffage d'un bloc dextrane à l'extrémité du chitosane.

Après avoir effectué des reconstructions 3D des cellules, des images des coupes transversales ont été acquises en activant successivement le signal de la Rhodamine B pour visualiser le chitosane puis celui de la Cyanine 5 pour détecter le plasmide. Cette approche permet de vérifier la colocalisation du plasmide avec le chitosane (Figure 12).

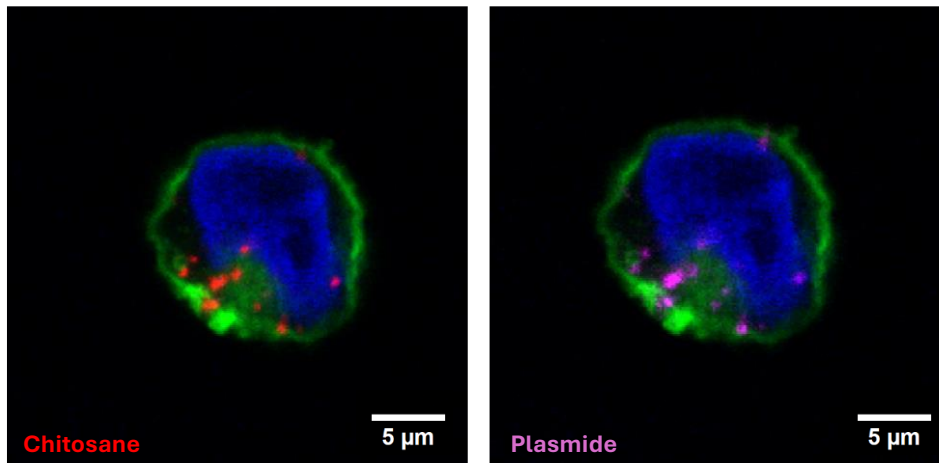
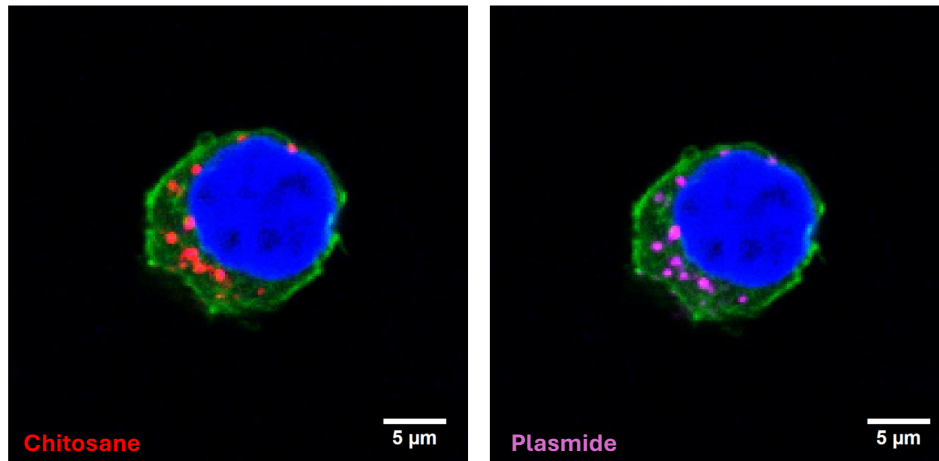
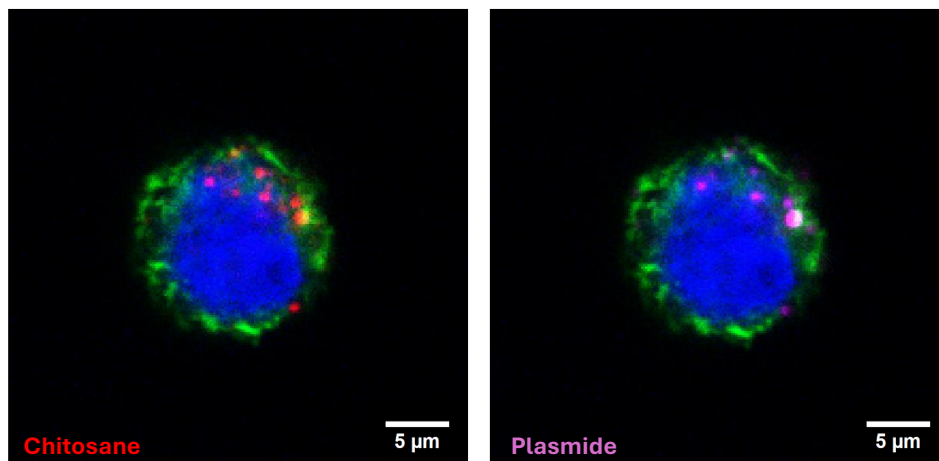
a) Chitosane DA 4% - $R_{+/-} = 15$ - 48h transfectionb) Chitosane DA 19% - $R_{+/-} = 15$ - 48h transfectionc) $\text{Chit}_{50}\text{-}b\text{-Dext}_{86}$ - $R_{+/-} = 15$ - 48h transfection

Figure 12. Reconstructions 3D obtenues par microscopie confocale de fluorescence des cellules après 48 heures de transfection, (gauche) coupe transversale montrant le signal de la Rhodamine B (chitosane), (droite) coupe transversale montrant le signal de la Cyanine 5 (plasmide). Le bleu correspond au noyau des cellules, le vert au cytosquelette. a) chitosane DA 4%, $R_{+/-} = 15$, b) chitosane DA 19%, $R_{+/-} = 15$ et c) $\text{Chit}_{50}\text{-}b\text{-Dext}_{86}$, $R_{+/-} = 15$.

La comparaison entre les zones ou points rouges, correspondant au chitosane, et les zones ou points magenta, correspondant au plasmide, confirme que le plasmide est efficacement internalisé avec le chitosane (Figure 12.a et b), indiquant donc que les complexes ne se dissocient pas avant internalisation. Cependant, malgré une internalisation efficace et la présence de plasmide à l'intérieur des cellules, l'efficacité de transfection demeure nettement inférieure à celle observée avec les systèmes à base de PEI. Les faibles taux de transfection observés pourraient alors être expliqués par la difficulté des complexes de chitosane natif à s'échapper des vésicules endosomales et lysosomales, ou encore par une dissociation inefficace des complexes au sein des cellules.

La capacité tampon du chitosane entre pH 4,5 et 5,5 a fait l'objet de nombreux débats. D'un côté, il est affirmé que le chitosane a une capacité tampon inférieure à celle de la PEI dans cette gamme de pH [7],[12]. D'un autre côté, plusieurs études soutiennent qu'en présence d'un excès de chitosane, ce dernier présente une meilleure capacité tampon que la PEI [23],[24]. Ces divergences soulignent la complexité du mécanisme d'échappement endosomal du chitosane, conduisant ainsi à l'émergence de nouvelles hypothèses. Köping-Höggård *et coll.* ont proposé la dégradation enzymatique comme mécanisme le plus probable facilitant l'échappement endosomal des complexes à base de chitosane [12]. Les oligo- et monosaccharides résultant de cette dégradation augmenteraient l'osmolarité, entraînant un afflux d'eau, un gonflement, puis la rupture des membranes endosomales. Une autre voie d'échappement endosomal possible serait par déstabilisation directe des membranes endosomales par le chitosane [25]. Le temps de circulation intracellulaire du chitosane est plus long que celui de la PEI, en partie dû à sa densité de charge plus faible et à sa capacité de perturbation membranaire réduite [10]. Ce long temps de circulation favorise le passage des complexes dans les lysosomes, compartiments cellulaires riches en enzymes hydrolytiques qui peuvent dégrader le plasmide avant qu'il n'ait pu atteindre le cytoplasme, rendant ainsi la transfection peu efficace. Dans l'hypothèse où les complexes de chitosane parviennent à s'échapper des vésicules endosomales, une dernière barrière reste à franchir : la dissociation des complexes pour permettre le relargage du plasmide. Bien que le mécanisme précis favorisant cette dissociation reste à élucider, il a été suggéré qu'une compétition avec les polyanions présents dans le cytoplasme, comme les GAGs, pourrait jouer un rôle clé dans le relargage des acides nucléiques contenus dans les complexes [14],[15]. Grinberg *et coll.* ont émis l'hypothèse qu'une part significative des acides nucléiques qui parviennent à se dissocier reste immobilisée au sein d'un réseau dense constitué de clusters de chitosane [26]. Cifani *et coll.* ont, quant à eux, démontré que, dans le cas de complexes chitosane/plasmide, le pic d'expression de l'eGFP survient après 5 jours d'incubation [27]. Le processus de dissociation des complexes à base de chitosane serait donc significativement plus lent que celui des complexes PEI/plasmide, ce qui pourrait expliquer les taux de transfection nettement inférieurs obtenus avec le chitosane après 48 heures d'incubation. Cependant, dans notre étude, il n'était pas envisageable de prolonger la durée de l'incubation, car les cellules HEK 293, étant en suspension, ne permettaient pas de changer régulièrement le milieu de culture. Or sans changements réguliers, la viabilité cellulaire aurait été compromise. Ces diverses observations et hypothèses mettent en lumière la nécessité d'explorer les mécanismes sous-jacents à l'échappement endosomal et à la dissociation des complexes pour améliorer l'efficacité de transfection des systèmes à base de chitosane.

D'autre part, il est intéressant de constater que dans le cas des complexes à base de copolysaccharide chitosane-*b*-dextrane, la colocalisation du chitosane et du plasmide n'est pas aussi marquée que dans le cas des complexes à base de chitosane pur (Figure 12.c). Cette différence est très certainement en lien avec la plus grande efficacité de transfection observée pour ces systèmes (> 16%) (Figure 11). Une colocalisation moins marquée suggère que le plasmide a pu se dissocier des complexes, processus crucial pour que l'ADN soit libéré dans le cytoplasme et conduise à l'expression de l'eGFP. L'analyse par microscopie confocale a permis d'identifier une cellule exprimant l'eGFP, comme l'indique la forte fluorescence verte visible sur la coupe transversale (Figure 13). L'intensité de fluorescence est suffisamment élevée pour atténuer les autres signaux, notamment le bleu du noyau et le rouge des complexes. Cette observation est un signe clair de l'expression réussie de l'eGFP, indiquant que le plasmide s'est efficacement dissocié des complexes et a atteint le noyau pour initier la production de la protéine fluorescente.

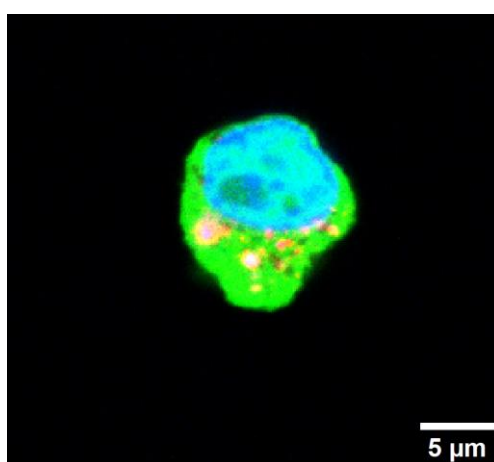


Figure 13. Coupe transversale d'une cellule exprimant l'eGFP obtenue par microscopie confocale de fluorescence après 48 heures de transfection en présence de complexes Chit₅₀-*b*-Dext₈₆/plasmide à $R_{+/-} = 15$.

Cette cinquième série de transfactions a confirmé la co-internalisation du chitosane et du plasmide, tout en mettant en évidence les avantages de l'ajout d'un bloc dextrane à l'extrémité du chitosane en termes d'efficacité de transfection. Le dextrane, en formant une couronne hydrophile autour des complexes, aide à prévenir leur agrégation, mais ce seul facteur ne suffit probablement pas à expliquer la nette différence de performance observée par rapport aux systèmes à base de chitosane natif. En effet, le bloc de chitosane complexant utilisé dans ces copolymères est cinq fois plus court que le chitosane habituellement employé pour la complexation du plasmide. D'après la littérature, les complexes formés à partir de chitosanes de faible masse molaire sont plus gros et instables, mais leur dissociation, facilitant la libération du plasmide, est favorisée en raison d'une complexation moins forte [8],[28]. Dans notre cas, l'ajout du bloc dextrane compense l'effet de la faible masse molaire du chitosane sur la stabilité colloïdale, permettant ainsi la formation de complexes bien définis tout en préservant la facilité de dissociation du plasmide. De plus, le bloc dextrane contribue probablement, de manière indirecte, à la dissociation de l'ADN en imposant une contrainte entropique significative sur le chitosane.

3.5. Influence du sens de formulation des complexes

Jusqu'à présent, les complexes ont été systématiquement préparés en ajoutant rapidement le composant en défaut dans celui en excès, c'est-à-dire le plasmide dans le chitosane. Ce sens de formulation est le sens physico-chimiquement le plus adapté, puisqu'il permet d'éviter le passage par une neutralité de charge locale, qui induirait inévitablement la précipitation de particules. Bien que certaines études optent pour ce sens d'ajout [29], il est intéressant de constater que la plupart des études biologiques optent pour la méthode de formulation inverse, où le chitosane en excès est ajouté rapidement à la solution de plasmide [8],[24],[30],[31],[32],[33]. Le protocole de formulation des complexes PEI/plasmide, utilisé comme contrôle positif dans cette étude, ne déroge pas à cette règle avec l'ajout rapide de la solution de PEI à celle de plasmide. Il a donc été décidé d'évaluer l'impact de ces deux méthodes de formulation sur l'efficacité de transfection des complexes. Pour cela, trois types de complexes ont été évalués : les complexes à base de PEI, ceux à base de chitosane de DA 19% ainsi que les complexes formés par les copolysaccharides à blocs Chit₅₀-*b*-Dext₈₆. Pour chacune de ces conditions, les complexes ont été préparés selon deux approches : la méthode A, consistant à ajouter rapidement le polymère au plasmide (méthode précédemment utilisée pour formuler les complexes PEI/plasmide), et la méthode B, qui consiste à ajouter rapidement le plasmide au polymère (méthode précédemment utilisée pour formuler les complexes chitosane/plasmide). Après 48 heures d'incubation, l'efficacité de transfection de ces systèmes a été évaluée par cytométrie de flux (Figure 14).

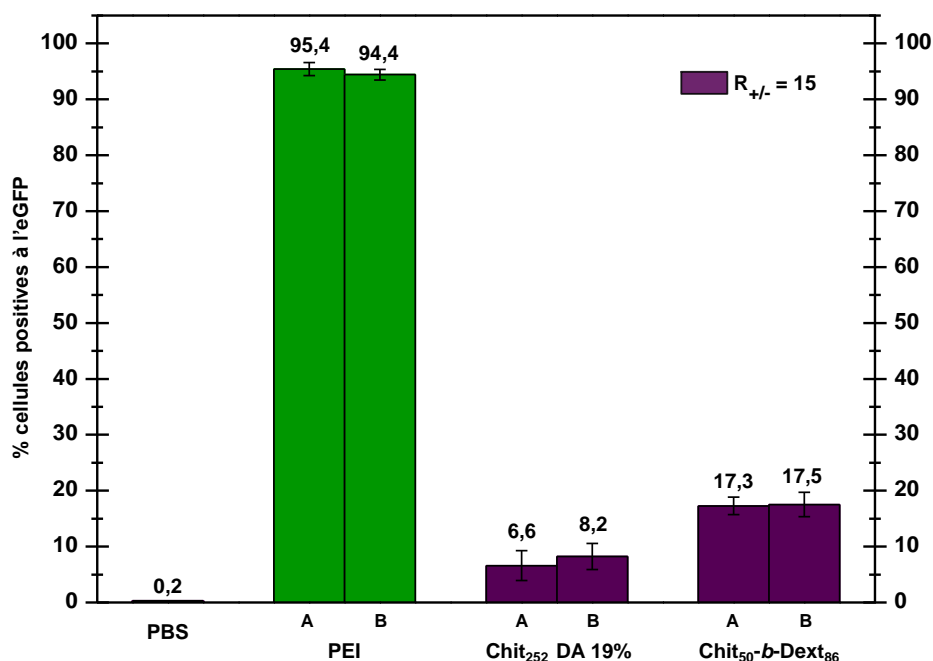


Figure 14. Efficacité de transfection des systèmes PEI/plasmide, chitosane/plasmide et chitosane-*b*-dextrane/plasmide formulés à un rapport de charge de 15 déterminée par cytométrie de flux. La méthode A correspond à l'ajout du polycation au plasmide et la méthode B le correspond à l'ajout du plasmide au polycation.

Les résultats sont sans équivoque, la méthode de formulation ne semble pas influencer significativement l'efficacité de transfection. En effet, que ce soit pour les complexes formés par la PEI, qui affichent des taux de transfection compris entre 94% et 95% peu importe la méthode de formulation, ou pour les complexes à base de chitosane et de chitosane-*b*-dextrane, les taux de transfection restent très similaires,

indépendamment du sens d'ajout (Figure 14). Cela suggère que le sens d'ajout n'a pas d'influence sur l'efficacité de transfection, probablement parce que les ajouts ont été réalisés rapidement, rendant alors l'ordre d'ajout négligeable. Bien que cet essai n'ait pas révélé de différences significatives liées à l'ordre d'ajout des composants, il a permis de confirmer l'amélioration notable des taux de transfection obtenus avec les copolysaccharides Chit₅₀-*b*-Dext₈₆ par rapport aux systèmes à base de chitosane natif. La moyenne calculée sur les trois réplicats indique un taux de transfection supérieur à 17%, contre moins de 8% pour les meilleurs systèmes à base de chitosane de DA 19%. Il apparaît clairement que le greffage d'un bloc dextrane à l'extrémité réductrice du chitosane a un impact bénéfique la transfection pour les raisons évoquées précédemment.

Jean-Paul Behr est l'un des premiers à avoir décrit l'impact de l'ordre d'ajout des composants lors de la complexation [34]. Il mentionne des taux de transfection de complexes PEI/plasmide sur des cellules 3T3 et HepG2 10 fois supérieurs lorsque la PEI est ajoutée à la solution de plasmide. Cependant, l'ordre d'ajout des composants ne semble pas être le paramètre impactant le plus l'efficacité de transfection des systèmes comme constaté précédemment (Figure 14). Dans son étude, il mentionne un autre paramètre essentiel concernant la formulation des complexes PEI/plasmide ayant démontrés les plus hauts taux de transfection : la vitesse d'ajout des composants. En effet, les complexes n'ont pas été formulés par ajout rapide de la PEI dans la solution de plasmide mais par ajout goutte à goutte. Or, l'ajout goutte à goutte, en opposition aux ajouts rapides effectués dans notre étude, conduit à la formation de structures de complexes fondamentalement différentes. Les complexes obtenus par ajout lent sont homogènes et mieux définis que ceux préparés par ajout rapide qui présentent des structures non seulement hétérogènes mais d'avantage compactes et figées [35],[36]. Toutefois, il est important de souligner que la formation de complexes par ajout goutte à goutte du composant en défaut dans celui en excès peut entraîner la formation de grosses particules en suspension susceptibles de précipiter en raison du passage inévitable par un état de neutralité de charge des complexes au cours de l'ajout [37]. La moindre compacité des complexes formés par ajout lent, par rapport à ceux obtenus par ajout rapide, permettrait une meilleure dissociation des complexes facilitant ainsi la libération du plasmide.

4. CONCLUSION

Cette étude a permis de mieux comprendre les divers paramètres influençant l'efficacité de transfection des complexes à base de chitosane. Premièrement, bien que les complexes formulés en présence de zinc aient précédemment démontré une remarquable stabilité en conditions physiologiques, ils se sont révélés peu efficaces en transfection. À l'inverse, les complexes PEI/plasmide qui présentent des taux de transfection élevés, sont particulièrement instables en conditions physiologiques, remettant donc en question la nécessité de concevoir des complexes stables d'un point de vue physicochimique pour améliorer la transfection.

Les principaux paramètres affectant l'efficacité de transfection des systèmes à base de chitosane sont le degré d'acétylation du chitosane et le rapport de charge des complexes. Il a été démontré que l'augmentation du rapport de charge entraîne une hausse significative des taux de transfection. Ainsi, les complexes présentant les meilleurs taux de transfection sur des cellules HEK 293 en suspension sont obtenus à partir de chitosane de DA 19% à un rapport de charge de 15. Cependant, malgré l'optimisation

des paramètres de formulation, seuls 8% de cellules positives à l'eGFP ont été observées ce système. Une étude plus approfondie du mécanisme d'internalisation des complexes a donc été réalisée par microscopie confocale de fluorescence afin de vérifier l'hypothèse selon laquelle les faibles taux de transfection seraient dus à une faible internalisation des complexes chitosane/plasmide. En définitive, il s'est avéré que le chitosane et le plasmide sont efficacement co-internalisés au sein des cellules excluant également la dissociation prématurée des complexes comme facteur pouvant expliquer les faibles taux de transfection. Les analyses microscopiques ont également permis de mettre en avant une concentration de complexes internalisés plus importante pour les rapports de charge élevés. Un rapport de charge élevé permet non seulement de mieux protéger les acides nucléiques contre la dégradation enzymatique, mais aussi d'améliorer leur interaction avec les membranes cellulaires, favorisant ainsi une internalisation plus efficace et par conséquent un meilleur taux de transfection.

L'utilisation de copolymères à blocs chitosane-*b*-dextrane pour la complexation avec le plasmide a permis de démontrer que le greffage d'un bloc de dextrane à l'extrémité du chitosane améliore significativement l'efficacité de la transfection des complexes. En effet, les complexes copolymères/plasmide présentent des taux de transfection nettement supérieurs, avec plus de 17% de cellules exprimant l'eGFP, contre moins de 8% pour le chitosane non modifié. Le dextrane, en formant une couronne hydrophile autour des complexes, permet de réduire leur agrégation, ce qui renforce leur stabilité en conditions physiologiques et donc leur internalisation. Par ailleurs, l'amélioration de la transfection pourrait être attribuée à une dissociation plus efficace des complexes chitosane-*b*-dextrane/plasmide, favorisée par la cohésion réduite de ces complexes, en raison de la faible masse molaire du bloc chitosane complexant et de la contrainte stérique imposée par le bloc dextrane.

Cependant, malgré une internalisation efficace et l'amélioration apportée par l'ajout d'un bloc dextrane, les complexes à base de chitosane présentent une efficacité de transfection nettement inférieure à celle des complexes formés par la PEI. Les faibles taux de transfection observés pourraient alors s'expliquer par la difficulté des complexes de chitosane à s'échapper des vésicules endosomales et lysosomales, ou encore par une dissociation inefficace des complexes au sein des cellules. L'amélioration de la dissociation des complexes apparaît comme un aspect crucial à optimiser pour obtenir une meilleure efficacité de transfection. Il a été démontré que l'ordre d'ajout des composants lors de la complexation n'est pas le paramètre principal pour contrôler et améliorer l'efficacité des complexes. Il semblerait cependant que la vitesse d'ajout des composants pourrait influencer la stabilité des complexes et donc leur dissociation en conditions biologiques. La formation de complexes par ajout rapide favoriserait des structures compactes et figées, contrairement à celles obtenues par ajout lent. Ces dernières seraient alors plus facilement dissociables, facilitant ainsi la libération du plasmide dans le cytoplasme.

En conclusion, cette étude met en évidence l'importance cruciale d'une compréhension approfondie des mécanismes intracellulaires. Le suivi du trafic intracellulaire des complexes à base de chitosane permettrait d'identifier les obstacles limitant leur efficacité de transfection, permettant ainsi une optimisation ciblée de leur formulation. Ce travail ouvre la voie à de futures recherches visant à améliorer les performances de vecteurs non viraux dérivés du chitosane.

REFERENCES

- [1] J. Desbrières, « Chitine et chitosane ».
- [2] H. Sashiwa, H. Saimoto, Y. Shigemasa, R. Ogawa, et S. Tokura, « Lysozyme susceptibility of partially deacetylated chitin », *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 12, n° 5, p. 295-296, oct. 1990, doi: 10.1016/0141-8130(90)90016-4.
- [3] K. Y. Lee, W. S. Ha, et W. H. Park, « Blood compatibility and biodegradability of partially N-acylated chitosan derivatives », *Biomaterials*, vol. 16, n° 16, p. 1211-1216, janv. 1995, doi: 10.1016/0142-9612(95)98126-Y.
- [4] H. Y. Nam, J. H. Park, K. Kim, I. C. Kwon, et S. Y. Jeong, « Lipid-based emulsion system as non-viral gene carriers », *Arch. Pharm. Res.*, vol. 32, n° 5, p. 639-646, mai 2009, doi: 10.1007/s12272-009-1500-y.
- [5] S. Mao, O. Germershaus, D. Fischer, T. Linn, R. Schnepf, et T. Kissel, « Uptake and Transport of PEG-Graft-Trimethyl-Chitosan Copolymer–Insulin Nanocomplexes by Epithelial Cells », *Pharm Res*, vol. 22, n° 12, p. 2058-2068, déc. 2005, doi: 10.1007/s11095-005-8175-y.
- [6] B. Dos Santos Rodrigues, S. Lakkadwala, D. Sharma, et J. Singh, « Chitosan for gene, DNA vaccines, and drug delivery », in *Materials for Biomedical Engineering*, Elsevier, 2019, p. 515-550. doi: 10.1016/B978-0-12-818433-2.00015-7.
- [7] H.-Q. Mao *et al.*, « Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency », *Journal of Controlled Release*, vol. 70, n° 3, p. 399-421, févr. 2001, doi: 10.1016/S0168-3659(00)00361-8.
- [8] M. Lavertu, S. Méthot, N. Tran-Khanh, et M. D. Buschmann, « High efficiency gene transfer using chitosan/DNA nanoparticles with specific combinations of molecular weight and degree of deacetylation », *Biomaterials*, vol. 27, n° 27, p. 4815-4824, sept. 2006, doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.04.029.
- [9] S. P. Strand, S. Danielsen, B. E. Christensen, et K. M. Vårum, « Influence of Chitosan Structure on the Formation and Stability of DNA–Chitosan Polyelectrolyte Complexes », *Biomacromolecules*, vol. 6, n° 6, p. 3357-3366, nov. 2005, doi: 10.1021/bm0503726.
- [10] M. D. Buschmann, A. Merzouki, M. Lavertu, M. Thibault, M. Jean, et V. Darras, « Chitosans for delivery of nucleic acids », *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 65, n° 9, p. 1234-1270, août 2013, doi: 10.1016/j.addr.2013.07.005.
- [11] Z.-T. Li *et al.*, « Chitosan-graft-polyethylenimine with improved properties as a potential gene vector », *Carbohydrate Polymers*, vol. 80, n° 1, p. 254-259, mars 2010, doi: 10.1016/j.carbpol.2009.11.021.
- [12] M. Köping-Höggård *et al.*, « Chitosan as a nonviral gene delivery system. Structure–property relationships and characteristics compared with polyethylenimine in vitro and after lung administration in vivo », *Gene Ther*, vol. 8, n° 14, p. 1108-1121, juill. 2001, doi: 10.1038/sj.gt.3301492.
- [13] A. S. Kritchenkov, S. Andranovitš, et Y. A. Skorik, « Chitosan and its derivatives: vectors in gene therapy », *Russ. Chem. Rev.*, vol. 86, n° 3, p. 231-239, mars 2017, doi: 10.1070/RCR4636.
- [14] F. Labat-Moleur *et al.*, « An electron microscopy study into the mechanism of gene transfer with lipopolyamines », *Gene Therapy*, vol. 3 11, p. 1010-7, 1996.
- [15] P. L. Ma, M. Lavertu, F. M. Winnik, et M. D. Buschmann, « Stability and binding affinity of DNA/chitosan complexes by polyanion competition », *Carbohydrate Polymers*, vol. 176, p. 167-176, nov. 2017, doi: 10.1016/j.carbpol.2017.08.002.
- [16] M. Thibault *et al.*, « Excess polycation mediates efficient chitosan-based gene transfer by promoting lysosomal release of the polyplexes », *Biomaterials*, vol. 32, n° 20, p. 4639-4646, juill. 2011, doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.03.010.
- [17] S. Nimesh, M. M. Thibault, M. Lavertu, et M. D. Buschmann, « Enhanced Gene Delivery Mediated by Low Molecular Weight Chitosan/DNA Complexes: Effect of pH and Serum », *Mol Biotechnol*, vol. 46, n° 2, p. 182-196, oct. 2010, doi: 10.1007/s12033-010-9286-1.
- [18] L. M. Bravo-Anaya *et al.*, « Coupling of RAFT polymerization and chemoselective post-modifications of elastin-like polypeptides for the synthesis of gene delivery hybrid vectors », *Polym. Chem.*, vol. 12, n° 2, p. 226-241, 2021, doi: 10.1039/D0PY01293A.
- [19] H. Bao, L. Li, W. C. Leong, et L. H. Gan, « Thermo-Responsive Association of Chitosan- graft -Poly(N -isopropylacrylamide) in Aqueous Solutions », *J. Phys. Chem. B*, vol. 114, n° 32, p. 10666-10673, août 2010, doi: 10.1021/jp105041z.
- [20] C. Ehrhardt *et al.*, « Polyethylenimine, a cost-effective transfection reagent », *Signal Transduction*, vol. 6, n° 3, p. 179-184, juin 2006, doi: 10.1002/sita.200500073.
- [21] D. L. Hacker, D. Kiseljak, Y. Rajendra, S. Thurnheer, L. Baldi, et F. M. Wurm, « Polyethyleneimine-based transient gene expression processes for suspension-adapted HEK-293E and CHO-DG44 cells », *Protein Expression and Purification*, vol. 92, n° 1, p. 67-76, nov. 2013, doi: 10.1016/j.pep.2013.09.001.

- [22] D. Costa, A. J. M. Valente, J. A. Queiroz, et Â. Sousa, « Finding the ideal polyethylenimine-plasmid DNA system for co-delivery of payloads in cancer therapy », *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 170, p. 627-636, oct. 2018, doi: 10.1016/j.colsurfb.2018.06.063.
- [23] I. Richard, M. Thibault, G. De Crescenzo, M. D. Buschmann, et M. Lavertu, « Ionization Behavior of Chitosan and Chitosan–DNA Polyplexes Indicate That Chitosan Has a Similar Capability to Induce a Proton-Sponge Effect as PEI », *Biomacromolecules*, vol. 14, n° 6, p. 1732-1740, juin 2013, doi: 10.1021/bm4000713.
- [24] L. M. Bravo-Anaya, K. G. Fernández-Solís, J. Rosselgong, J. L. E. Nano-Rodríguez, F. Carvajal, et M. Rinaudo, « Chitosan–DNA polyelectrolyte complex: Influence of chitosan characteristics and mechanism of complex formation », *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 126, p. 1037-1049, avr. 2019, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.01.008.
- [25] K. Bowman et K. W. Leong, « Chitosan nanoparticles for oral drug and gene delivery », *Int J Nanomedicine*, vol. 1, n° 2, p. 117-128, juin 2006.
- [26] V. Y. Grinberg *et al.*, « Chitosan polyplexes: Energetics of formation and conformational changes in DNA upon binding and release », *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 250, p. 126265, oct. 2023, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.126265.
- [27] N. Cifani *et al.*, « Improved stability and efficacy of chitosan/pDNA complexes for gene delivery », *Biotechnol Lett*, vol. 37, n° 3, p. 557-565, mars 2015, doi: 10.1007/s10529-014-1727-7.
- [28] W. Liu *et al.*, « An investigation on the physicochemical properties of chitosan/DNA polyelectrolyte complexes », *Biomaterials*, vol. 26, n° 15, p. 2705-2711, mai 2005, doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.07.038.
- [29] E. A. Klausner, Z. Zhang, R. L. Chapman, R. F. Multack, et M. V. Volin, « Ultrapure chitosan oligomers as carriers for corneal gene transfer », *Biomaterials*, vol. 31, n° 7, p. 1814-1820, mars 2010, doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.10.031.
- [30] J. Malmo, H. Sørsgård, K. M. Vårum, et S. P. Strand, « siRNA delivery with chitosan nanoparticles: Molecular properties favoring efficient gene silencing », *Journal of Controlled Release*, vol. 158, n° 2, p. 261-268, mars 2012, doi: 10.1016/j.jconrel.2011.11.012.
- [31] F. C. MacLaughlin *et al.*, « Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery », *Journal of Controlled Release*, vol. 56, n° 1-3, p. 259-272, déc. 1998, doi: 10.1016/S0168-3659(98)00097-2.
- [32] M. Jean *et al.*, « Chitosan-based therapeutic nanoparticles for combination gene therapy and gene silencing of in vitro cell lines relevant to type 2 diabetes », *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 45, n° 1-2, p. 138-149, janv. 2012, doi: 10.1016/j.ejps.2011.10.029.
- [33] J. L. E. Nando Rodríguez, E. B. Figueroa Ochoa, M. Renteria Urquiza, et L. M. Bravo-Anaya, « Colloidal Stability of Chitosan/DNA Polyelectrolyte Complexes in Presence of Biological Polyanions », *Macromolecular Symposia*, vol. 413, n° 4, p. 2400112, août 2024, doi: 10.1002/masy.202400112.
- [34] O. Boussif *et al.*, « A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. », *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 92, n° 16, p. 7297-7301, août 1995, doi: 10.1073/pnas.92.16.7297.
- [35] M. Haddou, « Complexes de polyélectrolytes: Morphologies, cinétique et thermodynamique d'assemblage », Université de Bordeaux, 2019.
- [36] F. Cousin, J. Gummel, D. Ung, et F. Boué, « Polyelectrolyte–Protein Complexes: Structure and Conformation of Each Specie Revealed by SANS », *Langmuir*, vol. 21, n° 21, p. 9675-9688, oct. 2005, doi: 10.1021/la0510174.
- [37] M. Müller, B. Keßler, J. Fröhlich, S. Poeschla, et B. Torger, « Polyelectrolyte Complex Nanoparticles of Poly(ethyleneimine) and Poly(acrylic acid): Preparation and Applications », *Polymers*, vol. 3, n° 2, p. 762-778, avr. 2011, doi: 10.3390/polym3020762.

Conclusion générale et perspectives

L'objectif de cette thèse était d'évaluer deux stratégies permettant de stabiliser les complexes formés entre le chitosane et l'ADN. En effet, à pH physiologique, le faible degré de protonation du chitosane conduit à l'agrégation et à la précipitation des complexes qu'il forme. Bien que plusieurs améliorations et modifications chimiques aient été proposées pour pallier la faible solubilité du chitosane dans ces conditions et accroître son efficacité biologique, la plupart de ces modifications compromettent son intégrité et ses capacités de complexation. Ce travail s'est concentré sur deux nouvelles approches : le greffage d'un bloc de dextrane à l'extrémité réductrice du chitosane, et l'ajout d'ions zinc pour renforcer la cohésion des complexes chitosane/ADN. Ces deux stratégies ont permis d'améliorer significativement la stabilité des complexes à pH 7,4 et 37°C sans altérer les propriétés intrinsèques du chitosane.

La première partie de ce travail consistait à mettre au point une méthode robuste de synthèse de copolysaccharides à blocs linéaires chitosane-*b*-dextrane. L'approche choisie repose sur le couplage des extrémités réductrices des deux polysaccharides par l'intermédiaire de diamines hautement réactives. Cette stratégie permet de surmonter plusieurs obstacles, notamment la faible réactivité des extrémités réductrices des polysaccharides et la faible solubilité du chitosane. Il a été démontré que les dihydrazides (ADH) et les dioxyamines (PDHA) sont particulièrement efficaces pour le couplage de polysaccharides, grâce à leur forte nucléophilie (effet α) associée à une faible basicité, ce qui permet de réaliser la réaction en conditions acides nécessaires à la solubilisation du chitosane. Parmi ces deux diamines, le PDHA a été préféré à l'ADH, en raison de la stabilité remarquable des liaisons oxime qu'il forme, permettant de s'affranchir de l'étape de réduction et de réaliser le couplage en conditions non réductrices. Ces travaux ont permis d'établir une méthode générale de synthèse de copolysaccharides à blocs linéaires, qui consiste à coupler le polysaccharide dont l'extrémité réductrice est la plus réactive au second bloc de polysaccharide, préalablement fonctionnalisé à son extrémité par du PDHA. Dans notre étude, le chitosane a été couplé au dextrane-PDHA, en conditions réductrices ou non-réductrices. Les copolysaccharides chitosane-*b*-dextrane ainsi obtenus présentent une solubilité nettement améliorée à pH physiologique par rapport au chitosane seul, ce qui constitue une avancée prometteuse pour différentes applications biologiques.

La seconde partie de cette thèse avait pour objectif d'améliorer la stabilité colloïdale des complexes chitosane/ADN en conditions physiologiques. Deux approches distinctes ont permis d'atteindre cet objectif : i) une approche physicochimique en utilisant des chitosanes fortement acétylés (DA > 40%) associée à l'ajout d'ions zinc dans les complexes chitosane/ADN et ii) une approche chimique en utilisant les copolysaccharides à blocs linéaires chitosane-*b*-dextrane précédemment synthétisés. Le zinc, en formant des liaisons de coordination avec les amines du chitosane et avec les bases de l'ADN, contribue à maintenir la cohésion des complexes, tandis que le greffage d'un bloc de dextrane à l'extrémité du chitosane permet de contribuer à réduire l'agrégation et assurer la stabilité des complexes en conditions physiologiques. Des complexes stables en tampon à 154 mM et pH 7,4 pendant plus de 6 jours à 37°C ont ainsi pu être obtenus. Cependant, malgré leur potentiel stabilisant respectif, aucune synergie entre

ces deux approches de stabilisation des complexes n'a été observée, ce qui souligne la nécessité d'étudier plus en détail les interactions spécifiques entre le zinc, le chitosane et l'ADN.

La dernière phase de ce travail était dédiée à l'évaluation biologique *in vitro* de ces deux approches à travers des tests de transfection du plasmide eGFP sur des cellules HEK 293 en suspension. Bien que les complexes formulés avec du zinc aient démontré une stabilité remarquable, cette caractéristique ne s'est pas traduite par une amélioration de l'efficacité de transfection. En effet, une trop grande stabilité des complexes semble entraver leur dissociation une fois internalisés. Parmi les formulations testées, les complexes chitosane/plasmide les plus performants ont été obtenus avec un chitosane de DA 19% et un rapport de charge $R_{+/-}$ de 15. Le rapport de charge constitue un paramètre clé pour optimiser l'efficacité de transfection, un excès de chitosane favorisant une meilleure internalisation des complexes par déstabilisation des membranes cellulaires. Bien que l'expression de l'eGFP soit toujours nettement inférieure à celle obtenue avec un agent de transfection commercial tel que la PEI, l'incorporation d'un bloc de dextrane a considérablement amélioré les taux de transfection par rapport au chitosane natif. Le suivi de la transfection par microscopie confocale de fluorescence a démontré une internalisation efficace des complexes au sein des cellules, ce qui suggère que la faible efficacité de transfection serait liée à un échappement endosomal insuffisant ou à une faible dissociation des complexes dans le cytoplasme. Ces résultats soulèvent des questions quant à la conception de systèmes de vectorisation à base de chitosane, qui doivent non seulement prévenir l'agrégation en conditions physiologiques, mais aussi assurer une dissociation rapide et efficace dans le cytoplasme afin de libérer le matériel génétique.

Ces travaux ouvrent la voie à de nombreuses perspectives. Bien que certaines optimisations des conditions de synthèse des copolysaccharides chitosane-*b*-dextrane soient encore envisageables comme le pH, le temps de réaction ou encore la méthode de purification, la méthode de couplage proposée est robuste. La principale perspective serait donc d'appliquer cette approche à d'autres blocs polysaccharides de longueurs variables. Un copolymère particulièrement intéressant serait le chitosane-*b*- β -1,3-glucane. Ce dernier offrirait l'avantage de conserver les propriétés de complexation du chitosane avec les acides nucléiques, tout en combinant les caractéristiques uniques du β -1,3-glucane. Ce polysaccharide, exclusivement composé d'unités D-glucose liées par des liaisons β , permet de cibler spécifiquement le récepteur Dectine-1, présent sur les cellules de Langerhans, un type de cellules dendritiques localisées principalement dans l'épiderme, la couche superficielle de la peau.

Concernant l'aspect physicochimique de ce projet, la principale perspective serait d'approfondir la compréhension des interactions entre le zinc et l'ADN, ainsi que des mécanismes permettant la stabilisation des complexes formés entre le chitosane, le zinc et l'ADN. Pour cela, l'utilisation de la RMN du proton sur de l'ADN ou des oligonucléotides, en présence et en absence de zinc, permettrait de déterminer plus précisément la nature des interactions. Le zinc interagit-il préférentiellement avec les bases azotées via des liaisons de coordination ou avec les groupes phosphate de l'ADN par interactions électrostatiques ? Dans un second temps, il serait intéressant de caractériser la structure des complexes par microscopie à force atomique (AFM) ou cryo-TEM. Une comparaison structurale des complexes obtenus à partir de chitosane et de copolysaccharides chitosane-*b*-dextrane serait également pertinente. Par ailleurs, les propriétés stabilisantes des copolymères pourraient être encore améliorées en utilisant des plus longs blocs de dextrane afin de se rapprocher de la structure de micelles de type PIC. Enfin,

l'influence du degré d'acétylation du bloc chitosane dans les copolysaccharides pourrait constituer un autre levier pour améliorer la stabilité des complexes formés avec l'ADN.

Les premiers tests de transfection et le suivi par microscopie confocale de fluorescence ont permis d'identifier les causes probables de la faible efficacité de transfection des systèmes chitosane/ADN et chitosane-*b*-dextrane/ADN en comparaison aux systèmes PEI/plasmide. Cependant, plusieurs pistes restent à explorer pour obtenir une compréhension globale de ces systèmes. Tout d'abord, un suivi du trafic intracellulaire des complexes pourrait être réalisé à l'aide de marqueurs endosomaux fluorescents, accompagné du suivi de la dissociation des complexes par mesure FRET. Cette approche permettrait de déterminer si le principal obstacle serait l'échappement endosomal des complexes ou leur dissociation dans le cytoplasme. Une autre perspective consisterait à formuler les complexes en ajoutant goutte à goutte le composant en excès (chitosane) dans celui en défaut (plasmide), dans le but d'obtenir des structures moins denses et donc plus facilement dissociables en conditions physiologiques. Un premier test de dissociation pourrait être effectué en testant la résistance des complexes à la dissociation en présence d'héparine ou de SDS. Parallèlement, l'imagerie AFM permettrait de visualiser des différences de structure en fonction des conditions de formulation des complexes (ordre d'ajout, vitesse d'ajout, concentrations...). Finalement, si la limitation principale est la faible dissociation des complexes, l'ajout de polyanion tel que le dextrane sulfate comme agent de co-complexation pourrait être envisagé.

Annexes

CHAPITRE 2 - Synthèse de copolysaccharides à blocs linéaires chitosane-*b*-dextrane

S1. Caractérisation du chitosane initial

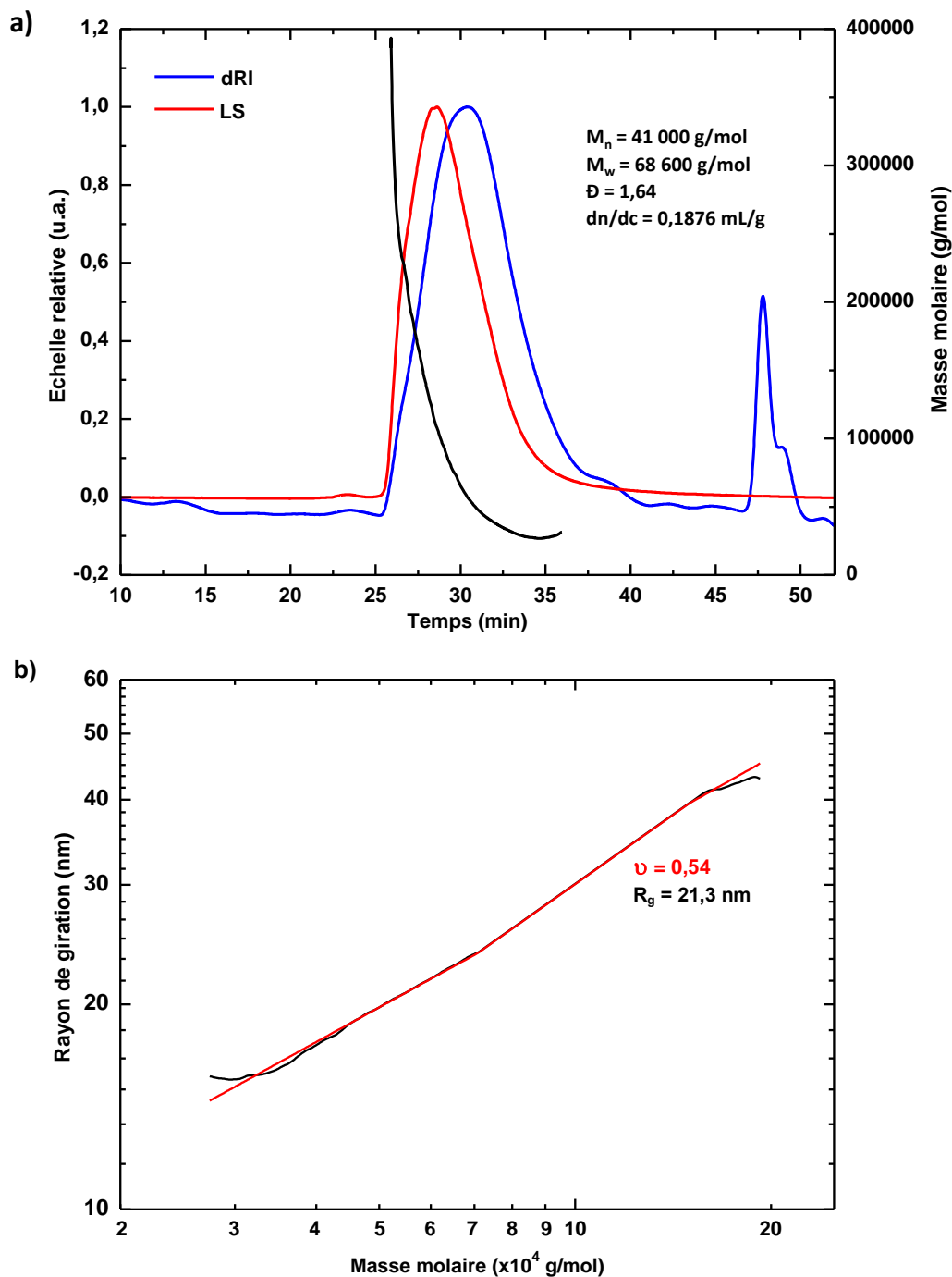


Figure S1. a) Analyse SEC-MALS du chitosane initial en tampon acétate (0,2 M AcOH/0,15 M AcONa, pH 4,5) par diffusion de lumière multi-angles (rouge) et par réfractométrie différentielle (bleu). La variation de la masse molaire absolue est également représentée (noir). b) Variation du rayon de giration (R_g) en fonction de la masse molaire obtenue à partir du logiciel Astra.

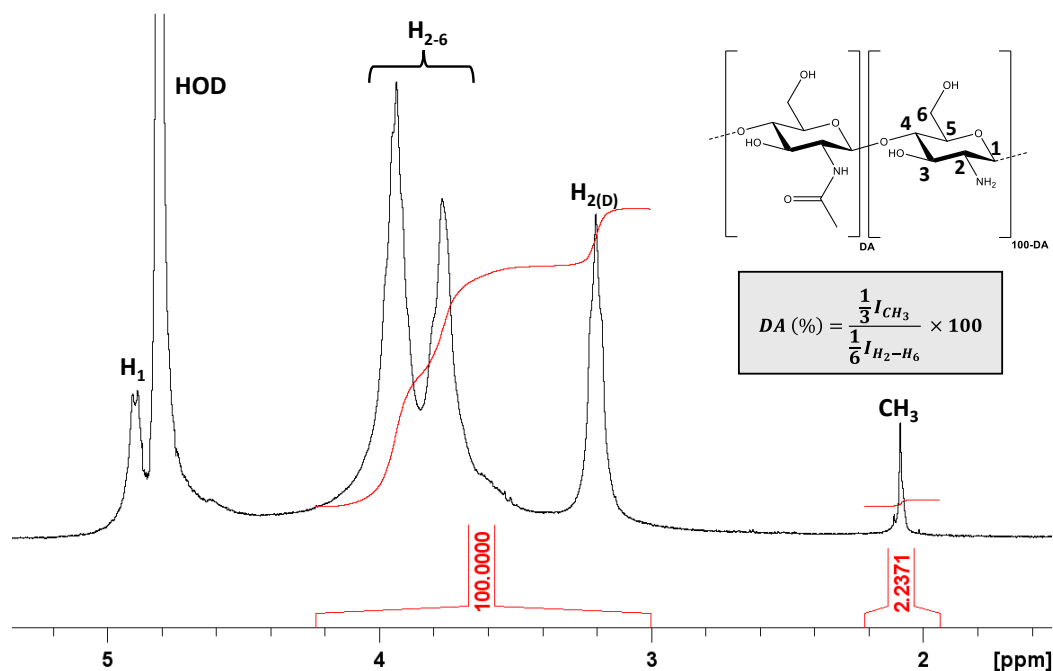


Figure S2. Analyse RMN ^1H du chitosane initial de chez Stellar Biosol (batch 144/090605) à 10 g/L dans le D_2O + DCl (pH = 4). Le degré d'acétylation a été déterminé grâce à la formule de Hirai [1].

S2. Propriétés UV-vis du chitosane-M

L'analyse par spectroscopie UV-vis des chitosanes de différents DP obtenus par dépolymérisation du chitosane initial (41 kg/mol) par action du nitrite de sodium a permis de démontrer leur activité dans le domaine UV. Les propriétés UV-vis des chitosanes n'étant que très peu voire pas répertoriées dans la littérature, une étude plus approfondie a été menée afin de mieux en comprendre l'origine. Le chitosane initial ainsi que plusieurs chitosanes de différents DP ont donc été analysés par spectroscopie UV-vis (Figure S3).

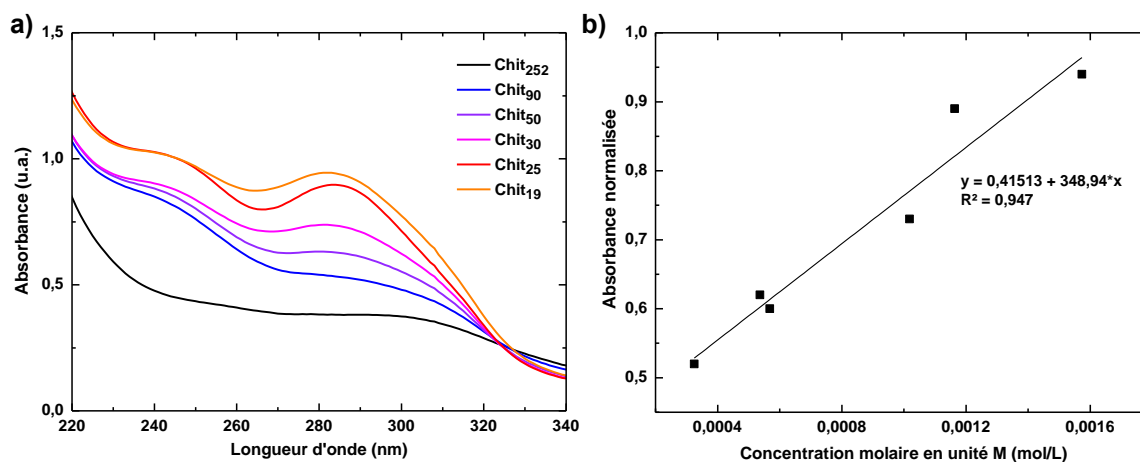


Figure S3. a) Spectres UV des chitosanes à différents DP. b) Représentation de l'absorbance en fonction de la concentration molaire en unité M.

L'importance significative de l'unité M dans les propriétés UV des chitosanes a été mise en évidence. En effet, le chitosane initial, bien que présentant un épaulement aux alentours des 300 nm, n'absorbe que faiblement. *A contrario*, les chitosanes-M dépolymérisés présentent tous un maximum d'absorbance à

285 nm qui augmente plus le degré de polymérisation diminue (Figure S3.a). A concentration massique en chitosane fixée, plus le DP est faible plus la concentration molaire en unité M dans le milieu est importante. La représentation graphique de l'absorbance en fonction de la concentration molaire en unité M (Figure S3.b) démontre l'existence d'une relation linéaire entre ces deux grandeurs.

S3. Optimisation des conditions de fonctionnalisation des polysaccharides

Les paramètres expérimentaux de fonctionnalisation du chitosane et du dextrane avec l'ADH ont été optimisés avant d'être transposés à la fonctionnalisation avec du PDHA.

Fonctionnalisation du dextrane. La fonctionnalisation terminale du dextrane avec l'ADH ayant déjà été étudiée [2], certains paramètres comme le pH de réaction ainsi que la concentration en dextrane n'ont pas été investigués. Toutes les réactions ont été effectuées en tampon acétate à pH 4 à une concentration initiale en dextrane de 60 g/L. Le nombre d'équivalents du cyanoborohydrure de sodium (NaBH_3CN) a été fixé à 10 équivalents par rapport au dextrane.

Les premières expériences ont été menées en conditions non réductrices en faisant varier le nombre d'équivalents d'ADH, le temps de réaction ainsi que la température (Tableau S1). En fin de réaction, l'excès d'ADH ainsi que les sels ont été enlevés par élution sur des colonnes Sephadex G-25 puis les solutions recueillies ont été précipitées dans un large excès d'éthanol technique avant d'être séchées sous vide pendant 2h. Les produits ont été analysés par RMN ^1H dans le D_2O afin de déterminer les taux de conversion des réactions par intégration des protons de l'ADH.

Tableau S1. Conditions expérimentales et résultats des réactions de fonctionnalisation du dextrane par l'ADH en conditions non réductrices.

Dextrane	ADH	Temps de réaction	Température	Taux de conversion ^a
DP 41	10 eq.	24h	25°C	68%
			50°C	58%
		48h	25°C	75%
			50°C	64%
	20 eq.	24h	25°C	82%
			50°C	80%
		48h	25°C	83%
			50°C	83%

^a Valeurs obtenues par RMN (incertitude $\pm 5\%$)

Les taux de conversion sont nettement plus élevés en présence de 20 équivalents d'ADH. Outre le fait d'augmenter le taux de conversion, un nombre d'équivalents d'ADH élevé permet de limiter le phénomène de dimérisation (Tableau S4). En présence de 20 équivalents d'ADH, les taux de conversion après 24 heures et 48 heures de réaction étant très proches, un temps de réaction de 24 heures est donc préféré. La température ne semblant pas avoir un réel impact sur les taux de conversion, elle est donc fixée à 25°C, soit à température ambiante.

Ces expériences ont été répétées dans les mêmes conditions avec ajout de 10 équivalents d'agent réducteur en fin de réaction. Après 12 heures de réduction, les composés ont été purifiés et analysés par RMN (Tableau S2).

Tableau S2. Conditions expérimentales et résultats des réactions de fonctionnalisation du dextrane par l'ADH après réduction.

Dextrane	ADH	Temps de réaction	Température	NaBH ₃ CN	Taux de conversion ^a
DP 41	10 eq.	24h	25°C	10 eq.	90%
			50°C		92%
		48h	25°C		95%
			50°C		90%
	20 eq.	24h	25°C		97%
			50°C		94%
		48h	25°C		91%
			50°C		100%

^a Valeurs obtenues par RMN (incertitude $\pm 5\%$)

Les taux de conversion obtenus après réduction ont confirmé les paramètres précédemment définis en conditions non réductrices. A noter qu'en présence de NaBH₃CN, une température de 25°C est recommandée. En effet, une température plus élevée induirait une dégradation plus rapide de l'agent réducteur ; il faudrait donc en engager une plus grande quantité afin de pallier sa dégradation.

Les réactions de fonctionnalisation du dextrane avec l'ADH et par extension avec le PDHA seront réalisées en tampon acétate à pH 4, à une concentration en dextrane de 60 g/L, en présence de 20 équivalents d'ADH/PDHA, pendant 24 heures à température ambiante avant réduction. A noter que dans le cas du PDHA, 2 x 10 équivalents de NaBH₃CN sont nécessaires contre seulement 10 équivalents avec l'ADH.

Fonctionnalisation du chitosane. La fonctionnalisation du chitosane avec l'ADH ayant également été étudiée précédemment [2] et certains paramètres comme le temps de réaction et la température déjà optimisés avec le dextrane, seule l'influence du pH de réaction a été investiguée (Tableau S3). Toutes les réactions ont été effectuées dans l'eau en présence de 20 équivalents d'ADH pendant 24 heures à température ambiante puis réduites avec 10 équivalents de NaBH₃CN. Pour des raisons de viscosité, la concentration en chitosane a été fixée à 20 g/L. En fin de la réaction, l'excès d'ADH a été éliminé par précipitation en conditions basiques, en ajoutant de la soude au milieu réactionnel. Ensuite, plusieurs cycles de lavage à l'eau et centrifugation ont été réalisés jusqu'à ce que le pH du surnageant soit neutre, puis le produit a été lyophilisé. Les conjugués ont été analysés par RMN ¹H dans le D₂O afin de déterminer les taux de conversion des réactions par intégration des protons de l'ADH.

Tableau S3. Conditions expérimentales et résultats des réactions de fonctionnalisation du chitosane par l'ADH après réduction.

Chitosane	ADH	pH	Taux de conversion hydrazones ^a	NaBH ₃ CN	Taux de conversion après réduction ^a
DP 25	20 eq.	4,0	97%	10 eq.	98%
		5,0	92%		92%

^a Valeurs obtenues par RMN (incertitude $\pm 5\%$)

Les taux de conversion du chitosane-ADH sont plus élevés à pH 4 qu'à pH 5, que ce soit avant ou après réduction. Ainsi, le pH de fonctionnalisation du chitosane avec l'ADH, et par extension avec le PDHA, est fixé à 4. De manière similaire au dextrane, 3 x 10 équivalents de NaBH₃CN sont nécessaires pour réduire les conjugués formés avec le PDHA, contre seulement 10 équivalents avec l'ADH.

S4. Calculs statistiques de dimérisation

Des calculs statistiques ont été effectués afin de déterminer le pourcentage de dimères obtenus en fonction du nombre d'équivalents de diamine engagé [3]. Ces calculs supposent que les deux unités terminales des diamines ont les mêmes réactivités.

[PS]₀: Concentration molaire initiale en polysaccharide (PS)

[D]₀: Concentration molaire initiale en diamine (D)

[-NH₂]₀: Concentration molaire initiale en amine terminale

a étant défini comme l'excès molaire initial de diamine par rapport au chitosane, il en résulte que $[D]_0 = a[PS]_0$.

Cependant, comme chaque amine terminale de la diamine est considérée séparément de la deuxième :

$$[-NH_2]_0 = 2[D]_0 = 2a[PS]_0.$$

b étant défini comme la fraction de PS qui a été substituée, il en résulte que $b[PS]_0$ correspond donc à la concentration molaire de PS substitué qui est nécessairement égale à la concentration molaire en amines substituées (p). Donc $p = b[PS]_0/2a[PS]_0 = b/2a$.

Ainsi, p est une simple fonction du rendement de la réaction (b) et de l'excès molaire initial de diamine (a). Les probabilités de monosubstitution, disubstitution et de non-substitution des diamines sont obtenues par les relations suivantes :

Probabilité de disubstitution : (f_{DS}) : p^2

Probabilité de non-substitution : (f_{NS}) : $(1 - p)^2$

Probabilité de monosubstitution : (f_{MS}) : $1 - p^2 - (1 - p)^2 = 2p(1-p)$

En supposant un rendement de conversion total de l'extrémité réductrice du polysaccharide ($b=1$), la fraction de conjugué doublement substitué (f_{DS}), non substitué (f_{NS}) et mono-substitué (f_{MS}) est donnée

pour différentes quantités de diamine (a) (Tableau S4). La fraction effective de blocs de polysaccharides dimérisés correspond alors à $f_{DS}/(f_{DS} + f_{MS})$.

Tableau S4. Probabilités de substitution d'un polysaccharide par une diamine et fractions correspondantes de polysaccharides dimérisés.

Paramètres expérimentaux	PS + 0.5eq. D	PS + 1eq. D	PS + 2eq. D	PS + 3eq. D	PS + 10eq. D	PS + 20eq. D	PS + 50eq. D
a	0,5	1	2	3	10	20	50
b	1	1	1	1	1	1	1
p	1	0,50	0,25	0,17	0,050	0,025	0,010
f_{DS}	1	0,25	0,063	0,028	0,0025	0,00063	0,00010
f_{NS}	0	0,25	0,56	0,69	0,90	0,95	0,98
f_{MS}	0	0,50	0,38	0,28	0,095	0,049	0,020
% dimérisation	100	33,3	14,3	9,1	2,6	1,3	0,5

S5. Optimisation de la méthode de couplage I des polysaccharides

Les paramètres expérimentaux du couplage chitosane/dextrane-ADH ont été optimisés avant d'être appliqués au couplage avec du dextrane-PDHA. Comme pour la réaction de fonctionnalisation du chitosane avec l'ADH, les réactions de couplage ont été réalisées dans l'eau à pH 4, avec une concentration initiale en chitosane de 20 g/L. Après 24 heures de réaction à température ambiante, 10 équivalents de NaBH_3CN ont été ajoutés. La fonctionnalisation du chitosane nécessitant 20 équivalents d'ADH, l'influence du nombre d'équivalents de dextrane fonctionnalisé utilisé pour le couplage a été étudiée. Cependant, dans le cas du couplage de deux blocs de polysaccharides, il n'est pas possible d'atteindre un tel nombre d'équivalents en raison de la viscosité élevée du milieu. Des tests de couplage préliminaires ont donc été réalisés avec 3, 6 et 10 équivalents de dextrane-ADH. À la fin de la réaction, l'excès de dextrane-ADH a été éliminé par précipitation en milieu basique par addition de soude. Par la suite, plusieurs cycles de lavage à l'eau et de centrifugation ont été effectués, puis le produit a été lyophilisé. Les copolymères obtenus ont été analysés par RMN ^1H dans le D_2O afin de déterminer les taux de conversion des réactions. En raison de la viscosité très élevée du milieu réactionnel en présence de 10 équivalents de dextrane-ADH, seules les réactions impliquant 3 et 6 équivalents ont été menées à bien, et leurs taux de conversion calculés (Tableau S5).

Tableau S5. Conditions expérimentales et résultats des réactions de couplage du chitosane et du dextrane-ADH.

Chitosane	Dextrane	Dextrane-ADH	NaBH_3CN	Taux de conversion ^a
DP 25	DP 41	3 eq.	10 eq.	34%
		6 eq.		36%

^a Valeurs obtenues par RMN (incertitude $\pm 5\%$)

Étant donné que la différence de taux de conversion entre 3 et 6 équivalents de dextrane-ADH est minime, la réaction de couplage entre le chitosane et le dextrane fonctionnalisé sera effectuée avec 3 équivalents de dextrane-ADH. Comme indiqué précédemment, il est préférable de ne pas augmenter la température de la réaction afin d'éviter d'accélérer la dégradation du NaBH_3CN . Pour compenser cette

dégradation, il serait alors nécessaire d'augmenter les quantités utilisées, ce qui entraînerait une hausse du pH du milieu, pouvant poser des problèmes de solubilité pour le chitosane.

Les faibles taux de conversion obtenus (< 40%) sont en partie dus à la méthode de purification et de lavage utilisée. L'analyse des surnageants éliminés lors de la purification a révélé une extraction significative de copolymères au fil des lavages (Figure S4). Pour réduire ce phénomène, un seul et unique lavage dans un grand volume d'eau sera réalisé.

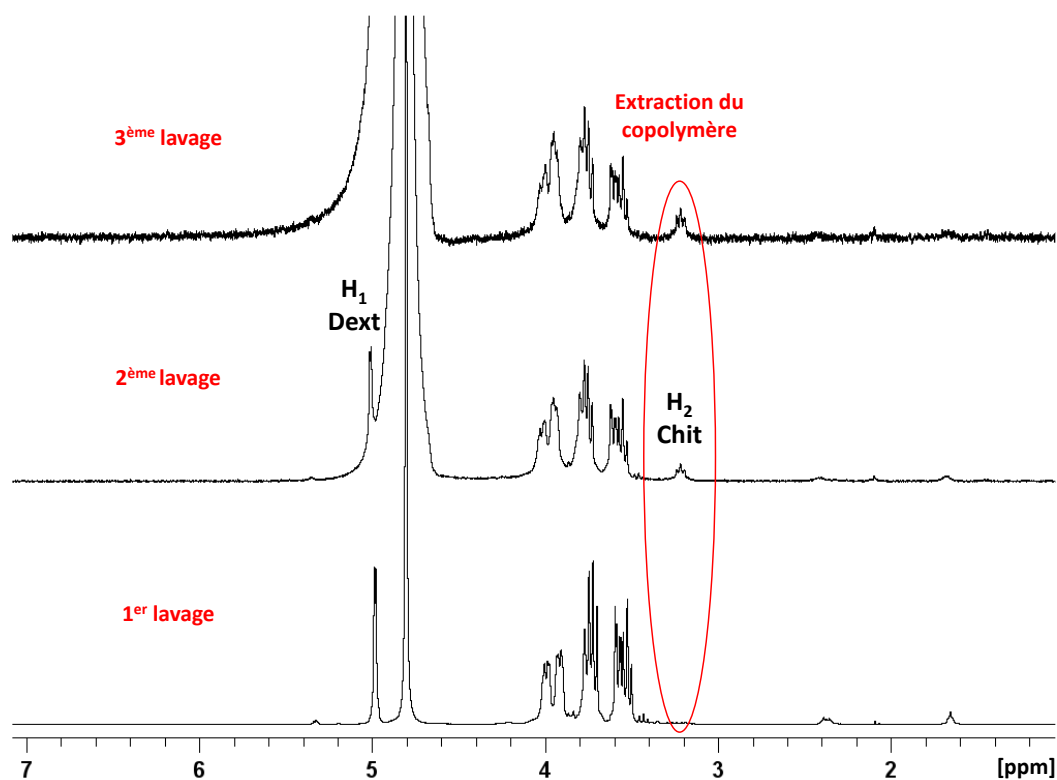


Figure S4. Purification du Chit₂₅-ADH-Dex₄₁ pour enlever l'excès de Dex₄₁-ADH par précipitation en conditions basiques suivie de plusieurs cycles de centrifugation/lavages dans le D₂O. Analyses RMN ¹H des surnageants témoignant de l'extraction significative de copolymère dès le second lavage.

S6. Purification des copolysaccharides par SEC semi-préparative

La SEC semi-préparative a été utilisée pour isoler les fractions contenant le chitosane libre de celles contenant le copolymère Chit₂₅-PDHA-Dext₄₁. La première étape consistait à optimiser les paramètres de séparation tels que la concentration en polymère, le volume injecté et le débit (Figure S5).

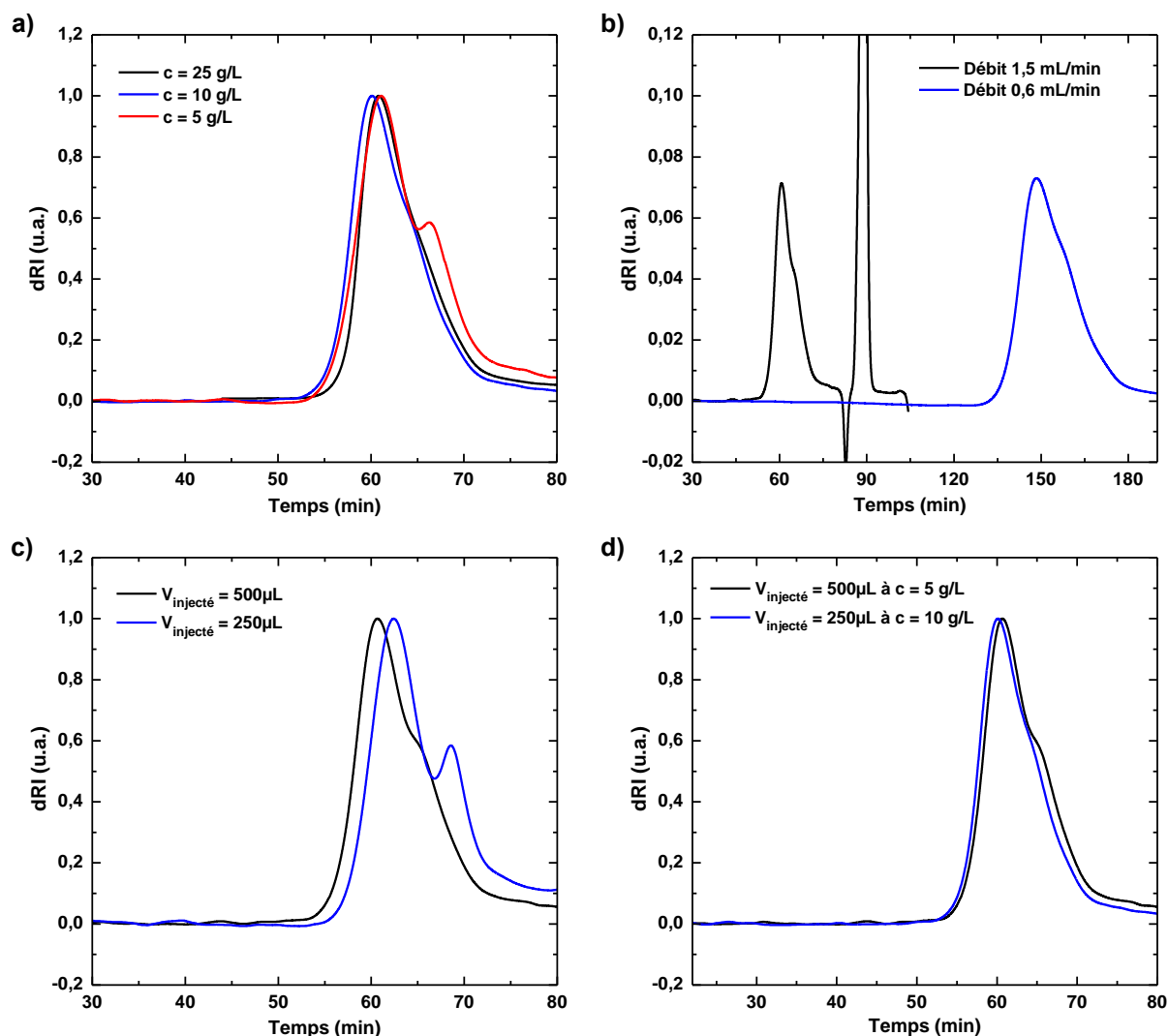


Figure S5. Optimisation des paramètres de fractionnement par SEC semi-préparative du Chit₂₅-PDHA-Dext₄₁ réalisée en tampon acétate (0,2 M AcOH/0,15 M AcONa - pH 4,5). a) influence de la concentration en polymère ($V_{\text{injecté}} = 250 \mu\text{L}$, $Q = 1,5 \text{ mL/min}$), b) influence du débit ($V_{\text{injecté}} = 500 \mu\text{L}$, $c = 5 \text{ g/L}$), c) influence du volume injecté ($Q = 1,5 \text{ mL/min}$, $c = 5 \text{ g/L}$), d) influence du volume injecté en fonction de la concentration ($Q = 1,5 \text{ mL/min}$, $m_{\text{injectée}} = 2,5 \text{ mg}$).

Pour garantir une séparation efficace du chitosane libre, l'épaule caractéristique de celui-ci doit apparaître distinctement sur les chromatogrammes. Le débit n'ayant pas d'impact significatif sur la résolution des pics, un débit de $1,5 \text{ mL/min}$ a été préféré afin de minimiser le temps d'élution. Des volumes injectés et des concentrations en polymères plus faibles ont permis d'améliorer la résolution des pics. Finalement, une comparaison a été faite entre l'influence combinée de ces deux derniers paramètres tout en gardant la masse injectée constante. Il s'est avéré qu'une faible concentration était préférable à un faible volume injecté pour garantir une meilleure séparation. Les paramètres

expérimentaux optimisés sont les suivants : concentration en polymère = 5 g/L, volume injecté = 500 μ L, débit = 1,5 mL/min. Il en résulte une masse injectée de 2,5 mg par analyse ; chaque analyse durant 90 minutes. Les différentes fractions sont collectées toutes les 3,5 min de 55 min à 75 min d'élution. Après collection, les fractions ont été dialysées pendant 48 heures contre de l'eau dans des *float-a-lyzer* de seuil de coupure de 500 Da afin d'éliminer les sels du tampon d'élution. Après lyophilisation, les différentes fractions ont été resolubilisées en tampon d'acétate et analysées par SEC analytique (Figure S6).

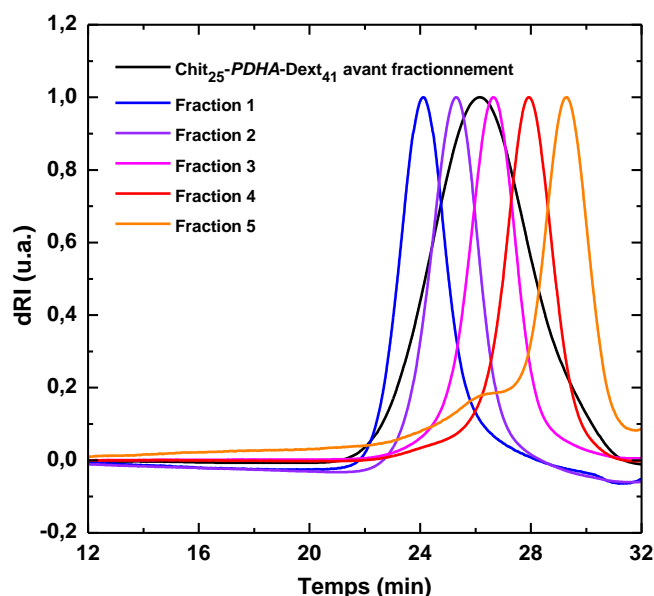


Figure S6. Chromatogrammes SEC (signal dRI) des différentes fractions de Chit₂₅-PDHA-Dex₄₁ recueillies par SEC semi-préparative et analysées par SEC analytique en tampon acétate 0,2 M AcOH/0,15 M AcONa pH 4,5. Les chromatogrammes ont été normalisés par leur intensité maximale.

La fraction 5 contient principalement du chitosane libre, avec quelques copolymères présents comme l'indique l'épaulement à gauche du pic. Par précaution, les fractions 4 et 5 ont été exclues pour garantir l'élimination de la majorité du chitosane libre. Bien que très efficace, le fractionnement par SEC semi-préparative est néanmoins une méthode longue, avec de faibles rendements et qui nécessite une étape de dialyse supplémentaire. Pour obtenir 100 mg de copolymères purifiés, il faut en injecter au moins 160 mg, ce qui nécessite environ 4 jours de fractionnement dans les conditions décrites ci-dessus.

REFERENCES

- [1] A. Hirai, H. Odani, et A. Nakajima, « Determination of degree of deacetylation of chitosan by ¹H NMR spectroscopy », p. 87-94, 1991.
- [2] I. V. Mo *et al.*, « Activation of enzymatically produced chitoooligosaccharides by dioxyamines and dihydrazides », *Carbohydrate Polymers*, vol. 232, p. 115748, mars 2020, doi: 10.1016/j.carbpol.2019.115748.
- [3] I. V. Mo, M. Ø. Dalheim, F. L. Aachmann, C. Schatz, et B. E. Christensen, « 2,5-Anhydro-D-Mannose End-Functionalized Chitin Oligomers Activated by Dioxyamines or Dihydrazides as Precursors of Diblock Oligosaccharides », *Biomacromolecules*, vol. 21, n° 7, p. 2884-2895, juill. 2020, doi: 10.1021/acs.biomac.0c00620.

CHAPITRE 4 – Evaluation biologique des complexes chitosane/ADN *in vitro*

S1. Plasmide pEGFP-C1

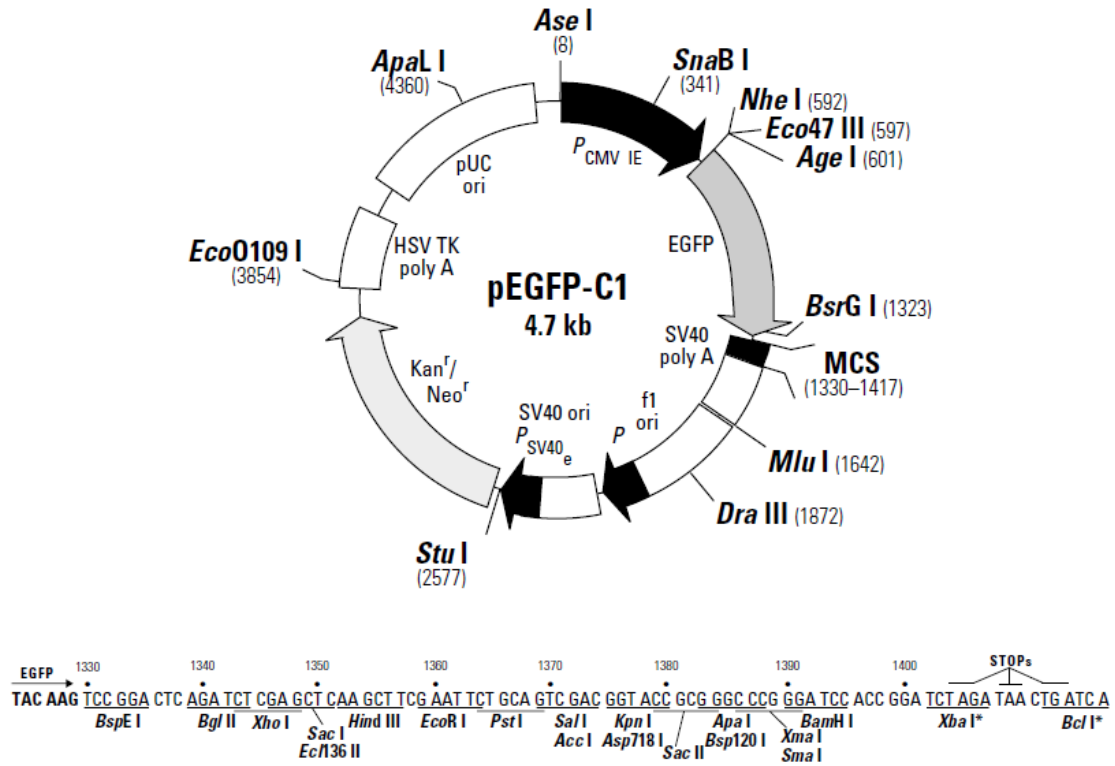


Figure S1. Carte de restriction et site de clonage multiple du pEGFP-C1. Tous les sites de restriction indiqués sont uniques. Les sites Xba I et Bcl I (*) sont méthylés.

Titre : Copolysaccharides à blocs linéaires de chitosane et de dextrane pour la délivrance d'acides nucléiques

Résumé : Le chitosane, seul polysaccharide chargé positivement en milieu acide, peut former des complexes polyélectrolytes avec des molécules chargées négativement. Cette propriété en fait un candidat prometteur pour la conception de systèmes non viraux de délivrance d'acides nucléiques. Cependant, à pH physiologique, son faible degré de protonation le rend insoluble, favorisant l'agrégation et la précipitation des complexes. Les modifications chimiques du chitosane affectent son intégrité et, dans certains cas, compromettent ses capacités de complexation. Cette étude propose deux stratégies pour stabiliser les complexes formés entre le chitosane et l'ADN. La première approche repose sur l'utilisation de copolymères à blocs linéaires chitosane-*b*-dextrane. Par son caractère hydrophile et sa capacité à limiter l'agrégation, le dextrane améliore la solubilité et la dispersion des complexes en milieu aqueux. L'intégrité du chitosane est préservée par l'utilisation d'une diamine comme agent de couplage, permettant la liaison des blocs polysaccharides par leurs extrémités réductrices. Parmi les diamines commerciales testées, l'O,O'-1,3-propanediylbishydroxylamine (PDHA) a été préférée en raison de la stabilité des liaisons oximes formées, permettant de s'affranchir de l'étape de réduction. La seconde approche combine l'acétylation du chitosane à l'ajout d'ions zinc dans les complexes formés avec l'ADN. Des degrés d'acétylation supérieurs à 40%, associés au zinc, formant des liaisons de coordination avec le chitosane et l'ADN, ont permis l'obtention de complexes particulièrement stables en conditions physiologiques. Ces deux stratégies ont été évaluées par des tests de transfection du plasmide eGFP sur des cellules HEK 293. Bien que l'expression de la protéine fluorescente soit inférieure à celle obtenue avec un agent de transfection commercial comme la PEI, l'ajout d'un bloc de dextrane a significativement amélioré les taux de transfection comparé au chitosane seul.

Mots clés : Polysaccharide – Chitosane – Dextrane – Copolymère à blocs – Complexes polyélectrolytes – ADN

Title: Linear block copolysaccharides of chitosan and dextran for nucleic acid delivery

Abstract: Chitosan, the only positively charged polysaccharide in acidic medium, can form polyelectrolyte complexes with negatively charged molecules. This property makes it a promising candidate for the design of non-viral nucleic acid delivery systems. However, at physiological pH, its low degree of protonation renders it insoluble, promoting the aggregation and precipitation of complexes. Chemical modifications of chitosan affect its integrity and, in some cases, compromise its complexation properties. This study explores two strategies to stabilize the complexes formed between chitosan and DNA. The first approach is based on the use of linear block copolysaccharides chitosan-*b*-dextran. Due to its hydrophilic nature and ability to limit aggregation, dextran improves the solubility and dispersion of the complexes in aqueous media. The integrity of chitosan is preserved by using a diamine as linker to couple polysaccharide blocks through their reducing ends. Among the commercial diamines tested, O,O'-1,3-propanediylbishydroxylamine (PDHA) was preferred due to the stability of the oxime bonds formed, eliminating the need for a reduction step. The second approach combines the acetylation of chitosan with the addition of zinc ions to the complexes formed with DNA. Degrees of acetylation greater than 40%, in combination with zinc forming coordination bonds with chitosan and DNA, resulted in particularly stable complexes under physiological conditions. Both strategies were evaluated through transfection tests of the eGFP plasmid on HEK 293 cells. Although the expression of the fluorescent protein was lower than that obtained with a commercial transfection agent like PEI, the addition of a dextran block significantly improved the transfection rates compared to chitosan alone.

Key words: Polysaccharide – Chitosan – Dextran – Block copolymer – Polyelectrolyte complexes – DNA
