



Nanosphères polymères à couverture de hyaluronate pour la délivrance ciblée de molécules actives dans le traitement des affections du cartilage

Hamed Laroui

► To cite this version:

Hamed Laroui. Nanosphères polymères à couverture de hyaluronate pour la délivrance ciblée de molécules actives dans le traitement des affections du cartilage. Biotechnologies. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2007. Français. NNT : 2007NAN10151 . tel-01748397

HAL Id: tel-01748397

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748397>

Submitted on 29 Mar 2018

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.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ - NANCY I
FACULTE DE MEDECINE

ECOLE DOCTORALE « BIOLOGIE SANTE ET ENVIRONNEMENT »

THESE

Présentée et soutenue publiquement le

14 novembre 2007

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ – NANCY I

Discipline : Bioingénierie

Par

Hamed LAROUI

**NANOSPHERES POLYMERES A COUVERTURE DE HYALURONATE
POUR LA DELIVRANCE CIBLEE DE MOLECULES ACTIVES DANS
LE TRAITEMENT DES AFFECTIONS DU CARTILAGE**

JURY

Rapporteurs

Catherine AMIEL
Frédéric MALLEIN-GERIN

Professeur, Paris
Chargé de recherche, CNRS Lyon

Examineurs

Edith DELLACHERIE
Jean-François STOLTZ
Pierre GILLET
Jean-Claude VOEGEL

Co-Directeur de Thèse, PU UHP Nancy
Co-Directeur de Thèse, PU-PH Nancy
Professeur, PU-PH Nancy
Directeur de recherche, INSERM Strasbourg

Invités

Laurent GROSSIN
Elisabeth PAYAN
Michèle LEONARD

Chargé de recherche, CNRS Nancy
Directeur de recherche, CNRS Nancy
Chargée de recherche, CNRS Nancy

Remerciements

Je tiens à remercier Mme Edith DELLACHERIE, PR UHP, directrice de ma thèse et Professeur Emérite du Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire (UMR 7568 CNRS-INPL), pour ses compétences scientifiques et son soutien tant professionnel que personnel.

Je tiens à remercier M. Jean-François STOLTZ, PU-PH, Co-Directeur de ma thèse et Professeur du Laboratoire d'Énergétique et de Mécanique Théorique et Appliquée (UMR 7563 CNRS-UHP), pour ses compétences scientifiques et son soutien.

Je remercie M. Patrick NETTER, PU-PH, Directeur de l'UMR 7561 CNRS-UHP, pour son accueil et son soutien lors de mon travail de thèse.

La partie physico-chimique de ce travail présenté dans cette thèse a été réalisé au laboratoire de chimie physique et macromoléculaire, groupe polymère coordonné par Mme Edith DELLACHERIE, PU. Je remercie Mme Michèle LEONARD, CR CNRS, pour ces compétences et sa contribution dans ce travail.

La partie biologie a été réalisé au laboratoire dans le groupe « Imagerie et Biomatériaux » coordonné par M. Pierre GILLET, PU-PH. Je souhaite lui témoigner ma sincère reconnaissance pour la qualité de son encadrement.

Je remercie M. Laurent GROSSIN, CR CNRS, pour ces compétences et sa contribution à l'élaboration, la rédaction et la mise en forme de ce travail. Je veux aussi saluer sa patience...

Je suis très sensible à l'honneur que me font Mm. le Pr Catherine AMIEL et Frédéric MALLEIN-GERIN d'avoir accepté de juger ce travail. Leurs travaux font autorité dans leurs domaines respectifs et leur jugement sur cette thèse sera particulièrement apprécié.

Merci à M. Dominique DUMAS, pour sa gentillesse et sa disponibilité en microscopie confocale et à M. Jean François REMY et Luc MARCHAL respectivement du laboratoire des Sciences du Génie Chimique et celui d'Énergétique et de Mécanique Théorique et Appliquée pour l'acquisition d'images en microscopie électronique.

Je tiens à remercier Jean-Luc Six, maître de conférence à l'EEIGM, pour m'avoir fait confiance lors des vacances qu'il m'a confié dans le cadre de l'enseignement de la chimie macromoléculaire à l'Ecole Européenne d'Ingénieurs en Génie des Matériaux de Nancy.

Merci enfin aux secrétaires et à toutes les personnes des laboratoires concernés, pour leur disponibilité, leur sympathie et leur courage pour m'avoir supporté durant ces années.

Je tiens particulièrement à saluer Joseph Paquet, pour son aide et son soutien ainsi que pour ses prises piscicoles, Christel Henrionnet pour sa gentillesse légendaire, Frédéric Vallé pour son goût prononcé pour la poésie ainsi que tous les autres étudiants et permanents des laboratoires.

A Famina mon épouse,

A mes parents et ma belle famille,

A Kader,

A M'Hamed, Abdellah, Mohamed, Hadj, Larbi, Mahdjouba, Abed et Chérif

A Noelle, Karim, Sabrina, Ali et Nadège,

A tous mes amis d'hier et d'aujourd'hui,

Je vous dédie cette thèse.

Merci pour votre Amour et votre Soutien

*« On choisit pas ses parents, on choisit pas sa famille
On choisit pas non plus les trottoirs de Manille
De Paris ou d'Alger
Pour apprendre à marcher*

*Est-ce que les gens naissent Egaux en droits
A l'endroit
Où ils naissent
Que les gens naissent
Pareils ou pas »*

Maxime Le Forestier

Sommaire

INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : GENERALITES & REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	5
<i>LA VECTORISATION</i>	5
I. DEFINITION DE LA VECTORISATION.....	5
II. LES DIFFERENTS TYPES DE VECTEURS PARTICULAIRES	6
<i>II.1. LES MICROSPHERES ET MICROCAPSULES</i>	6
<i>II.2. LES SYSTEMES NANOPARTICULAIRES.....</i>	7
<i>II.3. LES VECTEURS MICELLAIRES</i>	8
<i>II.4. AVANTAGES DE LA VECTORISATION.....</i>	9
III. LES PRINCIPAUX POLYMERES UTILISES COMME VECTEURS PARTICULAIRES.....	10
IV. LES NANOPARTICULES CŒUR-COURONNE.....	12
<i>IV.1. OBJECTIFS</i>	12
<i>IV.2. LA FURTIVITE.....</i>	12
<i>IV.3. LE CIBLAGE</i>	13
<i>IV.3.1. L'adressage passif.....</i>	14
<i>IV.3.2. L'adressage actif.....</i>	16
IV.4. METHODES D'ELABORATION DE NANOPARTICULES CŒUR-COURONNE.....	17
<i>IV.4.1. Auto-assemblage en milieu aqueux, de copolymères amphiphiles organosolubles</i>	17
<i>IV.4.2. Utilisation de copolymères amphiphiles hydrosolubles.</i>	18
IV.5. EXEMPLES DE NANOPARTICULES DESTINEES AU CIBLAGE ACTIF	19

<i>LE CARTILAGE ARTICULAIRE ET SES PATHOLOGIES.....</i>	21
I. DESCRIPTION DU CARTILAGE	22
<i>I.1. ASPECT MACROSCOPIQUE DU CARTILAGE</i>	22
<i>I.2. ASPECT MICROSCOPIQUE DU CARTILAGE</i>	22
<i>I.3. RENOUVELLEMENT TISSULAIRE NORMAL</i>	24
<i>I.4. LES CONSTITUANTS DU CARTILAGE, PROPRIETES ET FONCTIONS</i>	24
<i>I.4.1. Les chondrocytes.....</i>	24
<i>I.4.2. La matrice extracellulaire.....</i>	25
<i>I.4.3. Les fibres de collagène.....</i>	26
<i>I.4.4. Les protéoglycanes.....</i>	27
<i>II. LES PATHOLOGIES ET LEURS TRAITEMENTS :.....</i>	30
<i>II.1.1. Les lésions chondrales.....</i>	31
<i>II.1.2. Les lésions ostéochondrales</i>	31
<i>II.2. LES TRAITEMENTS DE REPARATION DU CARTILAGE</i>	31
<i>II.2.1. Les traitements pharmacologiques.....</i>	31
<i>II.2.2. Les techniques chirurgicales de réparation du cartilage.....</i>	33
<i>II.2.2.1. Les techniques de réparation par stimulation locale du tissu ostéogénique ...</i>	33
<i>II.5.2.2. Les techniques d'auto ou allogreffe de tissu cartilagineux mature</i>	34
<i>II.2.2.3. Les techniques d'auto ou allogreffe de tissu cartilagineux immature à capacité chondrogénique</i>	36
<i>II.2.2.4. Les matériaux de comblement.....</i>	37
III. CONCLUSION DU CHAPITRE	41

CHAPITRE II : SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION DES HYALURONATES AMPHIPHILES.....	49
I. GÉNÉRALITÉS SUR LE HYALURONATE	50
I.1. STRUCTURE CHIMIQUE ET ORIGINE DU HA.....	50
I.1.1. Structure chimique	50
I.1.2. Origine et production.....	51
I.2. PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES	52
I.2.1. Structure.....	52
I.2.2. Propriétés physico-chimiques du HA en solution aqueuse.....	53
I.3. PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES.....	54
I.4. PRINCIPALES APPLICATIONS DU HA	57
I.4. MODIFICATION CHIMIQUE DU HYALURONATE :	58
II. MATÉRIELS ET MÉTHODES	59
II.1. MÉTHODES CHIMIQUES	59
II.1.1. Le hyaluronate parent :	59
II.1.2. Protocole général de synthèse des hyaluronates modifiés :	59
II.1.3. Mise au point de la synthèse.....	60
II.1.4. Nomenclature :	61
II.2. MÉTHODES DE CARACTÉRISATION DES DIFFÉRENTS PRODUITS:	
.....	62
II.2.1. Mesure des masses molaires.....	62
II.2.1.1. Rappels sur théorie de la diffusion de lumière	62
II.2.1.2. Équipements :	63
II.2.1.3. Conditions expérimentales :	64
II.2.2. Détermination des taux de substitution :	64
II.2.2.1. Dosage des C _n par chromatographie en phase gazeuse	65
II.2.2.2. Dosage des -CH ₂ -CH ₂ -Phe par spectroscopie UV	66
II.2.3. Étude, par RMN ¹ H, de la pureté des polymères préparés.....	66
II.2.4. Viscosimétrie	67

II.2.5. Tensiométrie	68
III. SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION DES HA AMPHIPHILES	71
III.1. SYNTHÈSE DES HA AMPHIPHILES : HAC_N ($N = 6$ ET 12) ET HAPHE	72
III.2. ÉTUDE DE LA STABILITÉ DU SQUELETTE DE HA AU COURS DE LA MODIFICATION CHIMIQUE :	73
III.2.1. Rappel des résultats déjà obtenus au LCPM sur la dégradation du HA au cours de la synthèse	73
III.2.2. Résultats obtenus au cours de ce travail	73
III.3. CARACTÉRISATION CHIMIQUE : DÉTERMINATION DES TAUX DE SUBSTITUTION EN GROUPES HYDROPHOBES	74
III.3.1 Dosage des chaînes C_n par chromatographie en phase gazeuse (CPG)	74
III.3.2. Dosage des groupements $-CH_2-CH_2-Phe$ par spectroscopie UV	76
III.3.3. Conclusion.....	78
III.4. PROPRIÉTÉS PHYSICOCHIMIQUES EN SOLUTION AQUEUSE....	79
III.4.1. Étude par viscosimétrie capillaire	79
III.4.1.1. Principe et choix du solvant	79
III. 4.1.2. Résultats et discussion.....	80
III.4.2. Étude par tensiométrie	81
III.4.2.1. Généralités.....	81
III.4.3.2. Résultats	82
III.4.2.3. Conclusion.....	85
IV. CONCLUSION DU CHAPITRE	88

CHAPITRE III : SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION DES NANOPARTICULES À CŒUR DE POLY(D-L, LACTIDE)	94
I. OBJECTIFS	94
II. MATÉRIELS ET MÉTHODES	96
II.1. MÉTHODES DE PRÉPARATION DES NANOPARTICULES	96
II.1.1. Choix de la technique d'émulsification	96
II.1.1.1. Théorie de la formation de l'interface	96
II.1.1.2. Les techniques d'émulsification	97
II.1.2. Choix de la technique d'évaporation du solvant	98
II.2. MESURE DES TAILLES DE NANOPARTICULES : SPECTROSCOPIE	
A CORRELATION DE PHOTONS.....	98
II.2.1. Principe :	98
II.2.2. Conditions opératoires :	99
II.2.3. Traitement du signal :	99
II.3. PROTOCOLES DE DOSAGE DES DIFFÉRENTS POLYSACCHARIDES,	
EN SURFACE (HA), ET ENCAPSULES (HA, CS ET HEP)	100
II.3.1. Protocole d'hydrolyse du HA superficiel	102
II.3.2. Protocole de dégradation des nanoparticules.....	102
II.3.3. Dosage par électrophorèse capillaire de zone	102
II.3.3.1. Origine et intérêt de la technique.....	103
II.3.3.2. Electro-osmose ou migration électroosmotique	104
II.3.3.3. Électrophorèse capillaire de zone par association ionique	105
II.3.3.4. Protocole de dosage du HA et de la CS.....	107
II.3.4. Dosage de l'héparine.....	110
III. RESULTATS.....	113
III. 1. PRÉPARATION DES NANOPARTICULES ET CARACTÉRISATION	
EN TERMES DE TAILLE	113
III.1.1. Procédé de simple émulsion/évaporation de solvant	113
III. 1.1.1. Influence de la méthode d'émulsification	113

III.1.1.2. Protocole expérimental retenu pour la synthèse des nanoparticules	116
III.1.1.3. Influence de différents paramètres sur la taille des émulsions et des nanoparticules.....	116
<i>III.1.2. Procédé de double émulsion/évaporation de solvant : élaboration de nanoparticules vides (sans principe actif)</i>	<i>118</i>
III.1.2.1. Emulsion primaire (eau dans huile)	118
III.1.2.2. Double émulsion (eau/huile/eau)	119
III.1.2.3. Résultats	120
<i>III.1.3. Procédé de double émulsion/évaporation de solvant : élaboration de nanoparticules chargées en principe actif (PA).....</i>	<i>121</i>
III.1.3.1. En absence de BSA	122
III.1.3.2. En présence de BSA	122
III.2. CARACTERISATION EN TERMES DE QUANTITES DE HA EN SURFACE ET DE POLYSACCHARIDES ENCAPSULES	124
III.2.1. Validation de la méthode de dosage du HA pour les HA amphiphiles	124
III.2.2. Résultats concernant la couronne de HA.....	126
III.2.3. Résultats concernant les polysaccharides encapsulés	127
III.3. ETUDE DE LA LIBERATION D'UNE MACROMOLECULE MODELE ENCAPSULEE.....	131
IV. CONCLUSION DU CHAPITRE	136

CHAPITRE IV : EVALUATION BIOLOGIQUE DES NANOPARTICULES

140

I. EVALUATION IN VITRO DES NANOPARTICULES SUR DES CELLULES ARTICULAIRES DE RAT :ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.

I.1. MATERIELS ET METHODES140

<i>I.1.1. Définition des différents types de lots de nanoparticules testés :</i>	<i>140</i>
Lots synthétisés pour les tests biologiques :.....	140
<i>I.1.2. Biologie cellulaire.....</i>	<i>141</i>
I.1.2.1. Culture cellulaire de chondrocytes.....	141
I.1.2.2. Culture cellulaire de synoviocytes	142
I.1.2.3. Entretien des cellules	142
I.1.2.4. Culture en système tridimensionnel (billes d'alginate)	142
<i>I.1.3. Biocompatibilité - Cytocompatibilité (LDH et MTT).....</i>	<i>144</i>
I.1.3.1. Test MTT	144
I.1.3.2. Test LDH :	145
I.1.3.3. Biosynthèse des protéoglycanes par incorporation de ³⁵ S :	145
I.1.3.4. Dosage du DNA	146
I.1.3.5. Immunofluorescence	146
I.1.3.6. Microscopie confocale	146
<i>I.1.4. Biologie Moléculaire</i>	<i>147</i>
I.1.4.1. Extraction des ARN totaux	147
I.1.4.2. Vérification de l'intégrité des ARN totaux	148
I.1.4.3. Transcription inverse (M-MLV)	148
I.1.4.4. PCR quantitative en temps réel.....	149
I.1.4.5. Exploitation des données	152
I.1.4.6. Courbe de fusion	156
I.1.4.7. Analyses statistiques	156

I.2. RESULTATS / DISCUSSION.....157

I.2.1. Cytocompatibilité des 7 lots de nanoparticules in vitro 157

I.2.2. Discussion 157

I.2.3. Etude de la cytocompatibilité sur trois lots spécifiques : 158

I.2.3.1. Contexte et objectif de l'étude : 158

I.2.3.2. Résultats : 159

I.2.3.3. Conclusion : 162

I.2.4. Etude de l'inflammation sur trois lots de nanoparticules : 163

I.2.4.1. Pré-requis : 163

I.2.4.2. Résultats: 165

I.2.4.3. Conclusion de l'étude inflammatoire : 168

I.2.5. Effets des nanoparticules sur la biosynthèse matricielle en système tridimensionnel..... 169

I.2.5.1. Contexte et objectifs de l'étude : 169

I.2.5.2. Résultats de l'étude de biosynthèse matricielle : 169

I.3. ETUDE DE L'INTERACTION ET DU DEVENIR DES

NANOPARTICULES PAR MICROSCOPIE :173

I.3.1. Objectifs : 173

I.3.1.1. Microscopie confocale et nanoparticules Dextran-FITC 173

*I.3.1.2. Localisation des nanoparticules par microscopie électronique à balayage MEB.
..... 176*

II. EVALUATION DES EFFETS BIOLOGIQUES DES NANOPARTICULES IN VIVO.	178
II.1. MATERIELS ET METHODES	178
<i>II.1.1. Animaux.....</i>	<i>178</i>
II.1.1.1. Protocole expérimental	178
II.1.1.2. Mesure de la biosynthèse des protéoglycanes	179
<i>II.1.2. Biologie Moléculaire</i>	<i>180</i>
II.1.2.1. Membranes synoviales	180
II.1.2.2. Vérification de l'intégrité des ARN totaux.....	180
II.2. RESULTATS / DISCUSSION.	181
<i>II.2.1. Analyse histologique des tissus articulaires :.....</i>	<i>182</i>
II.2.1.1. Contexte et objectifs :	182
II.2.1.2. Résultats histologiques :	182
<i>II.2.2. Etude de la biosynthèse des protéoglycanes du cartilage patellaire.....</i>	<i>185</i>
II.2.2.1. Objectifs :	185
II.2.2.2. Résultats de l'étude de biosynthèse :.....	185
<i>II.2.3. Analyse de l'expression des médiateurs de la réponse inflammatoire.....</i>	<i>187</i>
CONCLUSION	188

Introduction générale

INTRODUCTION

Le cartilage normal, situé à l'extrémité des os, est un tissu complexe dont la fonction principale est de permettre des mouvements harmonieux des articulations tout au long de la vie. A cette fin, les chondrocytes – les seules cellules du cartilage – synthétisent une matrice extracellulaire (MEC) constituée de protéoglycanes, de divers types de collagène, de glycoprotéines et de hyaluronate (HA), polysaccharide à longue chaîne. Cette MEC protège les chondrocytes des contraintes mécaniques subies par l'articulation.

La cavité articulaire est couverte par une fine membrane, le synovium, qui, le plus souvent, est constitué de 2 couches : la membrane externe, ou subintima, et la membrane interne, ou intima. Cette dernière, constituée d'un film de cellules – les synoviocytes – arrangées en une sorte de tube, isole le fluide synovial du tissu environnant, empêchant ainsi les articulations d'être asséchées lorsqu'elles sont soumises à des compressions. Les cellules sont de 2 types, les fibroblastes et les macrophages, quelque peu différents des cellules similaires trouvées dans d'autres tissus. Les fibroblastes produisent le HA ainsi que la lubriline qui lubrifie les articulations. L'eau du liquide synovial est piégée dans l'espace articulaire par ce polysaccharide. Les macrophages contribuent à l'élimination des substances indésirables, du liquide synovial. Le synovium a un réseau dense de petits vaisseaux sanguins qui l'alimente en nutriments ainsi que le cartilage avasculaire. Certaines zones du cartilage doivent cependant obtenir indirectement des nutriments par diffusion au travers du tissu.

Les atteintes ostéoarticulaires ont été divisées en 2 catégories principales selon que le processus est inflammatoire (arthrite rhumatoïde) ou dégénératif (ostéoarthrite), les 2 processus conduisant à la dégénérescence du cartilage. L'arthrite rhumatoïde est caractérisée par une inflammation de la membrane synoviale dont la conséquence est une sécrétion dans le fluide synovial, de cytokines pro-inflammatoires conduisant à une érosion progressive du cartilage. L'ostéoarthrite se manifeste par une dégradation progressive du cartilage articulaire accompagnée d'un remodelage de l'os sous-chondral, d'une formation marginale d'ostéophyte et d'une altération symptomatique de la fonction mécanique du cartilage ainsi que d'une perte graduelle du tissu.

Introduction générale

Les traitements habituels reposent principalement sur l'utilisation de médicaments anti-inflammatoires comme les anti-inflammatoires non stéroïdiens ou les corticostéroïdes, qui agissent principalement sur les symptômes en diminuant les processus inflammatoires et la douleur. Cependant l'utilisation de ces molécules peut avoir des effets délétères parce qu'ils sont administrés par voie systémique ou orale, et à cause des concentrations élevées nécessaires pour obtenir un effet thérapeutique. Plus récemment de nouveaux produits anti-arthrosiques d'action lente (AAL) – comme le HA administré directement dans l'articulation, ou la chondroïtine sulfate administrée *per os*, associée ou non à de la glucosamine – se sont révélés être de bons chondroprotecteurs en améliorant la progression arthrosique du processus tout en agissant sur les différents compartiments de l'articulation (cartilage, os, membrane synoviale).

Cependant, un des principaux problèmes qui se posent lorsqu'il s'agit de traiter du cartilage lésé, est de parvenir à lui délivrer des composés thérapeutiques car, dans la plupart des cas, les molécules doivent atteindre le cartilage après avoir traversé la membrane synoviale. Ainsi la quantité d'agents actifs disponibles peut être faible et insuffisante pour atteindre la dose thérapeutique. Pour obtenir des quantités élevées, on peut faire des injections intraveineuses ou intrapéritonéales, mais alors on augmente le risque de provoquer des effets secondaires pour d'autres tissus. Lorsqu'une injection est réalisée directement dans l'articulation, le principal inconvénient est la faible demi-vie des molécules par suite de la capture par les synoviocytes.

Pour améliorer la biodisponibilité de ces molécules actives, plusieurs voies sont possibles. On peut par exemple les encapsuler dans des nanoparticules polymères (bio)dégradables pour obtenir une libération progressive après leur injection *in vivo*. Pour cibler cette libération dans le tissu malade de manière active, on peut recouvrir les nanoparticules avec des ligands capables de reconnaître spécifiquement des récepteurs ou des antigènes présents à la surface des cellules du tissu en question.

Nous avons envisagé de faire appel à cette démarche dans le cas du traitement de certaines atteintes du cartilage, en prenant en compte le fait que les cellules articulaires possèdent en surface des récepteurs dont l'un d'entre eux, le CD44, a une affinité spécifique pour le HA. L'objectif a alors été de synthétiser des nanoparticules de polymère dégradable comme le polylactide, de les recouvrir de HA et d'y encapsuler des AAL. On attendait que la présence

Introduction générale

de ce polysaccharide en surface favorise la reconnaissance des nanosphères par les cellules articulaires et permette l'internalisation des particules. Après cette capture, la libération progressive de la molécule encapsulée permettrait sa mise à disposition au sein même des cellules.

Si l'on envisage une injection intra-articulaire de telles particules, on peut alors s'attendre à une amélioration de la biodisponibilité des molécules actives grâce à plusieurs paramètres :

- une localisation du produit actif à proximité de la lésion
- une diminution de la diffusion du médicament en dehors de l'articulation en raison de la taille des nanosphères
- un ciblage des particules vers les cellules articulaires grâce à la présence de HA à la surface nanoparticulaire
- une libération prolongée de la molécule active à proximité ou au sein des cellules.

Le travail de thèse a alors consisté dans un premier temps à synthétiser des nanosphères de PLA recouvertes de HA et renfermant les AAL ou l'héparine et à les caractériser en termes de taille, de quantité de HA en surface et de quantités de polysaccharides encapsulés. Ces particules ont été préparées par un procédé de double émulsion/évaporation de solvant en utilisant un HA amphiphile comme stabilisant de l'émulsion secondaire.

Avec les lots ainsi préparés et analysés, nous avons ensuite effectué une étude biologique *in vitro* sur les cellules articulaires (chondrocytes et synoviocytes) de façon à étudier la cytocompatibilité des vecteurs nanoparticulaires et le rôle de la couronne des nanosphères sur leur comportement vis-à-vis des cellules, et à mettre en évidence une éventuelle internalisation. Enfin, des tests *in vivo* préliminaires ont été mis en place afin de démontrer l'innocuité d'éventuelles injections de nanoparticules dans la cavité articulaire de rat.

Le manuscrit de thèse est ainsi divisé en 4 chapitres. Le premier passe d'abord en revue les différentes possibilités qui existent pour vectoriser et cibler des médicaments ; puis il décrit les constituants du cartilage, ses pathologies ainsi que leurs traitements.

Le deuxième est consacré à la synthèse et à la caractérisation des HA amphiphiles – HA substitués par des groupements hydrophobes – qui ont servi à stabiliser l'émulsion secondaire dans le procédé de double émulsion/évaporation de solvant utilisé pour la synthèse des nanoparticules.

Introduction générale

Dans le troisième chapitre, sont décrits les procédés de synthèse des nanosphères, les techniques physico-chimiques de caractérisation ainsi que les méthodes utilisées pour déterminer les quantités des différents polysaccharides en surface et à l'intérieur des particules. Les différents lots de nanoparticules ont ainsi été caractérisés de manière détaillée avant l'évaluation biologique. Les résultats d'une étude de libération d'un polysaccharide modèle encapsulé sont également rapportés dans ce chapitre.

Enfin, le quatrième chapitre vise à tester non seulement l'innocuité *in vitro* de l'utilisation de nanoparticules sur deux types de cellules (chondrocytes et synoviocytes) mais aussi d'éventuels effets inflammatoires. Il explore aussi le devenir des nanoparticules au contact des cellules *in vitro* via un polysaccharide encapsulé marqué par fluorescence. Puis, les premiers tests *in vivo* sur rats sont entrepris. Ils concernent la vérification de l'innocuité vis-à-vis des cellules et du tissu, l'inflammation et l'intégrité du processus de synthèse matricielle du tissu cartilagineux.

Les travaux de chimie et physico-chimie des matériaux ont été réalisés au Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire, UMR 7568, INPL, les tests sur les cultures cellulaires, au Laboratoire de Physiopathologie et Pharmacologie Articulaires, UMR 7561, UHP, et les analyses en imagerie au Plateau Technique d'Imagerie et de Biophysique Cellulaire, Equipe Mécanique et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire, LEMTA, UMR 7563, INPL-UHP

CHAPITRE I :
GENERALITES
& REVUE
BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I :

GENERALITES & REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

LA VECTORISATION

De tout temps, le rapport principe actif administré sur principe actif réellement utilisé au niveau de la zone à soigner (ce qu'on peut appeler biodisponibilité), a été une préoccupation majeure pour les médecins, les pharmaciens, et les industriels des entreprises pharmaceutiques.

Depuis les années 70, une partie des recherches menées pour améliorer la biodisponibilité, a concerné l'utilisation de vecteurs pour les molécules bioactives. Ceci permettant de mieux diriger le principe actif vers la zone à traiter, les conséquences sont alors :

- une réduction du nombre des administrations
- une limitation des éventuels effets secondaires et donc de la toxicité
- une amélioration du confort du patient
- une réduction des coûts de santé ...

Nous reviendrons plus en détail sur ces avantages dans le paragraphe II.4. de ce chapitre.

I. Définition de la vectorisation

La vectorisation consiste à transporter un principe actif, en quantité suffisante, vers la cible à atteindre, au moyen d'un vecteur soluble ou insoluble dans l'eau, inactif du point de vue thérapeutique. Cette vectorisation permet d'une part d'éviter l'administration directe du médicament dans le corps humain et d'autre part d'améliorer les caractéristiques pharmacocinétiques du principe actif vectorisé. Ce sont alors les propriétés du vecteur et non celles du principe actif qui détermineront le sort du système *in vivo*.

Les objectifs de la pharmacie galénique moderne sont donc de développer des systèmes d'administration permettant d'améliorer la biodisponibilité de molécules actives en prolongeant par exemple leur durée de vie dans l'organisme, en favorisant une mise à disposition progressive et dans certains cas en promouvant le passage des différentes barrières

naturelles dans l'organisme tout en protégeant l'intégrité structurale donc fonctionnelle du principe actif (notamment face aux nombreuses enzymes de dégradation du vivant).

En effet, aucun médicament n'est capable d'exercer une activité thérapeutique si le principe actif qu'il renferme n'est pas capable de passer les différentes barrières biologiques qui séparent le site d'administration de son site d'action.

Pour assurer la vectorisation, de nombreuses voies de recherche ont été expérimentées, parmi lesquelles celle utilisant les particules occupe une place importante depuis plusieurs décennies. C'est cette voie que nous allons détailler ci-après.

II. Les différents types de vecteurs particuliers

Les vecteurs particuliers se présentent sous différentes formes selon leur taille, leur contenu et leurs propriétés chimiques propres.

Il y a 20 ans déjà, Benoît et coll. [1] ont proposé une classification permettant de distinguer 3 générations de vecteurs. Cette distinction s'effectue selon la taille du vecteur, le mécanisme de vectorisation et l'application envisagée (Tableau A-1).

Génération	Première	Deuxième		Troisième
Cible	Organe	Tissu		Cellule
Diamètre	>1 µm	<1 µm		<1 µm
Exemples		Liposomes Nanocapsules Nanosphères	Liposomes, nanocapsules et nanosphères magnétiques ou thermosensibles	Liposomes, nanocapsules, nanosphères pilotés par des ligands spécifiques
Application	Embolisation	Capture par le système immunitaire	Guidage extérieur	Reconnaissance de la cible

Tableau I. 1 : Classification des vecteurs de médicaments selon Benoit et coll. [1]

II.1. LES MICROSPHERES ET MICROCAPSULES

Les vecteurs dits de première génération sont des systèmes médicamenteux de taille supérieure au µm [2], soit de type matriciel (microsphères), soit de type vésiculaire (microcapsules). Ils sont destinés à être injectés en amont du tissu visé principalement grâce à l'utilisation de cathéters. Ces microparticules ont souvent été préconisées pour la

chimioembolisation. La molécule active est alors libérée progressivement et peut diffuser vers la cible, généralement d'origine tumorale.

II.2. LES SYSTEMES NANOPARTICULAIRES

Ce sont des vecteurs colloïdaux de taille inférieure au μm permettant, par exemple après administration intravasculaire, un ciblage actif ou passif au niveau tissulaire selon que leur distribution *in vivo* est contrôlée ou non par des systèmes d'adressage spécifique (cf par. IV.3. de cette partie). Parmi ces vecteurs et selon la nature des éléments qui les constituent, nous pouvons distinguer les liposomes, les émulsions sèches et les vecteurs polymères insolubles (nanoparticules ou nanosphères).

Les liposomes [3] sont de petites vésicules sphériques dont la paroi est constituée par une ou plusieurs bicouches phospholipidiques délimitant une cavité centrale contenant une phase aqueuse. Ils peuvent véhiculer des principes actifs de nature hydrophile, sous forme dissoute dans la phase aqueuse centrale, ou de nature lipophile par insertion dans la bicouche.

Les liposomes possèdent une bonne biocompatibilité en raison des matières premières qui les composent (phospholipides naturels, stérols, glycérolipides) et peuvent se comporter comme des formes médicamenteuses à libération modifiée. Cependant, ces structures vésiculaires sont instables chimiquement (oxydation et hydrolyse des phospholipides) et physiquement (aggrégation, fusion et perte du contenu). C'est pourquoi, par exemple, elles sont parfois recouvertes de polysaccharides (dextrane, chitosane...) [2-4]. Des liposomes recouverts de poly(oxyde d'éthylène) (liposomes « PEGylés ») ont également été décrits [5], le but étant de prolonger la durée de vie dans l'organisme, grâce au rôle du POE en surface (voir par. IV.2. de cette partie).

Les émulsions sèches sont des systèmes de type réservoir à structure sphérique, dont la paroi est constituée de molécules tensioactives et qui comportent un cœur huileux dans lequel sont solubilisés des principes actifs organosolubles. Les émulsions sèches peuvent être préparées en utilisant comme stabilisants, des macromolécules amphiphiles, telles que certaines protéines ou des polysaccharides modifiés [6]. Elles se présentent sous forme de poudre facilement redispersable et sont capables de reformer les émulsions initiales huile dans eau une fois remises en présence d'eau.

Les nanoparticules polymères sont des structures colloïdales de diamètre compris entre 100 nm et 1 μ m, parmi lesquelles on distingue les nanosphères et les nanocapsules.

* Les nanosphères sont des structures matricielles, de forme sphérique, constituées d'un réseau polymère. Le principe actif est soit incorporé à l'intérieur du réseau polymère durant la formation des nanosphères, soit fixé à leur surface par l'intermédiaire de liaisons de type hydrophobe, électrostatique ou covalente.

* Les nanocapsules sont des structures réservoirs, sphériques, à paroi polymère et comportant un cœur huileux. Le principe actif est généralement dissous dans le cœur huileux mais peut être aussi adsorbé à la surface des nanocapsules.

Les nanosphères polymères peuvent être préparées par différentes méthodes. Dans toute la suite de cette partie, seuls les procédés utilisant des polymères synthétisés au préalable seront considérés c'est-à-dire essentiellement la nanoprécipitation, l'émulsion/évaporation de solvant et l'émulsion/diffusion de solvant.

Dans le but d'augmenter l'affinité des vecteurs nanoparticulaires pour un type tissulaire ou cellulaire défini, est ensuite apparue la notion d'adressage qui consiste à favoriser l'orientation du vecteur vers un site spécifique. Ainsi les vecteurs de troisième génération sont ceux dont la particularité est de porter un système de ciblage cellulaire. Ils correspondent à des vecteurs de deuxième génération auxquels ont été fixés des ligands, susceptibles de reconnaître tel ou tel type de tissu ou de cellule.

Nous développerons dans la suite (par. IV.3. de cette partie) la notion de ciblage et les moyens de parvenir à cette reconnaissance.

II.3. LES VECTEURS MICELLAIRES

Certains polymères amphiphiles (hydrophiles/hydrophobes) hydrosolubles peuvent former en solution aqueuse, par auto-association, des micelles de quelques dizaines de nm. On peut alors utiliser ces systèmes micellaires pour solubiliser et stabiliser des principes actifs de nature hydrophobe [7]. Le médicament est alors incorporé dans le cœur des micelles. Dans ce cas, il est nécessaire que les polymères utilisés possèdent de faibles concentrations micellaires critiques afin de maintenir en solution les produits actifs, même après dilution dans le sang.

II.4. AVANTAGES DE LA VECTORISATION

Comme on l'a déjà rapidement évoqué précédemment, la vectorisation présente de nombreux avantages [8-12].

Les principaux points à retenir sont les suivants :

➤ Elle permet la protection du principe actif contre l'inactivation chimique, enzymatique ou immunologique. Ainsi, les caractéristiques pharmacocinétiques du médicament sont optimisées. Ceci est particulièrement intéressant pour les principes actifs à faible durée de vie *in vivo*.

➤ Pour assurer l'efficacité thérapeutique d'un principe actif, il est souvent nécessaire d'injecter une quantité importante de médicament et/ou de répéter l'injection, ce qui peut provoquer certains effets secondaires. La libération progressive d'un principe actif encapsulé dans une particule permet alors une diminution du nombre d'injections et améliore le confort du patient.

➤ La vectorisation peut permettre l'obtention de profils pharmacologiques plus favorables : les fluctuations de concentration en principe actif peuvent être réduites en contrôlant la libération de celui-ci, en la maintenant dans la zone d'efficacité thérapeutique comme illustré sur la Figure I. 1.

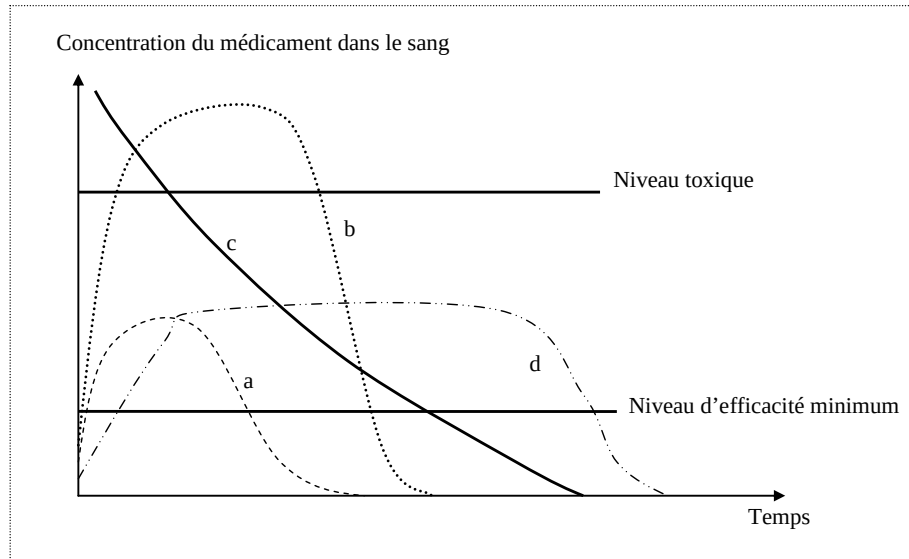


Figure I. 1 : Evolution de la concentration plasmatique du principe actif en fonction du temps et du mode d'administration. (a) Dose standard orale, (b) Overdose orale, (c) Injection intravasculaire, (d) Système de relargage contrôlé.

En effet, la concentration du médicament doit dépasser le niveau minimum d'efficacité, tout en restant inférieure au niveau toxique. Le contrôle de la vitesse de libération du principe actif encapsulé dans un vecteur matriciel peut alors permettre d'assurer une concentration quasi-

constante, comprise entre ces deux niveaux, pendant une durée bien supérieure à celle obtenue avec une dose standard.

➤ Si le vecteur est un système à libération ciblée, la concentration du principe actif au voisinage de certains sites d'action peut être accrue. Ceci permet à la fois de limiter la distribution du médicament entre les différents organes et de réduire les effets secondaires indésirables pour les organes sains. Pour cela, les particules doivent être conçues afin de ne libérer les médicaments que sous l'effet de certains facteurs précis (pH, température, présence de certaines enzymes quand les nanoparticules sont recouvertes de leurs substrats, magnétisme), ou seulement au voisinage de certaines cellules spécifiques grâce à des mécanismes de reconnaissance particuliers. Ainsi, la sélectivité et la spécificité de ces particules vis-à-vis de la cible, peuvent permettre d'améliorer l'efficacité du principe actif.

III. Les principaux polymères utilisés comme vecteurs particuliers

Les polymères utilisés comme vecteurs particuliers peuvent être d'origine naturelle ou synthétisés par les méthodes de la chimie de polymérisation. Dans les 2 cas ils doivent être biocompatibles, non toxiques, non immunogènes, non cancérogènes. Ils doivent également pouvoir être (bio)dégradés dans l'organisme et leurs produits de dégradation bien tolérés. S'ils ne peuvent pas être (bio)dégradés, ils doivent alors, après solubilisation dans les fluides biologiques, pouvoir être éliminés par les voies naturelles. Ceci suppose que leur taille moléculaire doit leur permettre de passer au travers du filtre rénal.

Compte-tenu de la très grande variété des polymères utilisables, nous ne mentionnerons ici que les principaux.

Parmi les polymères naturels, on peut citer les protéines comme la gélatine ou l'albumine mais ce sont les polysaccharides qui ont une place majeure :

- ✓ Ils présentent, pour la plupart, une biocompatibilité satisfaisante et ils sont parfois biodégradables *in vivo* : ils sont extrêmement hydrophiles et de nombreux polysaccharides entrent ou peuvent entrer dans des cycles de dégradation par la cellule et/ou le tissu, ce qui est un avantage prépondérant dans l'interface vivant/matériaux. De plus, comme ils sont constitués de sous unités saccharidiques (type galactose, glucose ou dérivé acide ou N-acétylé...), leurs produits de dégradation sont facilement éliminés voire assimilés par l'organisme.

- ✓ Par ailleurs ce sont des polymères dont l'origine est bien connue et depuis longtemps, ce qui a permis de mettre en œuvre de nombreux types d'extraction avec un fort taux de rendement (exemple l'alginate des algues brunes ou le hyaluronate de cartilage de requins...)

Le contrôle de leur taille et donc de leur masse molaire moyenne (en nombre ou en masse) est cependant tributaire de l'origine même de la molécule. La composition de la molécule (avec ou sans fonctions greffées, forme basique ou acide...) obéit à la même loi.

C'est pourquoi les polymères synthétiques ont été développés. En effet, ils présentent certains avantages mentionnés ci-après :

- ✓ Grâce à la très grande variété des monomères, la composition chimique des polymères et copolymères est largement modulable.
- ✓ En utilisant les méthodes de synthèse macromoléculaires appropriées, on peut obtenir le contrôle complet de la taille et de la distribution des masses moléculaires. On peut également élaborer des architectures définies.
- ✓ Par le biais de la chimie des polymères, les propriétés mécaniques, viscoélastiques ou tensioactives peuvent être relativement contrôlées.

Parmi les polymères de synthèse, les polyesters aliphatiques [13-15] ont été très largement étudiés pour leur biocompatibilité et leur capacité à être (bio)dégradés *in vivo*. Ainsi le poly(D,L-lactide) (PLA) et le poly(glycolide) (PGA), et leurs copolymères se dégradent par voie chimique dans l'organisme pour donner naissance à l'acide lactique et l'acide glycolique qui sont des métabolites naturels de l'organisme. *In fine* ces métabolites sont transformés en CO₂ et H₂O. La poly(ε-caprolactone), plus hydrophobe que les précédents, subit une lente biodégradation *in vivo* en présence de lipase. Dans un autre registre, citons également les polyalkylcyanoacrylates [16] qui peuvent se solubiliser dans les fluides biologiques après hydrolyse de la fonction acrylate d'alkyle et être ensuite bioéliminés si leur masse molaire n'est pas trop élevée.

IV. Les nanoparticules cœur-couronne

IV.1. OBJECTIFS

La spécialisation accrue de la vectorisation vers l'ultime but représenté par l'adressage cellulaire mène les chercheurs à mettre en place des systèmes de plus en plus complexes.

Dans certains cas, la composition de la matrice va permettre à elle seule de diriger le principe actif vers sa cible thérapeutique. C'est par exemple le cas de nanoparticules hydrophobes qui sont capturées par les organes du Système des Phagocytes Mononucléés (SPM) (cf par. IV.3.1. de cette partie). L'interaction cellule ou tissu avec le vecteur polymère permet alors l'intégration de molécule bioactive par sa cible.

Cependant, dans certains cas où la matrice seule ne suffit pas à cette étape de l'adressage thérapeutique, d'autres astuces doivent être mises en place.

C'est ainsi que la notion de particules cœur-couronne est apparue pour les vecteurs particulaires.

Cette couronne est souvent constituée de chaînes polymères naturelles ou synthétiques disposées « à plat » (« side-on ») sur la surface, avec des boucles, des trains et des extrémités libres ou « en brosse » (« end-on »), ces 2 dispositions donnant naissance à des propriétés différentes de la surface.

La littérature est d'autant plus vaste dans ce domaine que l'on peut imaginer quasiment une infinité d'association de polymères, d'arrangements de ceux-ci et de conformations tridimensionnelles...

Les interactions entre les nanoparticules et les constituants des systèmes vivants dépendent de façon très importante des propriétés de surface des nanosphères. Cette dépendance a été très largement étudiée dans le cadre de 2 processus particuliers :

- La furtivité
- Le ciblage spécifique

IV.2. LA FURTIVITE

Les vecteurs nanoparticulaires à base de polymère hydrophobe comme par exemple les polyesters aliphatiques, présentent généralement en surface, une hydrophobie plus ou moins marquée et une charge de surface négative : c'est par exemple le cas des particules de certains

poly(lactide)s dont la surface présente à la fois des sites hydrophobes et des fonctions carboxylates. La nature de cette surface dépend en effet du mode de synthèse du PLA. Après administration intra-veineuse, il se produit sur ces nanosphères, une adsorption d'opsonines, des protéines cationiques plasmatiques, qui favorise la capture des nanoparticules par les macrophages du SPM [17]. Ceci a pour conséquence une disparition prématurée des particules du volume circulant et donc une durée de vie limitée dans le circuit sanguin.

De nombreuses études ont été réalisées pour tenter de diminuer ce phénomène de phagocytose en modifiant les propriétés de surface des particules.

Pour réduire les interactions ioniques et/ou hydrophobes entre les vecteurs particuliers et les opsonines, il s'est avéré que l'utilisation de polymères hydrophiles et neutres en surface, pouvait avoir un effet très favorable et permettre de préparer des particules furtives, c'est à dire invisibles vis-à-vis des cellules du SPM.

De très nombreux travaux ont été consacrés au rôle du poly(oxyde d'éthylène) (POE ou PEG) en position « end-on » dans le phénomène de furtivité. Il a ainsi été montré que la conformation « en brosse serrée » à la surface permettait d'augmenter très significativement la durée de vie des vecteurs dans le circuit sanguin [18, 19].

L'influence d'une couronne constituée de certains polysaccharides et notamment du dextrane et de l'héparine, a également été examinée [20, 21]. Les effets sur l'opsonisation des nanoparticules et donc sur leur furtivité, dépendent essentiellement de la conformation des polysaccharides en surface.

IV.3. LE CIBLAGE

Parmi les grands principes énoncés par P. Ehrlich [22], le plus novateur était sans doute le ciblage thérapeutique. La « Magic Bullet » devait non seulement acheminer le principe actif à travers toutes les barrières biologiques et en préserver l'intégrité mais aussi reconnaître le tissu ou les cellules cibles par le biais d'interactions de surface.

La notion de ciblage (ou adressage) est importante à définir. En effet, on peut parler de vecteur de ciblage tissulaire ou cellulaire quand celui-ci permet de façon chimique ou physique d'augmenter le rapport de la quantité de principe actif ciblée à celle non ciblée de façon très significative, ceci en comparaison avec l'injection normale du principe actif.

Il faut distinguer 2 types de ciblage (ou adressage):

- L'adressage passif.
- L'adressage actif

IV.3.1. L'adressage passif

C'est une propriété non spécifique du système nanoparticule/cellule visée qui permet au vecteur particulaire de délivrer son principe actif préférentiellement à proximité du tissu cible.

Plusieurs facteurs peuvent induire ce ciblage passif :

- * Les paramètres de taille du vecteur

Ils peuvent jouer un rôle important en favorisant sa rétention près du site d'administration. Ainsi des exemples de délivrance localisée de médicaments encapsulés dans des nanoparticules injectées dans le lumen artériel à l'aide de cathéters, sont décrits dans la littérature [23].

L'effet EPR (Enhanced Permeability and Retention) [24] relève également du paramètre taille du vecteur. Il résulte des propriétés des vaisseaux des tissus cancéreux qui développent des pores de 100 à 800 nm alors que les vaisseaux des tissus sains présentent des cellules jointives. Les capillaires des tissus normaux sont moins perméables aux nanoparticules que ne le sont ceux des tissus tumoraux, ce qui se traduit par une concentration plus élevée en principe anticancéreux dans le site de la tumeur que dans celui du tissu normal.

Ce phénomène est fondé sur l'accumulation différentielle des nanoparticules chargées en médicament dans les tissus tumoraux comparativement à ce qui se passe dans les tissus sains comme schématisé sur la Figure I. 2.

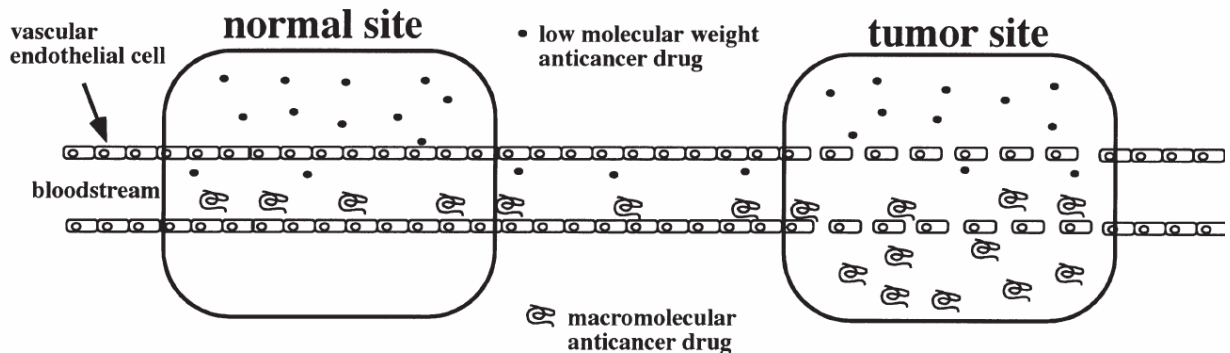


Figure I. 2 : Exemple d'adressage passif (« EPR ») au sein d'un vaisseau sanguin irrigant un tissu tumoral.

L'adressage est passif car assuré de façon indirecte par des facteurs relatifs à la tumeur. Mais l'adressage est bien réel car l'absorption des systèmes de taille élevée ne se fait qu'au niveau du tissu tumoral.

* Interactions non spécifiques entre vecteurs et cellules cibles

Des particules dont la surface présente une charge globale positive facilitent l'adhésion sélective à des cellules chargées négativement, par l'établissement de liaisons ioniques [25] et inversement. Des liaisons hydrophobes peuvent également intervenir dans ces mécanismes d'adhésion.

* Les vecteurs à tropisme hépato-splénique

Comme on l'a vu précédemment, lorsqu'elles sont administrées par voie intraveineuse, les nanoparticules peuvent interagir fortement avec les opsonines qui sont reconnues par des récepteurs présents sur les macrophages du SPM (foie, rate, moelle...). Les vecteurs sont alors internalisés par endocytose. Il en résulte donc une distribution hépato-splénique et intracellulaire des colloïdes qui a été mise à profit pour traiter certaines affections localisées dans ces tissus, par exemple des métastases hépatiques. Par ailleurs, la localisation tissulaire (foie, rate), cellulaire (macrophages) et subcellulaire (endosomes/lysosomes) des vecteurs particuliers permet également le transport efficace d'antitumoraux et d'antibiotiques au niveau des cellules infectées [26].

* Ciblage par la voie d'administration

Le choix de la voie d'administration pour les nanoparticules peut également conduire à un ciblage intéressant en favorisant la délivrance au niveau du tissu cible [27]. Ainsi l'administration orale de particules peut permettre le ciblage direct des muqueuses intestinales.

D'autres voies d'administration présentent également un intérêt pour l'amélioration de la biodisponibilité par rapport à la voie générale. Citons la voie transdermale, la voie pulmonaire, oculaire, intravitréale...

* Ciblage par des facteurs physiques

Champ magnétique : lorsque des particules chargées en médicament renferment un élément magnétique, et qu'elles sont administrées *in vivo*, il est possible de les diriger vers un organe cible en appliquant un champ magnétique à proximité du site à traiter.

Cette approche a été proposée pour le traitement de tumeurs solides [28] et a conduit au développement de nombreuses stratégies pour la synthèse de nanoparticules magnétiques [29].

Chaleur : en utilisant des nanoparticules ou des liposomes thermosensibles, il est possible d'obtenir une libération du médicament encapsulé, par l'utilisation de chaleur sur le site ciblé ou grâce à l'hyperthermie locale qui est cliniquement établie dans le cas de certaines tumeurs solides. La chaleur provoque alors la destruction de la particule polymère [30] ou celle du liposome [31].

Enfin citons pour mémoire l'utilisation d'ultra-sons pour la délivrance ciblée de médicaments dans le cerveau [32].

IV.3.2. L'adressage actif

Il résulte d'une interaction spécifique d'un ligand fixé à la surface des nanoparticules avec une molécule du tissu ou de la cellule cible. Ces interactions spécifiques permettent au vecteur de délivrer son principe actif au plus près de la cellule cible voire de favoriser l'internalisation de celui-ci par des phénomènes d'endocytose propres à chaque tissu (Figure I. 3).

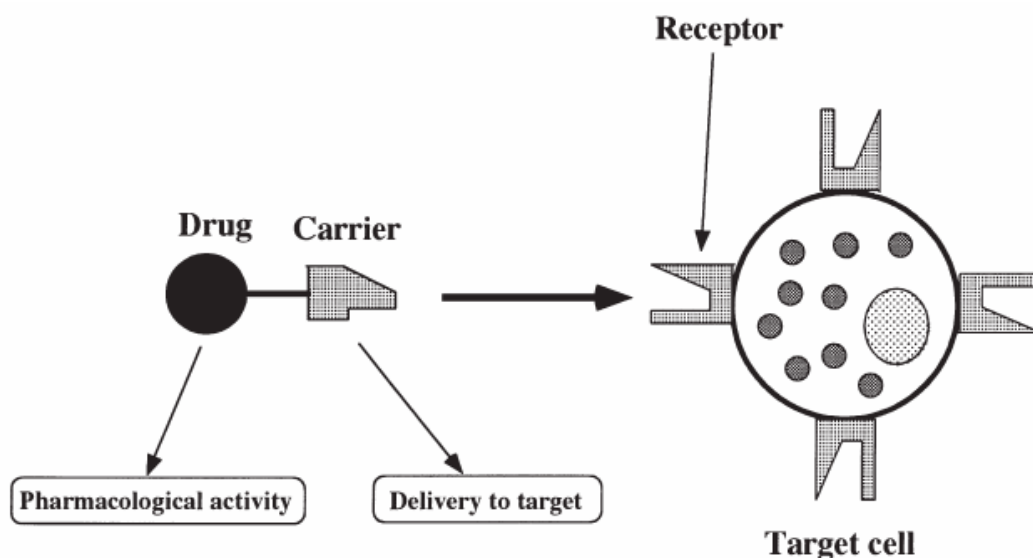


Figure I. 3 : Exemple d'un adressage actif. La reconnaissance entre le récepteur membranaire de la cellule cible et un ligand du vecteur est spécifique et permet à la molécule bioactive d'agir de façon optimale.

Cet adressage utilise une reconnaissance sélective des ligands fixés sur les nanoparticules par des antigènes ou des récepteurs qui sont hyper-exprimés à la surface des cellules cibles

(cellules cancéreuses, cellules infectées ou inflammatoires, voire saines). Cette démarche nécessite une connaissance accrue des mécanismes d'interaction entre les récepteurs ou les antigènes membranaires de la cellule cible et la « molécule clef » fixée de façon covalente au vecteur thérapeutique.

Ce type d'adressage correspond à un nouveau concept concernant le mode d'action du « médicament moderne ». En effet, il sépare la phase de reconnaissance dédiée au vecteur thérapeutique, de la phase d'activité thérapeutique propre à la molécule bioactive. Ceci ouvre la voie à de nombreux développements dans le « design » des molécules de reconnaissance envers une cellule cible afin d'être de plus en plus spécifique dans l'adressage, mais aussi à une grande liberté dans le choix de la molécule bioactive pour rendre le traitement le plus efficace possible.

IV.4. METHODES D'ELABORATION DE NANOPARTICULES CŒUR-COURONNE

IV.4.1. Auto-assemblage en milieu aqueux, de copolymères amphiphiles organosolubles

Lorsqu'une solution organique (miscible ou non miscible à l'eau) d'un copolymère amphiphile non hydrosoluble mais organosoluble, est mise au contact d'une solution aqueuse, on peut provoquer la formation de nanoparticules par auto-assemblage des copolymères. On opère le plus souvent par nanoprécipitation ou par les méthodes d'émulsion/(évaporation ou diffusion) de solvant. Les parties hydrophobes des copolymères s'associent entre elles dans l'eau pour former le cœur des particules, les parties hydrophiles restant majoritairement exposées au milieu aqueux environnant.

Ainsi du pullulane hydrophobisé par des molécules de cholestérol donne naissance dans l'eau, à des nanoparticules (diamètre 20-30 nm) capables de complexer l'insuline [33].

Du dextrane porteur de chaînes latérales de poly(ϵ -caprolactone) permet de préparer par émulsion/évaporation de solvant, des nanosphères (100 to 250 nm) à cœur de poly(ϵ -caprolactone) et possédant une couronne riche en dextrane [34, 35]

De la même façon, des nanoparticules à cœur de poly(lactide) et couronne de dextrane sont préparées par émulsion/évaporation de solvant à partir de copolymères dextrane-g-poly(lactide) organosolubles [36].

Pour élaborer des nanoparticules à couronne de monométhoxypoly(oxyde d'éthylène) (MPOE), les mêmes procédés ont été utilisés. Ainsi des copolymères à bloc MPOE-b-PLA non hydrosolubles, mélangés ou non à du PLA, permettent de synthétiser des nanoparticules à cœur riche en PLA et recouvertes majoritairement de MPOE [18, 37-39]. Des nanosphères à cœur de poly(cyanoacrylate-co-hexadecylcyanoacrylate) recouvertes de POE sont préparées selon le même processus, par nanopréciipitation [40].

IV.4.2. Utilisation de copolymères amphiphiles hydrosolubles.

Nous ne parlerons pas dans ce chapitre de toutes les méthodes utilisant l'adsorption de copolymères amphiphiles hydrosolubles sur des nanosphères hydrophobes, méthodes qui ont été largement étudiées et décrites dans la littérature. Nous focaliserons notre étude sur leur utilisation en tant que stabilisants susceptibles de conduire à la formation de nanoparticules cœur-couronne par émulsion/(diffusion ou évaporation) de solvant.

Dans les procédés utilisant les émulsions pour la préparation des nanoparticules, il est nécessaire d'utiliser des émulsifiants ou des tensioactifs comme stabilisants des systèmes. Une grande partie de ces stabilisants se retrouve alors à la surface des nanosphères solides. C'est ainsi que des nanosphères recouvertes par exemple de poly(alcool vinylique) ou de poloxamers ont pu être élaborées [41].

On peut alors tirer profit de ce phénomène pour contrôler la surface des nanoparticules en utilisant comme stabilisants des émulsions, des copolymères amphiphiles synthétisés à façon. Lors du procédé de synthèse utilisant une émulsion dans laquelle le polymère qui constituera la matrice est dissous dans la phase organique, le copolymère amphiphile est dissous dans la phase aqueuse. Il se place alors à l'interface huile/eau, sa partie hydrophobe s'ancree dans la phase organique alors que la partie hydrophile s'expose à l'eau. Après élimination du solvant, on récupère des nanosphères dont le cœur est constitué par la partie hydrophobe du copolymère amphiphile et la couronne par sa partie hydrophile.

En utilisant par exemple des dérivés amphiphiles hydrosolubles du dextrane, on a préparé au Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire, des nanosphères de poly(lactide) recouvertes par le polysaccharide, par la méthode d'émulsion/évaporation de solvant. Les

différents dextrans testés ont été préparés en modifiant chimiquement le polysaccharide en chaînes latérales, par des groupements aliphatiques à 6 ou 10 atomes de carbone ou par des groupes phénoxy [42]. L'utilisation d'échantillons de dextrane-g-poly(lactide) hydrosolubles synthétisés par une méthode de polymérisation de lactide à partir de dextrane, a également permis la synthèse de nanoparticules de PLA recouvertes de dextrane [36]. De la même façon mais cette fois-ci, en utilisant comme tensioactifs macromoléculaires des copolymères à bloc MPOE-b-PLA hydrosolubles pour la stabilisation des émulsions, on a élaboré des nanoparticules de PLA recouvertes de MPOE [43, 44].

Des nanosphères de PLA recouvertes de chitosane ont été obtenues par le procédé d'émulsion/diffusion de solvant en employant du chitosane partiellement acétylé comme stabilisant en présence de poloxamer [45]. Citons également les résultats obtenus dans la préparation de nanoparticules de poly(lactide) en présence de copolymères amphiphiles poly(méthacrylate de méthyle-co-acide méthacrylique) hydrosolubles. Les nanosphères présentent alors en surface des groupes carboxyliques provenant de l'unité acide méthacrylique du copolymère, qui peuvent être utiles pour une fonctionnalisation ultérieure des particules [46].

IV.5. EXEMPLES DE NANOPARTICULES DESTINEES AU CIBLAGE ACTIF

Pour reconnaître de manière sélective, des antigènes ou des récepteurs surexprimés à la surface des cellules cibles, les nanoparticules doivent présenter en surface des ligands spécifiques. La fixation de ces ligands sur les particules doit être réalisée de sorte qu'une fois fixés, ils conservent leur capacité de reconnaissance vis-à-vis des cellules cibles.

A cet égard, de nombreux efforts ont été faits pour parvenir au ciblage actif de médicaments sur les bons tissus et cellules, particulièrement dans le domaine de la thérapie des cancers [16, 47]. Ainsi comme un niveau d'expression élevé du récepteur au folate a été fréquemment observé dans différents types de cancers humains, l'acide folique a été fixé à des liposomes et des nanoparticules [48]. Il a été montré que ces nanoparticules au folate ciblaient les cellules cancéreuses et amélioraient l'internalisation des médicaments encapsulés [49].

D'autres ligands ont été également liés à des vésicules ou nanoparticules parmi lesquels on peut citer les groupes Sialyl Lewis X [50], galactosyl [51]... ainsi que des anticorps [52].

Beaucoup d'autres ligands potentiels ont été proposés : le Tableau I. 2 en présente quelques-uns.

Ligand	Médicament	Système	Cellules cibles
<i>Protéines de la matrice extracellulaire</i> Intégrine Peptides RGD	Gènes raf siRNA	Liposomes Poly(éthylène imine)	Mélanome Tumeurs du système vasculaire
Facteur Von Willebrand	Gène cyclique	Particules virales	Id°
<i>Carbohydrates</i> Peptidomimétiques Hyaluronate	Variés Doxorubicine	MPOE/PLGA Liposomes	Cerveau Tumeurs
<i>Anticorps contre :</i> Récepteur HER2 CD19	Doxorubicine Doxorubicine	Liposomes Liposomes	HER2 Lymphome B

Tableau I. 2 : Quelques exemples de systèmes nanoparticulaires pour le ciblage thérapeutique, d'après Fahmi et coll. [27].

Comme on le voit dans le Tableau I. 2, des oligomères de hyaluronate (HA) ont été utilisés comme ligands pour l'adressage de liposomes chargés en doxorubicine, vers le récepteur CD44, un marqueur membranaire surexprimé par certaines cellules tumorales [53].

Le récepteur CD44 est une glycoprotéine de surface qui existe sous de nombreuses isoformes (actuellement plusieurs dizaines sont identifiées) [54, 55]. Il peut interagir avec de nombreux ligands membranaires ou extracellulaires, le principal étant le HA, un polysaccharide très répandu dans l'organisme. Les cellules impliquées dans des activités pathologiques telles que des cellules cancéreuses et inflammatoires, ainsi que des cellules normales engagées dans des fonctions physiologiques, présentent le CD44 à leur surface. C'est ainsi qu'on le retrouve à la surface des chondrocytes, les cellules du cartilage, ainsi que des synoviocytes. L'intérêt majeur du CD44 est qu'il est caractérisé par une grande affinité pour le HA, ce qui conduit à l'établissement d'une forte interaction entre les 2 partenaires ainsi qu'à une internalisation du polysaccharide au sein des cellules qui sont dotées du récepteur.

Cette affinité du HA pour le CD44 surexprimé au niveau des membranes de certaines cellules cancéreuses ouvre la voie pour la mise en place du ciblage thérapeutique [58]. Elle a d'ailleurs été mise à profit pour cibler des médicaments antitumoraux en les encapsulant dans des liposomes à couronne de HA [53].

LE CARTILAGE ARTICULAIRE ET SES PATHOLOGIES

Le cartilage articulaire normal est un tissu hautement spécialisé, caractérisé par ses propriétés mécaniques. Situé entre deux surfaces osseuses, il permet, par ses propriétés de résistance aux forces de compression et d'élasticité, le glissement de ces surfaces osseuses grâce à un coefficient de friction extrêmement faible. Le cartilage est un tissu sans vascularisation ni innervation. Il se nourrit à partir des molécules présentes dans le liquide synovial et qui pénètrent la surface articulaire.

Plusieurs types d'articulations doivent être distingués :

- Les synarthroses sont des articulations sans secteur de mobilité, dépourvues de cartilage et de membrane synoviale.
- Les amphiarthroses ont des surfaces articulaires recouvertes de cartilage et séparées. Elles n'ont pas de membrane synoviale mais sont réunies par des ligaments (par exemple la symphyse pubienne).
- Les diarthroses correspondent aux articulations les plus fréquentes dans l'organisme et elles permettent les mouvements. Les surfaces articulaires sont recouvertes de cartilage et l'articulation est délimitée par une membrane synoviale et un manchon fibreux appelé capsule, capsule qui renforce la membrane synoviale. Ces articulations sont dites synoviales. Des ligaments latéraux et parfois centraux (exemple du genou, Figure I. 4) servent de stabilisateurs à l'articulation. Le cartilage est donc « enfermé » dans une cavité close et stérile et baigne dans un liquide sécrété par la membrane synoviale, le liquide synovial.

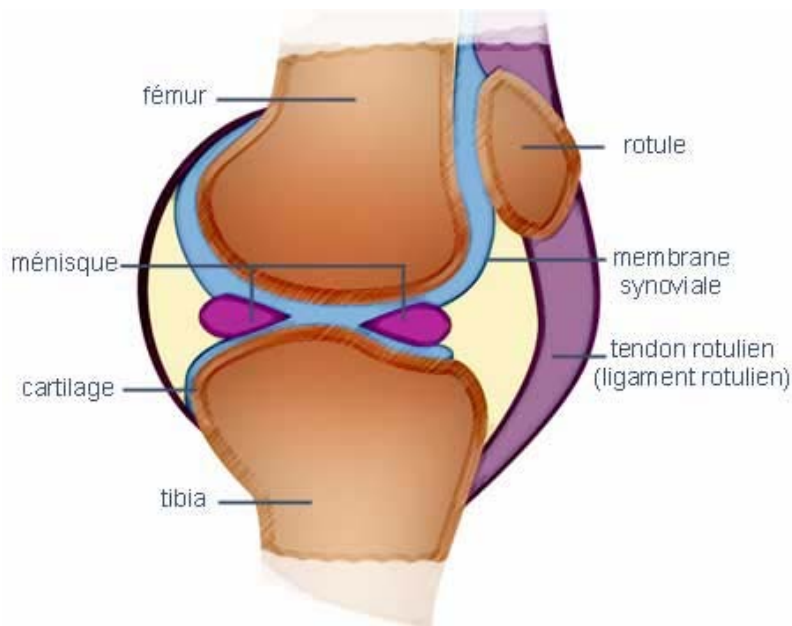


Figure I. 4 : Schéma des différentes parties constituant l'articulation du genou.

I. Description du cartilage

I.1. ASPECT MACROSCOPIQUE DU CARTILAGE

Le cartilage articulaire sain a une surface blanche, un peu translucide (d'où l'adjectif hyalin : qui a la transparence du verre), lisse et brillante. La surface montre une certaine souplesse et déformabilité sous une pression mesurée. L'épaisseur varie en fonction des articulations. Le cartilage le plus épais est celui de la fémoropatellaire (6-7 mm) et celui fémorotibial (5-6 mm) [56, 57].

I.2. ASPECT MICROSCOPIQUE DU CARTILAGE

A la différence du cartilage de croissance dans lequel le chondrocyte, la cellule du cartilage, est le siège d'un processus de maturation cellulaire actif et complexe, qui aboutit *in fine* à l'ossification enchondrale [58, 59], le cartilage articulaire se distingue par une maturation cellulaire extrêmement ralentie.

Ceci est secondaire à l'arrêt, à un âge encore non précisé, du recrutement de préchondrocytes ou de chondrocytes jeunes qui impose une maturation cellulaire presque figée afin de garder intactes la présence et la hauteur du cartilage articulaire [60].

De la même façon, le processus d'apoptose qui est le processus final de la maturation chondrocytaire dans le cartilage de croissance, est en grande partie absent dans le cartilage articulaire normal [61, 62].

C'est la raison pour laquelle on ne décrit pas le cartilage articulaire en couches superposées qui correspondent dans le cartilage de croissance à des stades successifs de différenciation et de maturation. On décrit donc le cartilage articulaire en couches qui diffèrent entre elles essentiellement selon les critères biochimiques (teneur en protéoglycanes), anatomiques (disposition de fibres de collagène : en lumière polarisée on peut observer la biréfringence du réseau de collagène qui varie de la superficie à la profondeur) et selon le nombre de cellules.

A la surface du cartilage, il existe une zone acellulaire dénommée *lamina splendae* qui recouvre la couche superficielle [56]. Cette zone permet d'accrocher des macromolécules présentes dans le liquide synovial constituant ainsi une couche protectrice pour le cartilage (protection notamment vis-à-vis des radicaux libres). Ainsi l'acide hyaluronique recouvre cette surface, de même que certains phospholipides et la lubriline [56].

On différencie classiquement quatre couches dans le cartilage (Figure I. 5) :

- *Une couche superficielle*, où les chondrocytes* sont petits et plats (allure fibroblastique). Les fibres de collagène* sont disposées parallèlement à la surface et cette zone est riche en fibronectine* et relativement pauvre en protéoglycanes*. En raison de la disposition du réseau de collagène, cette zone résiste aux fortes tensions. Les différents constituants (*) sont décrits dans le par. I.4.
- *Une couche intermédiaire ou moyenne* (40-45% de la hauteur totale) où les chondrocytes sont gros et sphériques ; le réseau des fibres de collagène n'a pas d'orientation particulière.
- *Une couche profonde et radiale* (40-45% de la hauteur totale), où les chondrocytes sont structurés en colonnette le long des travées de collagène épaisses et disposées de façon perpendiculaire à la surface. La concentration en protéoglycanes y est élevée.
- *Une couche calcifiée* (5-10% de la hauteur totale) qui vient au contact de la lame osseuse sous-chondrale. Cette zone est pauvre en protéoglycanes et les fibres de collagène gardent une orientation radiale mais sans continuité avec les fibres de collagène de l'os sous-jacent.

La concentration en calcium y est élevée. La couche de cartilage calcifiée est séparée de la zone profonde par une ligne de démarcation basophile et ondulée (tide-mark) qui constitue une barrière interdisant la pénétration des vaisseaux présents dans l'os sous-chondral, mais qui laisse passer certains constituants.

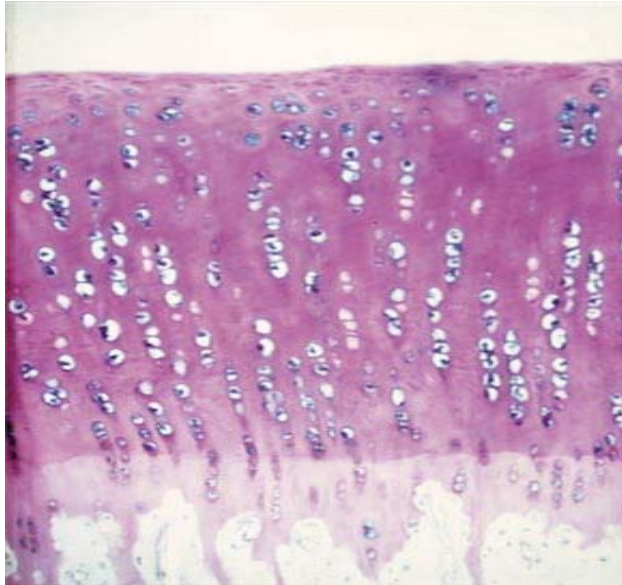


Figure I. 5 : Aspect histologique du cartilage articulaire montrant la disposition des cellules dans les différentes zones et l'orientation du collagène. (Hémaréine et éosine $\times 100$ au microscope optique classique).

I.3. RENOUVELLEMENT TISSULAIRE NORMAL

Le renouvellement de la matrice extracellulaire est extrêmement lent, il est pratiquement nul pour les collagènes au cours de la vie, il est de plusieurs centaines de jours pour les protéoglycanes. Il existe un turnover normal faible en péri-cellulaire du collagène dans le cartilage de sujets jeunes. Ce turnover augmente dans le cartilage de sujets plus âgés avec un marquage des collagènes dénaturés et dégradés plus marqué et plus diffus. L'aspect du cartilage chez ces derniers se rapproche de celui des lésions débutantes d'arthrose (avec fibrillations de la surface) [63].

I.4. LES CONSTITUANTS DU CARTILAGE, PROPRIETES ET FONCTIONS

Le cartilage est composé d'un seul type de cellules, les chondrocytes, d'eau et d'une matrice extracellulaire constituée de collagène, de protéoglycanes, de glycosaminoglycanes....

I.4.1. Les chondrocytes

Le cartilage hyalin est constitué d'un seul type de cellules, les chondrocytes, qui sont enfermés dans une matrice extracellulaire. L'environnement immédiat du chondrocyte est pauvre en collagène de type II et forme le chondron avec la cellule.

En microscopie électronique, on constate que le chondrocyte est de forme sphérique et ovoïde, et mesure de 30 à 40 μm de diamètre [60]. Il n'existe pas de contact intercellulaire direct au sein de la matrice cartilagineuse. Les chondrocytes occupent 10% du volume total du cartilage (1 à 10% du volume sec du cartilage) mais la densité cellulaire varie selon le type d'articulation, la zone où il se trouve et selon l'âge du patient [64, 65].

Les chondrocytes possèdent un noyau central développé, des mitochondries et des vacuoles lysosomiales. Ces cellules fonctionnent principalement en anaérobie. Il s'agit d'un des rares tissus à fonctionner en hypoxie. Il existe un gradient hypoxique qui varie de 10% de teneur en oxygène en surface à 1% en profondeur. Cependant il a été montré que les chondrocytes des couches les plus superficielles pouvaient avoir en partie un fonctionnement aérobie par diffusion des gaz (O_2) présents dans le liquide synovial. Les chondrocytes ne migrent pas et se multiplient peu ou pas dans un cartilage normal.

Les chondrocytes utilisent essentiellement le glucose comme substrat énergétique. Ils consomment une quantité importante de ce sucre qu'ils convertissent en glucosamine pour réaliser la synthèse des protéoglycanes [66]. Il est important de souligner que les chondrocytes sont capables de produire non seulement la matrice extracellulaire mais aussi des enzymes capables de la détruire : dans des cas pathologiques, les chondrocytes peuvent aussi produire des cytokines pro-inflammatoires provoquant la destruction du cartilage par augmentation de la synthèse et de l'activité des métalloprotéases [67], de hyaluronidases [68] et d'une ou plusieurs agrécannase(s). Les chondrocytes sont séparés de la matrice extracellulaire par l'espace péricellulaire. Dans cet espace, les protéoglycanes et les collagènes présents, comme par exemple les collagènes de type VI [69] sont utilisés pour réaliser l'ancrage des chondrocytes à la matrice par l'intermédiaire des protéines membranaires.

Une particularité des chondrocytes est que leur métabolisme est en permanence influencé par les conditions physico-chimiques qui règnent dans cet espace intercellulaire.

I.4.2. La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) est composée d'eau pour 65-80% du poids humide et de macromolécules comme des protéines et des glycosaminoglycanes (20-35% du poids humide

du cartilage). Elle est riche en cations qui équilibrent les charges négatives des protéoglycanes [70].

La matrice extracellulaire située à distance de la cellule est dite « interterritoriale ». Elle assure l'intégrité du tissu et lui confère ses propriétés biomécaniques.

La MEC est constituée d'un réseau dense tridimensionnel de fibres de collagène et d'un gel de protéoglycanes très hydrophile (Figure I. 6). Cette matrice contient essentiellement du collagène de type II [71, 72]. Des molécules non collagéniques comme l'anchoring, la fibronectine... sont également présentes. Chaque groupe de protéines est associé à des récepteurs membranaires distincts.

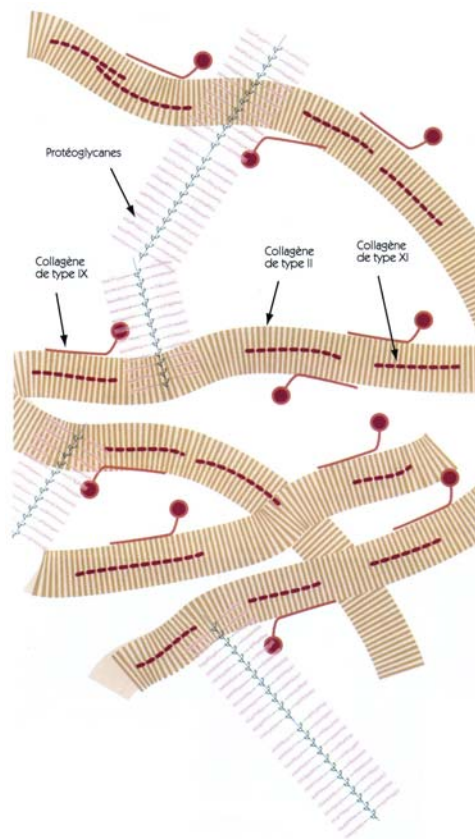


Figure I. 6 : Schéma du réseau de fibres de collagène et des protéoglycanes [73]

I.4.3. Les fibres de collagène

Les fibres de collagène de type II sont caractéristiques mais non spécifiques du cartilage, puisqu'elles sont présentes également dans la cornée (au niveau du corps vitré de l'œil) et les disques intervertébraux (au niveau du *nucléus pulposus* du corps vertébral). Ces fibres constituent 25% du poids sec du cartilage [74]. Le collagène de type II est un marqueur du

chondrocyte normal qui témoigne, en culture, de son caractère différencié. C'est un homotrimère formé de trois chaînes qui représente 95% du collagène du cartilage. Les collagènes de type VI, IX, X et XI sont des collagènes mineurs dans le cartilage articulaire. A l'exception du collagène de type X, aucun de ces collagènes n'est spécifique du cartilage articulaire car ils sont aussi présents dans le cartilage de croissance, les fibrocartilages, la cornée et l'humeur vitrée.

I.4.4. Les protéoglycanes

Les protéoglycanes sont des édifices moléculaires constitués d'une protéine porteuse sur laquelle se greffent des molécules de glycosaminoglycanes : les chondroïtines sulfates et les kératanes sulfates. Ces édifices se branchent à leur tour, par l'intermédiaire d'une protéine de liaison, sur des longues chaînes de hyaluronate pour former des agrégats de protéoglycanes [73, 75] (

Figure I. 7).

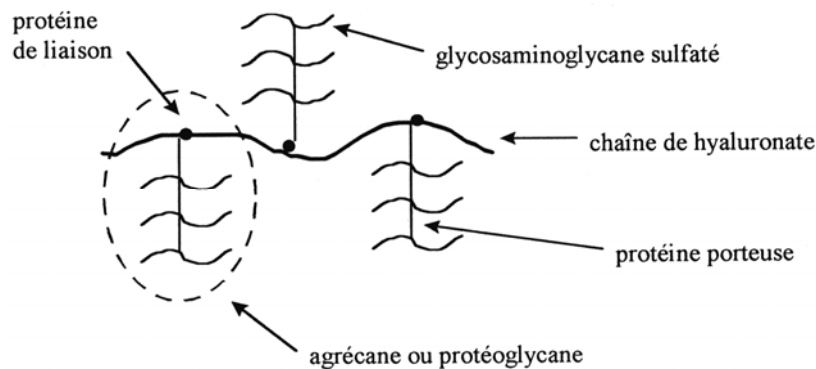
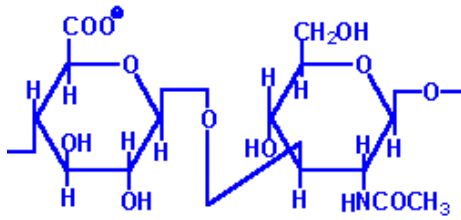


Figure I. 7 : Schéma du complexe formé par l'association entre les protéoglycanes et les chaînes de hyaluronate.

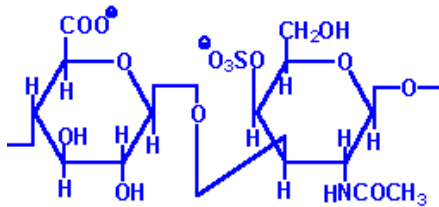
Les glycosaminoglycanes (GAG) sont de longues chaînes polysaccharidiques formées par la répétition de disaccharides composés d'un sucre aminé et d'un hexuronate (Figure I. 8). Chaque unité disaccharidique contient au minimum une charge négative sur le groupement carboxylate ou sulfate, faisant de ces molécules de longues chaînes anioniques, repoussant les molécules négatives, et captant les ions Ca^{2+} et Na^{+} qui attirent les molécules d'eau [52,53].

On distingue deux types de protéoglycanes dans le cartilage articulaire selon leur capacité d'agrégation à l'acide hyaluronique :

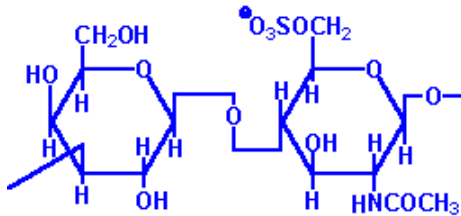
- Les macroprotéoglycanes, de masse molaire élevée, majoritairement représentés par l'agrégane.
- Les protéoglycanes de faible masse molaire comme la décorine, le biglycane, la fibromoduline.



Hyaluronate : composé de D-glucuronate + GlcNAc
Liaison $\beta(1, 3)$.



Chondroitin 4- and 6-sulfates : composé de D-glucuronate + GalNAc-4- or 6-sulfate
Liaison $\beta(1, 3)$.
(Ici schématisée GalNAc 4-sulfate)



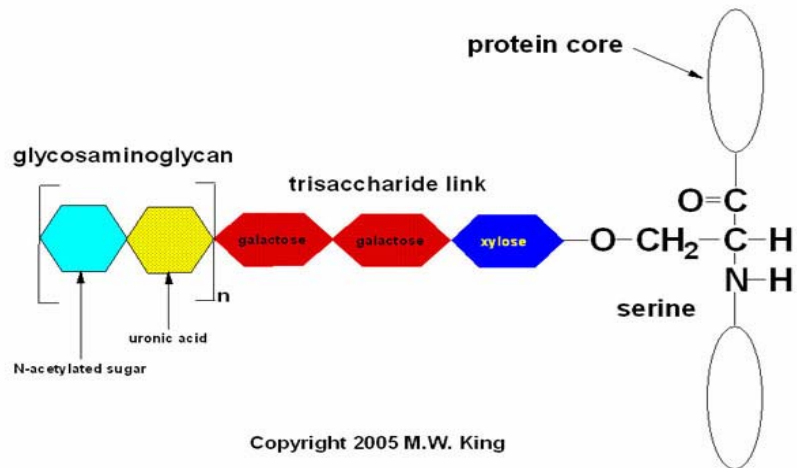
Keratan sulfates: composé de galactose + GlcNAc-6-sulfate
Liaison $\beta(1, 4)$

Figure I. 8 : Structure des trois principaux glycosaminoglycans (GAGs) du cartilage : l'acide hyaluronique, les chondroïtines sulfates et kératanes sulfates (GalNAc : N-acétylgalactosamine ; GlcNAc : N-acétylglucosamine) (web.indstate.edu/thcme/mwking/glycans.html)

Les grands protéoglycanes sont de grosses molécules formées par la liaison d'agrécane sur une longue molécule de hyaluronate.

Les petits protéoglycanes jouent un rôle important dans la formation des fibres de collagène et l'association avec celles-ci. De nombreuses autres protéines (anchoring CII, COMP, fibronectine et ténectine) interviennent également dans l'assemblage de la matrice et l'homéostasie du cartilage. Cette classe regroupe la décorine, le biglycane et la fibromoduline.

Ceux-ci ont en commun une même protéine porteuse centrale et ne diffèrent que par la qualité



et la quantité de leur GAG (

Figure I. 9). Ces molécules appartiennent à la famille des « protéines riches en leucine ». La décorine possède une seule chaîne de chondroïtine sulfate (ou dermatane sulfate). Le biglycane est formé de deux chaînes. La fibromoduline est constituée de plusieurs chaînes de kératane sulfate. Ces petits protéoglycannes contribuent faiblement à la masse totale des PGs (3%) [76]. En revanche, décorine et biglycane ont la particularité de pouvoir lier de nombreuses molécules de la matrice extracellulaire comme les collagènes II et VI, la fibronectine et certains facteurs de croissance. La fibromoduline peut également se lier au collagène II. Même si ces molécules n'ont pas de propriétés physiques dans le tissu, elles jouent un rôle dans la fonction cellulaire et l'organisation de la matrice collagénique.

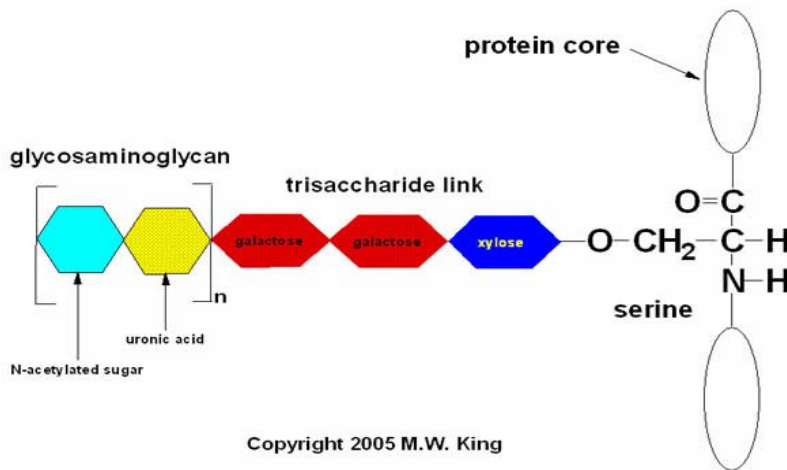


Figure I. 9 : Structure générale d'un protéoglycane montrant la liaison de la « protein core » avec le glycoaminoglycane (web.indstate.edu/thcme/mwking/glycans.html).

L'agrécan :

Les monomères d'agrécan sont constitués d'une protéine axiale de 237-248 kDa sur laquelle se fixe une centaine de chaînes de chondroïtine sulfate et une trentaine de chaînes de kératane sulfate. C'est la région N-terminale de cette protéine axiale qui se lie de façon covalente à une petite glycoprotéine ou link protein elle-même liée à une molécule d'acide hyaluronique. Plus de 300 molécules d'agrécan peuvent s'associer sur une même molécule d'acide hyaluronique et former ainsi des superagrégats de masse moléculaire élevée (5 à 50×10^4 kDa).

Les glycoprotéines :

Les glycoprotéines du cartilage articulaire interviennent dans l'architecture et le maintien tridimensionnel de la matrice extracellulaire. On a parlé de « glue intercollagénique » pour définir l'ensemble de ces molécules qui permettrait l'adhésion des molécules entre elles : molécules de collagène II entre elles et protéoglycane-collagène (exemples : la chondroadhérine, la fibromoduline, la fibronectine ou la ténascine).

II. LES PATHOLOGIES ET LEURS TRAITEMENTS :

Le cartilage ne possède qu'une capacité de régénération limitée, qui résulte à la fois d'un renouvellement faible de son contingent cellulaire et de son caractère avasculaire. Il peut être le siège de lésions liées à des pathologies inflammatoires, dégénératives, ou traumatiques. Dans le cadre des altérations post-traumatiques, ou de croissance (ostéochondrites), ces lésions chondrales, voire ostéochondrales, affectent plus volontiers un cartilage préalablement non altéré, chez des patients jeunes et actifs.

La première étape de la prise en charge des lésions focales du cartilage repose sur un bilan lésionnel précis, non pas tant par radiologie, que par Imagerie de Résonance Magnétique (IRM, non invasive). Dans un second temps, on a recours à une arthroscopie. Cette dernière technique, invasive, permet une exploration intra-articulaire sous anesthésie locorégionale, voire générale, du tissu cartilagineux : elle est principalement utilisée pour le genou.

Cette technique permet de classer les lésions selon leur profondeur en 4 grades établis par « l'International Cartilage Repair Society » et selon leur siège (condylien interne ou externe, rotulien, tibial) selon une topographie prédéfinie. Le grade I, stade précoce, se traduit par un ramollissement (chondromalacie) du cartilage. Il conduit secondairement à l'apparition de lésions superficielles (grade II) puis profondes (grade III) qui donneront ultérieurement une mise à nu de l'os sous-chondral dans cette zone (grade IV) (Figure I. 10) [77].

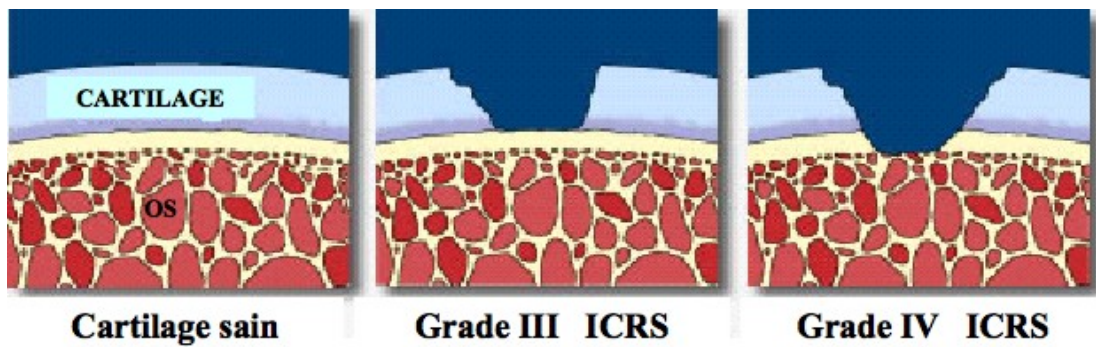


Figure I. 10 : Classification des lésions selon l'ICRS (International Cartilage Repair Society (<http://www.biotissue-tec.com/>))

Ces lésions, du grade I au grade III, sont des lésions chondrales, uniquement situées dans le cartilage alors que le stade IV correspond à des lésions ostéo-chondrales, atteignant par définition l'os sous-chondral.

II.1.1. Les lésions chondrales

Il s'agit, dans la plupart des cas, de fissurations ou de lésions de surface plus étendues. Ces lésions n'atteignent ni la couche de cartilage calcifié, ni l'os sous-chondral. Dans cette situation, un cartilage mature produit difficilement un tissu cicatriciel de qualité, raison pour laquelle on parle davantage de réparation du cartilage que de régénération. Ceci est en grande partie dû au caractère avasculaire du cartilage. Classiquement, le tissu péri-lésionnel participe activement à la tentative de réparation tissulaire en synthétisant, dans la mesure du possible, des composants matriciels nécessaires à l'ébauche de la cicatrisation.

II.1.2. Les lésions ostéochondrales

Les lésions profondes (ou ostéochondrales) atteignent l'os sous-chondral au-delà de la tide-mark et de la zone du cartilage calcifié. Contrairement au cartilage, la moelle osseuse hématogène renferme des cellules progénitrices et contient certains facteurs de croissance ainsi que des vaisseaux qui manquent au cartilage. Ainsi l'espace médullaire exposé au fond d'une lésion ostéochondrale participe activement à sa réparation [78, 79]. Dans ce cas, on observe le plus souvent la formation d'un caillot qui comble la lésion [80]. Les cellules mésenchymateuses envahissent alors ce caillot fibreux et vont s'y différencier en chondrocytes. A un stade ultérieur, le tissu de réparation atteint la surface articulaire

(resurfaçage). Dans le meilleur des cas, le tissu cicatriciel revêt un aspect natif, mais reste de nature fibrocartilagineuse : il est incapable de répondre au long cours aux contraintes biomécaniques articulaires et tend, progressivement, à se dégrader [81, 82].

II.2. LES TRAITEMENTS DE REPARATION DU CARTILAGE

Il existe plusieurs façons sinon de réparer le cartilage, du moins de soulager les douleurs liées aux pathologies, parmi lesquelles on distinguera les traitements pharmacologiques et ceux faisant appel à la chirurgie.

II.2.1. Les traitements pharmacologiques

Les trois principaux objectifs du traitement pharmacologique sont :

- soulager la douleur ou l'inconfort;
- rétablir une fonction articulaire adéquate;
- ralentir la dégénérescence du cartilage.

Aucune substance en ce moment ne peut remplir ces trois objectifs. Une combinaison de plusieurs produits reste souvent le meilleur traitement chez certains patients.

**Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)*

Les AINS demeurent le médicament de choix pour le traitement de la douleur et de l'inflammation associées à l'ostéoarthrose. Les AINS permettent de réaliser principalement les deux premiers objectifs du traitement pharmacologique.

Les traitements « au besoin » sont indiqués pour traiter des douleurs occasionnelles. Ces traitements sont prescrits pendant trois ou quatre jours afin de soulager ces crises.

Lorsque l'ostéoarthrose cause éventuellement de l'inconfort journalier, avec des symptômes qui peuvent varier d'une journée à l'autre (selon l'activité, la température, l'humidité, etc.), un traitement continu avec un AINS sécuritaire peut devenir un avantage chez ces patients :

- il réduit l'inflammation chronique
- il réduit l'inconfort journalier
- il améliore l'activité journalière
- il améliore la mobilité articulaire
- il améliore la masse et la force musculaire
- il peut éventuellement ralentir le processus dégénératif.

Ainsi, parmi les nombreux AINS, les dérivés de l'acide 2-aryl-propionique (« les profènes») ont montré leur efficacité dans la répression de molécules directement impliquées dans la destruction du cartilage comme NO, MMP-3 ou PGE(2) [83].

La voie d'inflammation impliquant le récepteur NF- κ B (largement étudié lors de processus inflammatoires) peut aussi être réprimée par des AINS de type aspirine, salicylate ou bien encore ibuprofène [84].

Certains agents de nature différente, peuvent ralentir la progression de l'ostéoarthrose. Ainsi, on a constaté que les suppléments nutritifs à base de glucosamine et de chondroïtine sulfate sont bien distribués dans toutes les articulations. Ces substances dites anti-arthrosiques à action lente (AAL) auraient un effet favorable sur les phénomènes anti-inflammatoires. Les mécanismes d'action différents de la glucosamine [85] et de la chondroïtine [85, 86] les rendent synergiques plutôt qu'additifs. La combinaison des deux est donc beaucoup plus efficace qu'une des deux substances prise seule. Ainsi de nombreuses études montrent que les prises orales de glycosaminoglycanes se répercutent localement au niveau des articulations.

Le hyaluronate est lui aussi une substance capable de favoriser la réparation du cartilage [87]. Il fait partie des AAL. Les caractéristiques de ses solutions aqueuses font qu'il peut améliorer les problèmes de lubrification des articulations (viscosupplémentation). Ses propriétés biologiques sont telles qu'elles activent la prolifération des chondrocytes et la synthèse des constituants de la matrice extracellulaire par l'intermédiaire de récepteurs membranaires spécifiques. Ces points précis seront développés dans le Chapitre II.

II.2.2. Les techniques chirurgicales de réparation du cartilage

Les possibilités thérapeutiques pour la réparation du cartilage par voie chirurgicale sont diverses. Les plus anciennes ont privilégié une stimulation locale du tissu ostéogénique (perforations, avivements divers, micro-fractures). Les procédés d'auto ou allogreffes de tissu cartilagineux mature (mosaïcplastie, allo ou autogreffes ostéochondrales) ont été proposés dans un second temps, puis les greffes de tissu immature ayant une capacité chondrogénique (greffes périostées pures, associées ou non aux greffes de chondrocytes).

II.2.2.1. Les techniques de réparation par stimulation locale du tissu ostéogénique

Ces techniques sont basées sur les capacités de différenciation des cellules mésenchymateuses de la moelle osseuse, potentialités stimulées par les facteurs de croissance libérés par le clou plaquettaire. La perte de substance cartilagineuse se comble progressivement par un tissu fibreux à partir du caillot provoqué par l'opérateur. Secondairement, une métaplasie des cellules mésenchymateuses provenant de l'os médullaire produit un tissu osseux immature, contenant une proportion variable de cartilage de type hyalin et de fibrocartilage.

Différentes techniques ont été proposées pour former ce caillot à l'intérieur du défaut cartilagineux : les perforations de Pridie, effectuées à la mèche à vitesse réduite, les chondroplasties abrasives de Johnson, les abrasions superficielles de Levy, et plus récemment les micro-fractures [86]. Cependant, certaines de ces techniques sont progressivement abandonnées car elles ne stimulent pas assez en profondeur les cellules mésenchymateuses.

La technique de micro-fracture (

Figure I. 11) semble la technique la plus utilisée aujourd'hui dans les techniques de réparation par stimulation locale [87].



Figure I. 11 : Technique de microfracture à droite (http://www.kneeclinic.info/problems_articular_cartilage.php) et forages de Pridie à gauche (<http://home.tiscali.be/oats/images/pridie.jpg>). Les deux techniques consistent à utiliser le système vasculaire de l'os sous-chondral pour la réparation de la lésion cartilagineuse.

Le recul sur cette technique est maintenant de plus de 10 ans, avec 80 % d'excellents et bons résultats à 11 ans de suivi. L'âge semble être un facteur prédictif important. L'effet bénéfique sur la fonction est reconnu notamment pour le genou. Le rôle inducteur chondrogénique des micro-fractures semble donc bien réel, malgré des concentrations en composants matriciels différentes de celles du cartilage normal, ce qui influe directement sur la résistance mécanique [88, 89].

Une étude publiée en 2005 associe la technique de micro-fracture à l'apport d'un biomatériau enrichi ou non en chondrocytes. La technique de micro-fracture seule améliore déjà le tissu de réparation à 16 semaines par rapport à une réparation spontanée. Les meilleurs résultats sont obtenus pour la modalité micro-fracture/biomatériaux enrichis en chondrocytes [90] (cf par. II.2.2.4. de cette partie).

II.5.2.2. Les techniques d'auto ou allogreffe de tissu cartilagineux mature

* Les greffes monobloc

Les allogreffes consistent en l'insertion de cartilage dans la lésion, avec ou sans l'os sous-chondral, provenant d'un organisme différent de celui du receveur. Dans la plupart des cas, les allogreffes proviennent de cadavre. La greffe doit être réalisée rapidement (48 h) et nécessite un traitement immunosuppresseur afin d'éviter son rejet. D'autres problèmes se posent quant à la transmission d'agents pathogènes et la préservation des tissus jusqu'à l'intervention chirurgicale [91].

Les allogreffes comportent donc un risque viral et ne sont pas utilisées en France bien que leur évaluation histologique soit satisfaisante.

* Les greffes mosaïques (mosaicplasty)

Elles limitent la morbidité du site donneur par rapport aux greffons monobloc et s'adaptent à la demande à la lésion cartilagineuse. Les autogreffes cylindriques en mosaïque ont connu un important essor ces 10 dernières années, sous l'impulsion de Hangody [92]. Le principe est d'auto-transplanter des cylindres cartilagineux avec leur couche d'os sous-chondral depuis des zones non fonctionnelles dans le site lésionnel (Figure I. 12).

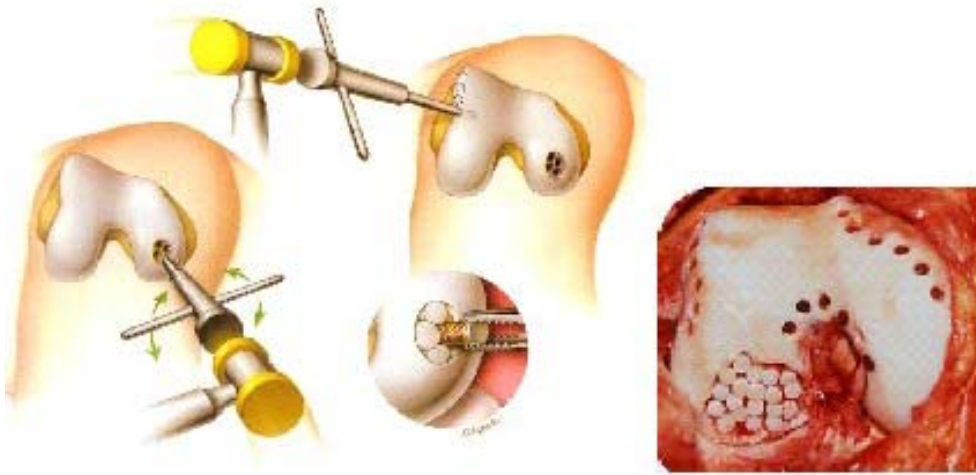


Figure I. 12 : Principe de la mosaïcoplasty à gauche et image chirurgicale à droite. Le site lésionnel est foré et comblé par des greffons ostéocondraux pris en zone non-portante.
(<http://perso.wanadoo.fr/corine.bensimon/versier02.htm>)

Le genou et le dôme astragalien sont des localisations avec des résultats validés pour la greffe mosaïque avec 80 % à 94 % de bons et excellents résultats pour des lésions de l'astragale. D'autres localisations sont théoriquement possibles : tête fémorale, capitellum, tête humérale. Les lésions de la rotule ont cependant des résultats nettement inférieurs [93].

Il est maintenant démontré par des biopsies post-opératoires que cette technique apporte du cartilage hyalin [94]. Cependant, le comblement entre les cylindres se fait par du fibrocartilage. Par ailleurs, les cylindres sont prélevés sur des zones non portantes et la résistance à la compression de ce cartilage est mal connue à long terme. Actuellement les greffes mosaïques sont réservées à des sujets de moins de 50 ans, pour des lésions focales de moins de 3 cm² nécessitant moins de 6 greffons, sans lésion en miroir et sans désaxation défavorable du membre inférieur.

II.2.2.3. Les techniques d'auto ou allogreffe de tissu cartilagineux immature à capacité chondrogénique

Le principe de ces techniques repose sur l'implantation, en site lésionnel de tissu chondrogénique capable de se différencier pour aboutir à la formation de tissu cartilagineux.

* Les greffes périostées ou périchondrales

Il peut s'agir de greffes périostées utilisées depuis les années 80. On place un lambeau libre retourné de périoste sur le site lésionnel préalablement avivé et micro-fracturé. La formation de cartilage provient de la couche profonde du périoste riche en cellules chondrales et en facteurs de croissance. Une étude clinique [95], réalisée chez des patients âgés en moyenne de 32 ans (16 à 53 ans) rapporte, après une période de 33 à 92 mois, un pourcentage

de réussite de 76% lorsque la greffe de périoste est associée à une mobilisation passive continue.

Les résultats de la littérature sont contradictoires, avec des résultats de satisfaction allant de 0 % à 75 %. L'utilisation de ces patches est plus restreinte actuellement mais le périoste reste néanmoins un sujet d'étude pour évaluer les facteurs de croissance cellulaire sur les cellules à potentiel chondrogénique. Les inconvénients résident dans la dégradation secondaire observée due à la diminution du taux des cellules progénitrices avec l'âge et à l'ossification du patch à moyen terme.

* Les greffes de chondrocytes autologues

Mis au point par une équipe suédoise de Göteborg [96] en 1987, ce procédé original consiste à prélever par arthroscopie une petite quantité (200 mg) de cartilage sain en zone non portante (Figure I. 13).

Après avoir été débarrassées de leur matrice, les cellules sont mises en culture pendant 3 semaines. Une douzaine de millions de chondrocytes viables à 80 % sont ainsi obtenus. Ce contingent cellulaire est injecté dans un second temps sous un patch de périoste rendu étanche par suture et colle biologique, ce qui permet à l'explant de rester dans la lésion cartilagineuse préalablement avivée.

Le périoste, en plus de la fonction recouvrante, joue le rôle d'une membrane semi-perméable permettant la nutrition des chondrocytes transplantés par le liquide synovial, la stimulation de leur division et de leur croissance locale en apportant certains facteurs de croissance. Après quelques heures d'immobilité, la mobilisation activo-passive de l'articulation est demandée sans appui pendant 8 semaines. Le sport est repris après un délai minimal de 12 mois.

La difficulté principale de cette technique réside dans la réalisation d'un patch périosté étanche. Le coût de la technique tout comme la lourdeur de sa mise en œuvre nécessitent des structures agréées et sont actuellement à prendre en compte, ce qui fait qu'il n'existe, hors protocole de recherche clinique, aucune structure de soins française susceptible de réaliser ce type d'investigation.

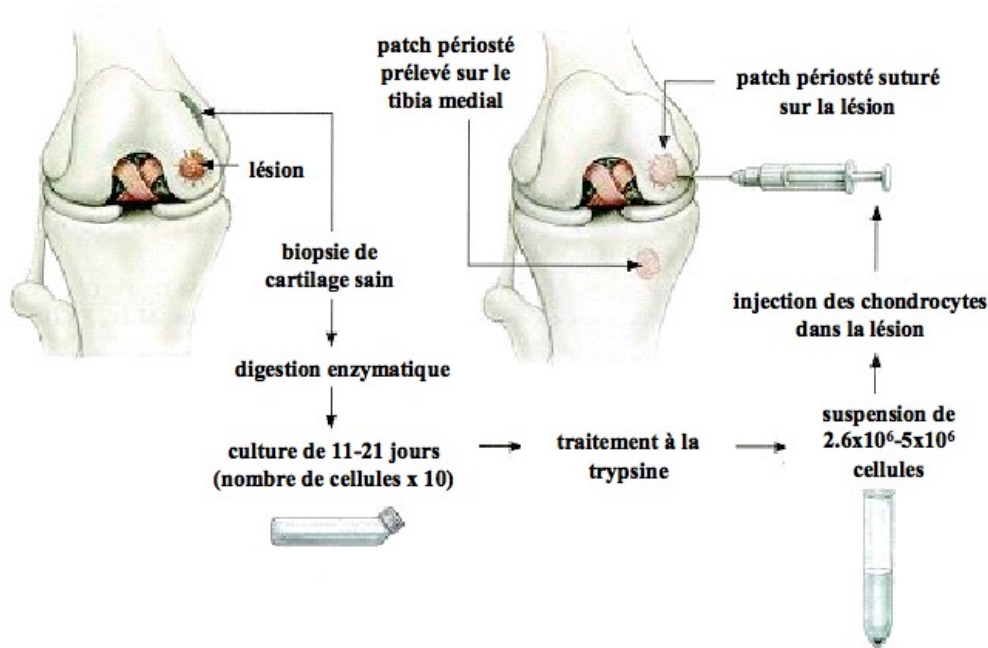


Figure I. 13 : Principe de l'implantation de cellules autologues. Une biopsie de cartilage est réalisée afin de récupérer des chondrocytes qui sont cultivés en monocouche avant d'être réimplantés dans le site lésionnel sous un patch étanche de périoste.

Les résultats ont été évalués en clinique (sur trois types de scores), lors de révisions arthroscopiques, de biopsies (pour confirmer le phénotype de cartilage de type hyalin à long terme) et de tests d'indentation. Un an après l'implantation, les chondrocytes sont encore capables de produire du collagène [97].

II.2.2.4. Les matériaux de comblement

Dès que les zones profondes du cartilage sont atteintes, c'est-à-dire dès l'apparition de lésions ostéochondrales, la réparation spontanée de ces lésions conduit, dans la plupart des cas, à la formation d'un tissu fibrocartilagineux et le seul remède est leur comblement chirurgical à l'aide de matériaux implantables.

Dans le cas où l'organe lésé est susceptible de se réparer avec une aide exogène, il est préférable d'utiliser des implants à action temporaire, c'est-à-dire biorésorbables, et capables d'interagir avec le tissu lésé afin de servir de tuteur à la synthèse d'un nouveau tissu. Ce type d'implants est plus généralement appelé biomatériau de comblement.

➤ Cahier des charges d'un biomatériau de comblement :

L'objectif est de concevoir un implant capable, d'une part, de combler les lésions ostéochondrales en assumant les exigences mécaniques liées au rôle de l'articulation dans

l'appareil locomoteur et d'autre part, de servir de tuteur à la régénération tissulaire. Pour cela, un cahier des charges des biomatériaux de comblement peut être défini [82, 98, 99].

Le biomatériau idéal doit :

- Posséder des propriétés de dureté, de résistance mécanique et de déformation se rapprochant le plus possible de celles du cartilage articulaire,
- Etre malléable pour pouvoir être facilement implanté et s'adapter au mieux à la forme de la lésion,
- Etre stérilisable par des méthodes conventionnelles et être stable à la stérilisation,
- Etre biodégradable, mais dans un temps assez long pour pouvoir jouer son rôle mécanique tant que le tissu de réparation n'est pas totalement reconstitué,
- Etre hydrophile et suffisamment poreux pour servir de support à la recolonisation cellulaire, sa porosité devant alors être un compromis entre les exigences mécaniques et l'aptitude à induire cette recolonisation,
- Etre biocompatible, non toxique, non immunogène et non carcinogène,
- Si possible, posséder des propriétés vectrices, afin de permettre l'administration conjointe d'un facteur exogène de bioactivation, visant à favoriser et accélérer l'apparition d'un tissu de réparation.

Au vu du cahier des charges, il est manifeste que l'élaboration d'un matériau réunissant toutes les qualités requises pour constituer le substitut cartilagineux idéal, est une tâche particulièrement complexe.

➤ Les différents types de biomatériaux de comblement :

A la fin des années 80, les recherches se sont dirigées vers la conception de matériaux de comblement à base de polymères synthétiques ou d'origine naturelle, qui peuvent également être utilisés en association avec des cultures cellulaires. Des complements de lésions ont en effet été effectués par des polyuréthanes [100], des poly-éther-imide-uréthanes [101], des copolymères d'éthylméthacrylate et de tétrahydrofurfurylméthacrylate [102] ou des polyesters (PLA, PGA ou copolymères PLA-PGA) [103].

Mais, depuis quelques années de nombreuses revues soulignent l'intérêt de l'utilisation d'hydrogels dans l'ingénierie tissulaire. D'un point de vue mécanique, les hydrogels, qu'ils soient synthétiques ou d'origine naturelle, présentent l'avantage d'utiliser l'eau de la même façon que le cartilage. Sous l'action d'une pression, l'eau sort de l'hydrogel, ce qui permet à

ce dernier d'absorber les chocs. Puis, une fois la pression relâchée, l'eau reprend sa place dans le matériau et celui-ci retrouve son volume initial.

Sur un plan biologique, les hydrogels peuvent convenir pour jouer le rôle de support de culture cellulaire. En effet, à condition d'avoir contrôlé l'absence d'éléments potentiellement toxiques au sein de ces matériaux, leur caractère hydrophile les rend susceptibles de présenter une bonne compatibilité. En outre, ils peuvent offrir un environnement tridimensionnel suffisamment poreux pour permettre la prolifération cellulaire et le transport des différents nutriments qui lui sont nécessaires. Certains types d'hydrogels possèdent également un caractère hydrophobe qui favorise l'adsorption des protéines comme par exemple, la fibronectine, et donc l'adhésion cellulaire.

Différents hydrogels utilisés comme biomatériaux de comblement ont déjà été préparés :

- A partir de polymères synthétiques : poly(alcool vinylique) (PVA), dérivés du poly(acide acrylique) (PAA), poly(oxyde d'éthylène) (POE)...
- A partir de polymères naturels : collagène, fibrine, polypeptides, chitosane, alginate, hyaluronate.

Nous donnons ci-après quelques exemples de ces hydrogels.

Pour obtenir des hydrogels à partir de polymères synthétiques ou naturels linéaires, il est nécessaire de réticuler les chaînes. Cette réticulation peut être chimique avec des liaisons covalentes ou physiques avec des liaisons réversibles de faible énergie. Ainsi parmi les réticulants chimiques on peut citer le glutaraldéhyde, l'épichlorhydrine, les chlorures de succinyle, adipoyle et sébacoyle, la divinylsulfone... Cependant le plus souvent ces gels ne sont pas (bio)dégradables et sont plutôt préconisés pour l'ingénierie tissulaire. Le hyaluronate a lui aussi été réticulé par voie chimique pour donner des dérivés utilisables en réparation et ingénierie du cartilage. Nous y reviendrons plus en détail dans le chapitre II, paragraphe I.4.

Pour la réticulation chimique, on peut également fixer sur le polymère de base, un monomère photopolymérisable, comme des dérivés d'acide méthacrylique, et soumettre le polymère résultant à une irradiation UV-Vis. Cette technique a été appliquée au PVA [104] au POE [105], au collagène [106], au hyaluronate [107]...

Pour obtenir des gels physiques, il faut que des liaisons de faible énergie s'établissent entre différentes chaînes macromoléculaires. Ce peut être des liaisons ioniques, hydrogène, des forces de Van der Waals ou des « interactions » hydrophobes. Ainsi le poly(N-

isopropylacrylamide) (PNIPAAm) soluble dans l'eau à température modérée, forme des hydrogels quand on augmente la température, par établissement d'interactions hydrophobes. Ce polymère peut être injecté à température ambiante sous forme de solution visqueuse et donne naissance à un hydrogel à la température de l'organisme. Stile et coll. [108] l'ont utilisé comme hydrogel injectable pour des applications concernant le cartilage.

Le hyaluronate substitué par des groupes hydrophobes peut également former des hydrogels en solution aqueuse dont les propriétés mécaniques dépendent de la composition des polymères. Ils ont été utilisés pour la réparation du cartilage [109]. Cette approche sera détaillée dans le chapitre II.

Des protéines et des polypeptides peuvent également former des hydrogels grâce à une combinaison de liaisons hydrogène, de forces de Van der Waals, d'interactions ioniques et hydrophobes, gels qui sont proposés pour la réparation du cartilage. Parmi ces composés, on peut citer le collagène [110], la fibrine [111], des polypeptides à base de lysine, de leucine et d'asparagine [112]...

Enfin l'alginate forme de nombreuses liaisons ioniques avec l'ion calcium, ce qui conduit à la mise en place d'un réseau tridimensionnel en milieu aqueux et donc d'un hydrogel.

III. CONCLUSION DU CHAPITRE

Dans ce chapitre, nous avons commencé par décrire de manière générale, le processus de vectorisation de médicaments par l'utilisation de nanoparticules polymères. Nous avons ainsi montré qu'il est possible de transporter *in vivo* des molécules bioactives en les protégeant contre les différents types d'agression, de prolonger leur durée de vie et de promouvoir leur libération progressive. Nous avons également décrit le concept de ciblage qui permet d'orienter la libération dans un site précis. Parmi les différents types d'adressage, le ciblage actif utilise la reconnaissance spécifique entre la surface des nanoparticules et par exemple un récepteur de la membrane des cellules cibles.

Dans une deuxième partie, nous avons abordé les propriétés du cartilage et avons décrit ses différents constituants. Nous avons montré que les cellules qui le composent, les chondrocytes, présentent en surface un récepteur spécifique de l'acide hyaluronique, le CD44. Par ailleurs nous avons abordé les pathologies de ce tissu et avons évoqué les divers moyens de les traiter. Il existe ainsi des traitements pharmacologiques qui utilisent des anti-inflammatoires non stéroïdiens ou des «anti-arthrosiques» d'action lente (AAL).

Dans le travail que nous avons réalisé, nous avons alors eu comme objectif de préparer des nanoparticules polymères (bio)dégradables pour vectoriser des AAL et, pour permettre leur libération à proximité ou à l'intérieur des chondrocytes, nous avons envisagé de disposer à la surface des nanosphères, des chaînes d'acide hyaluronique pour promouvoir leur reconnaissance par les chondrocytes.

BIBLIOGRAPHIE

1. Benoit J.P., Couvreur P., Devissaguet J. P., Fessi H., Puisieux F. and Roblot-Treupel L., "*Carrier*" or "*modulated distribution*" forms, new systems for drug administration. J Pharm Belg, 1986. **41**: p. 319-329.
2. Benoit J.P., Marchais H., Rolland H. and Vande Velde V., *3.biodegradable Microspheres:advances in production technology*, in *Microencapsulation. Methods and industrial applications*, S. Benita, Editor. 1996, Dekker M.: New York, Basel, Hong Kong. p. 35-72.
3. Delattre J., Couvreur P., Puisieux F., Philippot J.R. and Schuber F, *Les liposomes: aspects technologiques, biologiques et pharmacologiques*, L.E. INSERM, Editor. 1993, Tec & Doc-Lavoisier: Paris.
4. Kang E., Akiosyoshi K. and Sunamoto J., *Surface coating liposomes with hydrophobized polysaccharides*. J. Bioact. Compat. Polym., 1997. **12**: p. 14-26.
5. Gabizon, A., Shmeeda H. and Barenholz Y., *Pharmacokinetics of pegylated liposomal Doxorubicin: review of animal and human studies*. Clin Pharmacokinet, 2003. **42**: p. 419-436.
6. Pedersen K.L., Bergenstahl B. and Kristensen H.G., *Solid state characterization of a dry emulsion : a potential drug delivery system*. Int. J. Pharm., 1998. **171**: p. 257-270.
7. Hagan S.A., Coombes A.G.A., Garnett M.C., Dunn S.E., Davies M.C., Illum L., Davis S.S., Harding S.E., Purkiss S. and Gellert P.R., *Poly(lactide-poly(ethylene glycol) copolymers as drug delivery systems. 1. Characterization of water dispersible micelle-forming systems*. Langmuir, 1996. **12**: p. 2153-2158.
8. Takeuchi, H., Yamamoto H. and Kawashima Y., *Mucoadhesive nanoparticulate systems for peptide drug delivery*. Adv Drug Deliv Rev, 2001. **47**: p. 39-54.
9. Kawashima Y., Yamamoto H., Takeuchi H., Fujioka S. and Hino T., *Pulmonary delivery of insulin with nebulized DL-lactide/glycolide copolymer (PLGA) nanospheres to prolong hypoglycemic effect*. J Control Release, 1999. **62**: p. 279-287.
10. Lambert G., Fattal E. and Couvreur P., *Nanoparticulate systems for the delivery of antisense oligonucleotides*. Adv Drug Deliv Rev, 2001. **47**: p. 99-112.
11. Couvreur P., *XIV. Vecteurs nanoparticulaires de médicaments*, in *Formes pharmaceutiques nouvelles*, J.-P. Benoit, Editor. 1985, Lavoisier: Paris. p. 577-611.
12. Dellacherie E., Gref R. and Quellec P., *les nanosphères "furtives" comme nouvelles formes galéniques injectables:espoirs et réalités*, in *Médecine/Sciences*. 2001. p. 619-626.
13. Langer R. and Folkman J., *Polymers for the sustained release of proteins and other macromolecules*. Nature, 1976. **263**: p. 797-800.
14. Blanco D. and Alonso M.J., *Development and characterization of protein-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanospheres*. Eur. J. Pharm. Biopharm., 1997. **43**: p. 287-294.
15. Zambaux M.F., Bonneaux F., Gref R., Dellacherie E. and Vigneron C., *Preparation and characterization of protein C-loaded PLA nanoparticles*. J Control Release, 1999. **60**: p. 179-188.
16. Brigger I., Dubernet C. and Couvreur P., *Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis*. Adv Drug Deliv Rev, 2002. **54**: p. 631-651.
17. Passirani C., Barratt G., Devissaguet J. P. and Labarre D., *Long-circulating nanoparticles bearing heparin or dextran covalently bound to poly(methyl methacrylate)*. Pharm Res, 1998. **15**: p. 1046-1050.

18. Gref R., Minamitake Y., Peracchia M.T., Trubetskoy V., Torchilin V. and Langer R., *Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres*. Science, 1994. **263**: p. 1600-1603.
19. Gref R., Luck M., Quellec P., Marchand M., Dellacherie E., Harnisch S., Blunk T. and R.H. Muller, *'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2000. **18**: p. 301-313.
20. Passirani C., Barratt G., Devissaguet J.P. and Labarre D., *Long-circulating nanoparticles bearing heparin or dextran covalently bound to poly(methyl methacrylate)*. Pharm Res, 1998. **15**: p. 1046-1050.
21. Lemarchand C., Gref R., Passirani C., Garcion E., Petri B., Muller R., Costantini D. and Couvreur P., *Influence of polysaccharide coating on the interactions of nanoparticles with biological systems*. Biomaterials, 2006. **27**: p. 108-118.
22. Ehrlich P., *The collected papers of Paul Ehrlich*, ed. Pergamon. Vol. 3. 1960, London.
23. Song C., Labhasetwar V., Cui X., Underwood T. and Levy R.J., *Arterial uptake of biodegradable nanoparticles for intravascular local drug delivery: results with an acute dog model*. J Control Release, 1998. **54**: p. 201-211.
24. Matsumura Y. and Maeda H., *A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs*. Cancer Res., 1986. **46**: p. 6387-6392.
25. Labhasetwar V., Song C., Humphrey W., Shebuski R. and Levy R.J., *Arterial uptake of biodegradable nanoparticles: effect of surface modifications*. J Pharm Sci, 1998. **87**: p. 1229-1234.
26. Balland O., Pinto-Alphandary H., Viron A., Puvion E., Andreumont A. and Couvreur P., *Intracellular distribution of ampicillin in murine macrophages infected with Salmonella typhimurium and treated with (3H)ampicillin-loaded nanoparticles*. J Antimicrob Chemother, 1996. **37**: p. 105-115.
27. Fahmy T.M., Fong P.M., Goyal A. and Saltzman W.M., *Targeted for drug delivery*, in *Nanotoday*. 2005. p. 18-26.
28. Lubbe A.S., Alexiou C. and Bergemann C., *Clinical applications of magnetic drug targeting*. J Surg Res, 2001. **95**: p. 200-206.
29. Veyret R., Delair T. and Elaissari A., *Preparation and biomedical application of layer-by-layer encapsulated oil in water magnetic emulsion*. J. Magn. Magn. Mater., 2005. **239**: p. 171-176.
30. Chytrý V. and Ulbrich K., *Conjugate of doxorubicin with a thermosensitive polymer drug carrier*. J. Bioact. Compat. Polym., 2001. **16**: p. 427-440.
31. Lindner L.H., Eichhorn M.E., Eibl H., Teichert N., Schmitt-Sody M., Issels R.D. and Dellian M., *Novel temperature-sensitive liposomes with prolonged circulation time*. Clin Cancer Res, 2004. **10**: p. 2168-2178.
32. Samuel E., *Ultrasound used to target drug delivery in the brain.*, in *New scientist*, P. Edition, Editor. 2001.
33. Akiyoshi K., Kobayashi S., Shichibe S., Mix D., Baudys M., Kim S.W. and Sunamoto J., *Self-assembled hydrogel nanoparticle of cholesterol-bearing pullulan as a carrier of protein drugs: complexation and stabilization of insulin*. J Control Release, 1998. **54**: p. 313-320.
34. Lemarchand C., Couvreur P., Besnard M., Costantini D. and Gref R., *Novel polyester-polysaccharide nanoparticles*. Pharm Res, 2003. **20**: p. 1284-1292.

35. Ydens I., Degee P., Nouvel C., Dellacherie E., Six J.L. and Dubois P., *Surfactant-free stable nanoparticles from biodegradable and amphiphilic poly(epsilon-caprolactone)-grafted dextran copolymers*, E-polymers, Editor. 2005.
36. Nouvel C., Frochet C., Sadtler V., Dubois P., Dellacherie E. and Six J.L., *Poly(lactide)-grafted dextrans : synthesis and properties at interfaces and in solution*. Macromolecules, 2004. **37**: p. 4981-4988.
37. Quellec P., Gref R., Perrin L., Dellacherie E., Sommer F., Verbavatz J.M. and Alonso M.J., *Protein encapsulation within polyethylene glycol-coated nanospheres. I. Physicochemical characterization*. J Biomed Mater Res, 1998. **42**: p. 45-54.
38. Zambaux M.F., Bonneaux F., Gref R., Dellacherie E. and Vigneron C., *Protein C-loaded monomethoxypoly (ethylene oxide)-poly(lactic acid) nanoparticles*. Int J Pharm, 2001. **212**: p. 1-9.
39. Zambaux M.F., Bonneaux F., Gref R., Dellacherie E. and Vigneron C., *MPEO-PLA nanoparticles: effect of MPEO content on some of their surface properties*. J Biomed Mater Res, 1999. **44**: p. 109-115.
40. Calvo P., Gouritin B., Chacun H., Desmaele D., D'Angelo J., Noel J.P., Georgin D., Fattal E., Andreux J.P. and Couvreur P., *Long-circulating PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles as new drug carrier for brain delivery*. Pharm Res, 2001. **18**: p. 1157-1166.
41. Scholes P.D., Coombes A.G., Illum L., Davis S.S., Watts J.F., Ustariz C., Vert M. and Davies M.C., *Detection and determination of surface levels of poloxamer and PVA surfactant on biodegradable nanospheres using SSIMS and XPS*. J Control Release, 1999. **59**: p. 261-278.
42. Rouzes C., Gref R., Leonard M., De Sousa Delgado A. and Dellacherie E., *Surface modification of poly(lactic acid) nanospheres using hydrophobically modified dextrans as stabilizers in an o/w emulsion/evaporation technique*. J Biomed Mater Res, 2000. **50**: p. 557-565.
43. Chognot D., Six J.L., Leonard M., Bonneaux F., Vigneron C. and Dellacherie E., *Physicochemical evaluation of PLA nanoparticles stabilized by water-soluble MPEO-PLA block copolymers*. J Colloid Interface Sci, 2003. **268**: p. 441-447.
44. Chognot D., Leonard M., Six J.L. and Dellacherie E., *Surfactive water-soluble copolymers for the preparation of controlled surface nanoparticles by double emulsion/solvent evaporation*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2006. **51**: p. 86-92.
45. Messai I., *Elaboration de particules cationiques biodégradables comme vecteurs d'acides nucléiques*. 2004, Thèse de Doctorat de l'Université Claude Bernard-Lyon I.
46. Gautier S., Grudzielski N., Goffinet G., de Hassonville S.H., Delattre L. and Jérôme R., *Preparation of poly(D,L-lactide) nanoparticles assisted by amphiphilic poly(methyl methacrylate-co-methacrylic acid) copolymers*. J Biomater Sci Polym Ed, 2001. **12**: p. 429-450.
47. Moein Moghimi S., Hunter A.C. and Murray J.C., *Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice*. Pharmacol. Rev., 2001. **53**: p. 283-318.
48. Stella B., Arpicco S., Peracchia M.T., Desmaele D., Hoebeke J., Renoir M., D'Angelo J., Cattel L. and Couvreur P., *Design of folic acid-conjugated nanoparticles for drug targeting*. J Pharm Sci, 2000. **89**: p. 1452-1464.
49. Stella B., Arpicco S., Peracchia M. T., Desmaele D., Hoebeke J. Renoir M., D'Angelo J., Cattel L. and Couvreur P., *Design of folic acid-conjugated nanoparticles for drug targeting*. J Pharm Sci, 2000. **89**: p. 1452-1464.
50. DeFrees S.A., Phillips L., Guo L. and Zalipsky S., *Sialyl Lewis X liposomes as a multivalent ligand and inhibitor of E-selectin mediated cellular adhesion*. J. Am. Chem. Soc., 1996. **118**: p. 6101-6104.

51. Liang H.F., Chen C.T., Chen S.C., Kulkarni A.R, Chiu Y.L., Chen M.C. and Sung H.W., *Paclitaxel-loaded poly(gamma-glutamic acid)-poly(lactide) nanoparticles as a targeted drug delivery system for the treatment of liver cancer*. Biomaterials, 2006. **27**: p. 2051-2059.
52. Dinauer N., Balthasar S., Weber C., Kreuter J., Langer K. and Von Briesen H., *Selective targeting of antibody-conjugated nanoparticles to leukemic cells and primary T-lymphocytes*. Biomaterials, 2005. **26**: p. 5898-5906.
53. Eliaz R.E. and Szoka F.C., *Liposome-encapsulated doxorubicin targeted to CD44: a strategy to kill CD44-overexpressing tumor cells*. Cancer Res, 2001. **61**: p. 2592-2601.
54. Khan S.A., Cook A.C., Kappil M., Gunthert U., Chambers A.F., Tuck A.B. and Denhardt D.T., *Enhanced cell surface CD44 variant (v6, v9) expression by osteopontin in breast cancer epithelial cells facilitates tumor cell migration: novel post-transcriptional, post-translational regulation*. Clin Exp Metastasis, 2005. **22**: p. 663-673.
55. Naor D. and Nedvetzki S., *CD44 in rheumatoid arthritis*. Arthritis Res Ther, 2003. **5**: p. 105-115.
56. Chevalier X., *The normal cartilage. Physiopathology of arthrosis*. Press med, 1998. **27**: p. 75-80.
57. Glimet T., *Les effets de la pression sur les propriétés du cartilage normal et physiologique et pathologique*, in *Expansion Scientifique Française*, R.A. Séze S, Khan MF, Editor. 1993: Paris. p. 229-238.
58. Kronenberg H.M., *Developmental regulation of the growth plate*. Nature, 2003. **423**: p. 332-336.
59. Olsen B.R., Reginato A.M. and Wang W., *Bone development*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2000. **16**: p. 191-220.
60. Corvol M.T., *The chondrocyte: from cell aging to osteoarthritis*. Joint Bone Spine, 2000. **67**: p. 557-560.
61. Lee Y.J., Lee E.B., Kwon Y.E., Lee J.J., Cho W.S., Kim H.A. and Song Y.W., *Effect of estrogen on the expression of matrix metalloproteinase (MMP)-1, MMP-3, and MMP-13 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in osteoarthritis chondrocytes*. Rheumatol Int, 2003. **23**: p. 282-288.
62. Thonar M.A., Masuda K., Manicourt D.H. and Kuettner K.E, *Structure and function of normal adult articular cartilage*, in *Osteoarthritis: clinical and experimental aspects*, P.J. Reginster JY, Maretl-Pelletier J, Henrotin Y, Editor. 1999, Springer Verlag: Berlin. p. 1-19.
63. Wu W., Billingham R.C., Pidoux I., Antoniou J., Zukor D., Tanzer M. and Poole A.R., *Sites of collagenase cleavage and denaturation of type II collagen in aging and osteoarthritic articular cartilage and their relationship to the distribution of matrix metalloproteinase 1 and matrix metalloproteinase 13*. Arthritis Rheum, 2002. **46**: p. 2087-2094.
64. Mitrovic D., Quintero M., Stankovic A. and Ryckewaert A., *Cell density of adult human femoral condylar articular cartilage. Joints with normal and fibrillated surfaces*. Lab Invest, 1983. **49**: p. 309-316.
65. Vignon E., Arlot M., Patricot L.M. and Vignon G., *The cell density of human femoral head cartilage*. Clin Orthop Relat Res, 1976: p. 303-308.
66. Mobasheri A., Vannucci S.J., Bondy C.A., Carter S.D., Innes J.F., Arteaga M.F., Trujillo E., Ferraz I., Shakibaei M. and Martin-Vasallo P., *Glucose transport and metabolism in chondrocytes: a key to understanding chondrogenesis, skeletal development and cartilage degradation in osteoarthritis*. Histol Histopathol, 2002. **17**: p. 1239-1267.

67. Shlopov B.V., Lie W.R., Mainardi C.L., Cole A.A., Chubinskaya S. and Hasty K.A., *Osteoarthritic lesions: involvement of three different collagenases*. Arthritis Rheum, 1997. **40**: p. 2065-2074.
68. Flannery C.R., Little C.B., Hughes C.E. and Caterson B., *Expression and activity of articular cartilage hyaluronidases*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **251**: p. 824-829.
69. Marcelino J. and McDevitt C.A., *Attachment of articular cartilage chondrocytes to the tissue form of type VI collagen*. Biochim Biophys Acta, 1995. **1249**: p. 180-188.
70. Urban J.P., *Present perspectives on cartilage and chondrocyte mechanobiology*. Biorheology, 2000. **37**: p. 185-190.
71. Bordji K., Payan E., Oerther S., Baptiste D., Cipolletta C., Jouzeau J.Y., Mainard D. and Netter P., *Biomatériaux polysaccharidiques*, in *Actualités en biomatériaux*, R. Ed., Editor. 1998: Paris. p. 397.
72. Bruckner P. and Van Der Rest M., *Structure and function of cartilage collagens*. Microsc Res Tech, 1994. **28**: p. 378-384.
73. Pujol J.P., *Negma Laboratories Ed.*, in *Atlas de l'arthrose*. 1995.
74. Berenbaum, F., *Anatomopathologie et pathogénie de l'arthrose*, in *Rev. Rhum Mal Osteoartic*. 2000. p. 119-125.
75. Schurtz J. and Ribitsch V., *Rheology of synovial fluid*. Biorheology, 1987. **24**: p. 385-399.
76. Huber M., Trattinig S. and Lintner F., *Anatomy, biochemistry, and physiology of articular cartilage*. Invest Radiol, 2000. **35**: p. 573-80.
77. Outerbridge R.E., *The etiology of chondromalacia patellae*. 1961. Clin Orthop Relat Res, 2001: p. 5-8.
78. Hunziker E.B., *Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects*. Osteoarthritis Cartilage, 2002. **10**: p. 432-463.
79. Caplan A.I., *Cartilage*. Sci Am, 1984. **251**: p. 84-87, 90-94.
80. Shapiro F., Koide S. and Glimcher M.J., *Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage*. J Bone Joint Surg Am, 1993. **75**: p. 532-553.
81. Temenoff J.S. and Mikos A.G., *Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage*. Biomaterials, 2000. **21**: p. 431-440.
82. Frenkel S.R. and Di Cesare P.E., *Scaffolds for articular cartilage repair*. Ann Biomed Eng, 2004. **32**: p. 26-34.
83. Panico A.M., Cardile V., Gentile B., Garufi F., Avondo S. and Ronsisvalle S., *"In Vitro" Differences among (R) and (S) Enantiomers of Profens in their Activities Related to Articular Pathophysiology*. Inflammation, 2005. **29**: p. 119-28.
84. Roman-Blas J. A. and Jimenez S. A., *NF-kappaB as a potential therapeutic target in osteoarthritis and rheumatoid arthritis*. Osteoarthritis Cartilage, 2006. **14**: p. 839-48.
85. Dechant J.E., Baxter G.M., Frisbie D.D., Trotter G.W. and McIlwraith C.W., *Effects of glucosamine hydrochloride and chondroitin sulphate, alone and in combination, on normal and interleukin-1 conditioned equine articular cartilage explant metabolism*. Equine Vet J, 2005. **37**: p. 227-31.
86. Steadman J.R., Rodkey W.G. and Rodrigo J.J., *Microfracture: surgical technique and rehabilitation to treat chondral defects*. Clin Orthop Relat Res, 2001: p. S362-369.
87. Mithoefer K., Williams R.J., Warren R.F., Potter H.G., Spock C.R., Jones E.C., Wickiewicz T.L. and Marx R.G., *Chondral resurfacing of articular cartilage defects in the knee with the microfracture technique. Surgical technique*. J Bone Joint Surg Am, 2006. **88**: p. 294-304.

88. Steadman J.R., Miller B.S., Karas S.G., Schlegel T.F., Briggs K.K. and Hawkins R.J., *The microfracture technique in the treatment of full-thickness chondral lesions of the knee in National Football League players*. J Knee Surg, 2003. **16**: p. 83-86.
89. Steadman J.R., Briggs K.K., Rodrigo J.J., Kocher M.S., Gill T.J. and Rodkey W.G., *Outcomes of microfracture for traumatic chondral defects of the knee: average 11-year follow-up*. Arthroscopy, 2003. **19**: p. 477-484.
90. Dorotka R., Windberger U., Macfelda K., Bindreiter U., Toma C. and Nehrer S., *Repair of articular cartilage defects treated by microfracture and a three-dimensional collagen matrix*. Biomaterials, 2005. **26**: p. 3617-3629.
91. Aubin P.P., Cheah H.K., Davis A.M. and Gross A.E., *Long-term followup of fresh femoral osteochondral allografts for posttraumatic knee defects*. Clin Orthop Relat Res, 2001: p. S318-327.
92. Hangody L., Feczko P., Barthá L., Bodo G. and Kish G., *Mosaicplasty for the treatment of articular defects of the knee and ankle*. Clin Orthop Relat Res, 2001: p. S328-336.
93. Bentley G., Biant L.C., Carrington R.W., Akmal M., Goldberg A., Williams A.M., Skinner J.A. and Pringle J., *A prospective, randomised comparison of autologous chondrocyte implantation versus mosaicplasty for osteochondral defects in the knee*. J Bone Joint Surg Br, 2003. **85**: p. 223-230.
94. Hangody L. and Fules P., *Autologous osteochondral mosaicplasty for the treatment of full-thickness defects of weight-bearing joints: ten years of experimental and clinical experience*. J Bone Joint Surg Am, 2003. **85**: p. 25-32.
95. Alfredson H. and Lorentzon R., *Superior results with continuous passive motion compared to active motion after periosteal transplantation. A retrospective study of human patella cartilage defect treatment*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 1999. **7**: p. 232-238.
96. Brittberg M., Lindahl A., Nilsson A., Ohlsson C., Isaksson O. and Peterson L., *Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation*. N Engl J Med, 1994. **331**: p. 889-895.
97. Briggs T.W., Mahroof S., David L.A., Flannelly J., Pringle J. and Bayliss M., *Histological evaluation of chondral defects after autologous chondrocyte implantation of the knee*. J Bone Joint Surg Br, 2003. **85**: p. 1077-1083.
98. Coutts R.D., Healey R.M., Ostrander R., Sah R.L., Goomer R. and Amiel D., *Matrices for cartilage repair*. Clin Orthop Relat Res, 2001: p. S271-279.
99. Temenoff J.S. and Mikos A.G., *Injectable biodegradable materials for orthopedic tissue engineering*. Biomaterials, 2000. **21**: p. 2405-2412.
100. Klompmaker J., Jansen H.W., Veth R.P., Nielsen H.K., De Groot J.H. and Pennings A.J., *Porous polymer implants for repair of full-thickness defects of articular cartilage: an experimental study in rabbit and dog*. Biomaterials, 1992. **13**: p. 625-34.
101. Mainard D., Bénichoux R., Lochon P., Delagoutte J.P. and Cuny I., *Progrès récents des biomatériaux*, Masson, Editor. 1988, Benichoux R. et Lacoste J.: Paris. p. 74.
102. Mainard D. and Netter P., *Possibilité de réparation de lésions ostéochondrales*, in *Cahier d'enseignement de la sofcot*. 1997. p. 76.
103. Ishaug-Riley S. L., Okun L. E., Prado G., Applegate M. A. and Ratcliffe A., *Human articular chondrocyte adhesion and proliferation on synthetic biodegradable polymer films*. Biomaterials, 1999. **20**: p. 2245-56.
104. Zhang K., Simon C.G., Washburn N.R., Antonucci J.M. and S. Lin-Gibson, *In situ formation of blends by photopolymerization of poly(ethylene glycol) dimethacrylate and polylactide*. Biomacromolecules, 2005. **6**: p. 1615-22.

105. Bryant S.J. and Anseth K.S., *The effects of scaffold thickness on tissue engineered cartilage in photocrosslinked poly(ethylene oxide) hydrogels*. Biomaterials, 2001. **22**: p. 619-26.
106. Watanabe K. and Koyama Y., *Adhesion of macrophages on collagen irradiated with ultraviolet light*. J Biomater Sci Polym Ed, 1999. **10**: p. 351-61.
107. Park Y.D., Tirelli N. and Hubbell J.A., *Photopolymerized hyaluronic acid-based hydrogels and interpenetrating networks*. Biomaterials, 2003. **24**: p. 893-900.
108. Stile R.A., Chung E., Burghardt W.R. and Healy K.E., *Poly(N-isopropylacrylamide)-based semi-interpenetrating polymer networks for tissue engineering applications. Effects of linear poly(acrylic acid) chains on rheology*. J Biomater Sci Polym Ed, 2004. **15**: p. 865-78.
109. Pelletier S., Hubert P., Payan E., Marchal P., Choplin L. and Dellacherie E., *Amphiphilic derivatives of sodium alginate and hyaluronate for cartilage repair: rheological properties*. J Biomed Mater Res, 2001. **54**: p. 102-8.
110. Noth U., Schupp K., Heymer A., Kall S., Jakob F., Schutze N., Baumann B., Barthel T., Eulert J. and Hendrich C., *Anterior cruciate ligament constructs fabricated from human mesenchymal stem cells in a collagen type I hydrogel*. Cytotherapy, 2005. **7**: p. 447-55.
111. Ahmed T.A., Griffith M. and Hincke M., *Characterization and Inhibition of Fibrin Hydrogel-Degrading Enzymes During Development of Tissue Engineering Scaffolds*. Tissue Eng, 2007.
112. Markland P., Zhang Y., Amidon G.L. and Yang V.C., *A pH- and ionic strength-responsive polypeptide hydrogel: synthesis, characterization, and preliminary protein release studies*. J Biomed Mater Res, 1999. **47**: p. 595-602.

CHAPITRE II :
SYNTHESE ET
CARACTERISATION
DES HYALURONATES
AMPHIPHILES

CHAPITRE II : SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION DES HYALURONATES AMPHIPHILES

Le hyaluronate (HA) est une des molécules de base de la matrice extracellulaire du cartilage articulaire. C'est un polymère très hydrophile qui joue un rôle important dans les propriétés physico-chimiques et biologiques du liquide synovial. Il est synthétisé indirectement par le chondrocyte par le biais de la HA synthase. On a vu précédemment (Chap. I, par. IV.5) que le HA a la propriété d'être reconnu spécifiquement par un récepteur membranaire présent sur la surface de nombreuses cellules et notamment du chondrocyte : le CD44. Ce récepteur spécifique permet au chondrocyte d'interagir directement avec son environnement proche mais aussi avec son milieu intracellulaire du fait de sa localisation transmembranaire. Il est notamment impliqué dans la dégradation intra et extracellulaire du HA où il s'avère essentiel [1].

Nous avons envisagé de mettre à profit cette propriété de reconnaissance spécifique entre le CD44 et le HA pour élaborer des nanoparticules de poly(D,L-lactide) (PLA) recouvertes de ce polysaccharide de façon à obtenir une vectorisation de principe actif (PA) ciblée vers les chondrocytes. Le PA encapsulé se libérerait alors dans l'environnement immédiat du chondrocyte voire même à l'intérieur de la cellule après internalisation.

Pour préparer ce type de nanoparticules cœur-couronne, nous avons choisi d'utiliser un procédé de double émulsion/évaporation de solvant qui sera décrit plus loin, en ayant recours à un HA amphiphile hydrosoluble comme stabilisant/tensio-actif de l'émulsion secondaire, selon le protocole employé au LCPM et qui est décrit dans le chapitre I par. IV.4.2.

Pour préparer du HA amphiphile, des chaînes hydrophobes alkyle à 6 ou 12 atomes de carbone (-C₆ ou -C₁₂) ou un groupe éthylphényle (-Phe) ont été greffés via les groupements carboxyliques présents sur le HA, à des taux de substitution précis.

I. Généralités sur le hyaluronate

Pour synthétiser les HA amphiphiles, nous nous sommes inspirés de précédents travaux réalisés au LCPM [2, 3]. Dans ces travaux, l'objectif était d'hydrophobiser le HA afin de lui conférer des propriétés associatives en solution aqueuse. A terme le but était de préparer des hydrogels susceptibles de jouer le rôle de matériaux de comblement pour la réparation du cartilage. Pour obtenir des hydrogels suffisamment forts, on a préparé des dérivés du HA porteurs de chaînes alkyle longues (C_{12} et C_{18}) avec des taux de substitution assez élevés pour assurer la tenue mécanique des hydrogels. Une étude réalisée *in vitro* sur des cultures de chondrocytes a permis de mettre en évidence le caractère biocompatible et non cytotoxique des HA amphiphiles synthétisés [4]. Par ailleurs, on a constaté qu'après implantation *in vivo* dans une lésion ostéochondrale de rat, les HA modifiés (alors sous forme d'hydrogel) ont joué le rôle de tuteur pour la recolonisation cellulaire et la synthèse d'un néotissu fonctionnel démontrant ainsi la biocompatibilité de ces HA amphiphiles.

Ces résultats constituaient donc un élément encourageant pour que l'on envisage d'élaborer des nanoparticules à partir de PLA et de dérivés amphiphiles du HA par la technique de double émulsion/évaporation de solvant. Cependant dans ce cas, les propriétés recherchées pour les HA modifiés n'étant pas des propriétés associatives mais tensio-actives, nous avons programmé de synthétiser des dérivés moins hydrophobes, c'est-à-dire substitués par des chaînes alkyle de longueur moyenne ($-C_6$ et $-C_{12}$) ou plus originale avec un noyau benzénique ($-Phe$) avec des taux de substitution déterminés. Concernant les particules, comme le PLA et le HA sont tous deux biocompatibles et biorésorbables [5-8], on pouvait s'attendre à ce que les nanoparticule composées des deux polymères aient les mêmes propriétés de biocompatibilité et biorésorbabilité. Comme les HA amphiphiles sont peu modifiés, on peut en effet supposer qu'ils pourront être dégradés par la hyaluronidase comme cela a été montré par les travaux de N. Levasseur [9].

I.1. STRUCTURE CHIMIQUE ET ORIGINE DU HA

I.1.1. Structure chimique

En 1934, Meyer et Palmer isolent de l'humeur vitreuse bovine une substance qu'ils nomment acide hyaluronique [10]. Dans le milieu physiologique, cette substance forme un gel transparent qui recouvre la cornée et protège le globe oculaire des déformations [11]. Ce

composé est en fait omniprésent dans le règne animal, de la bactérie à l'homme, et joue d'importants rôles mécaniques et physiologiques (protection cellulaire, activation de la différenciation cellulaire lors de la croissance, lubrification des articulations...) [11-13].

La structure chimique du HA a été déterminée en 1934 par l'équipe de Karl Meyer à partir d'humour vitré de bœuf [10].

Le HA est un polymère de disaccharides eux-mêmes composés d'acide D-glucuronique et de D-N-acétylglucosamine, liés entre eux par des liaisons glycosidiques alternées β -1,4 et β -1,3 (Figure A-1).

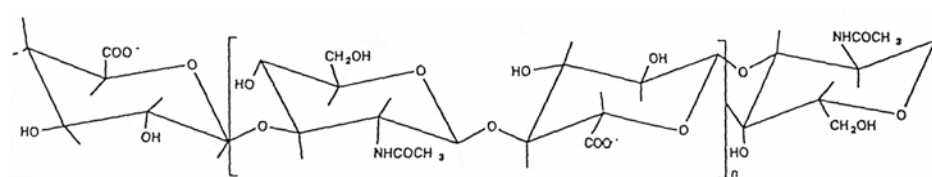


Figure II. 1 : Représentation schématique de la structure chimique développée du hyaluronate

Les polymères de cette unité récurrente peuvent avoir, *in vivo*, une masse molaire comprise entre 10^2 et 10^4 kg.mol⁻¹.

I.1.2. Origine et production

Le HA est un polysaccharide synthétisé dans de nombreux tissus conjonctifs tels que la peau, le cordon ombilical, la synoviale,...et ce chez l'ensemble des vertébrés [14, 15]. Le

Tableau II. 1 regroupe les concentrations en HA pour différentes origines.

Origine de l'acide hyaluronique	Concentration (g/100 g de tissu)
Humeur vitreuse humaine	0,02
Peau (homme adulte)	0,03 à 0,09
Liquide synovial (homme adulte)	0,14 à 0,36
Cordon ombilical humain	0,3
Crête de coq	0,75
Cerveau de bovin	0,015

Tableau II. 1 : Concentrations en acide hyaluronique pour différentes origines, d'après Laurent et coll. [15]

Les principales formes de HA commercialisées sont extraites de crête de coq, de cordon ombilical ou d'humeur vitreuse. Selon son origine et son mode d'extraction, le HA a une masse molaire variable, de 10^4 à 10^6 g.mol⁻¹ (Tableau II. 2).

Origine du HA	$\overline{M}_w$ (g.mol ⁻¹)
Cordon ombilical humain	$3,4 \times 10^6$
Humeur vitrée bovine	$7,7 \times 10^4$ à $1,7 \times 10^6$
Liquide synovial bovin	14×10^6
Liquide synovial : * sain * dégénéré	6×10^6 $2,7 \times 10^6$
Crête de coq	$1,2 \times 10^6$

Tableau II. 2 : Masse molaire moyenne en masse du HA selon son origine, d'après Laurent et coll. [15]

Le HA peut être également obtenu par fermentation à partir des bactéries *Streptococcus zooepidemicus* [16].

A l'échelle industrielle, le HA est principalement préparé par deux procédés différents:

- Extraction des crêtes de coq, après broyage, traitement chimique et purification.
- Fermentation bactérienne: les filaments de HA sont exprimés par des bactéries génétiquement modifiées. Cette méthode permet sa production avec des rendements importants (6 à 10 g de hyaluronane pour 1 kg de moûts de fermentation) par rapport aux méthodes d'extraction.

I.2. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

I.2.1. Structure

D'après les travaux datant des années 1960 de Weissmann et Meyer [17] et de Jeanloz et Flowers [18], le HA est un polysaccharide composé d'un enchaînement linéaire non ramifié de motifs disaccharidiques constitués d'acide D-glucuronique lié en β (1→3) à la N-acétyl-D-glucosamine (Figure II. 1).

Il peut exister sous forme acide, l'acide hyaluronique, ou sous forme de sel, essentiellement de sodium, le hyaluronate de sodium.

La structure du hyaluronane (acide hyaluronique ou hyaluronate) à l'état solide a été principalement étudiée par diffraction des rayons X. Winter et coll. [19] ont montré que ce polysaccharide possédait une conformation en hélice stabilisée par des liaisons hydrogène. Les structures secondaire et tertiaire du hyaluronane en solution ont été étudiées principalement par dichroïsme circulaire et résonance magnétique nucléaire. Selon Scott [20], la macromolécule de HA en solution aqueuse est stabilisée sous forme hélicoïdale par des liaisons hydrogène intramoléculaires parallèles à l'axe de la chaîne, impliquant les groupements carboxylate, acétamide, hydroxyle et éther. Cette structure a été confirmée par de nombreuses expériences de RMN (^1H et ^{13}C) [21-23], qui ont également mis en évidence que la liaison hydrogène entre les groupements carboxylate et acétamide s'établissait par l'intermédiaire d'une molécule d'eau (Figure II.2) [21, 22, 24, 25].

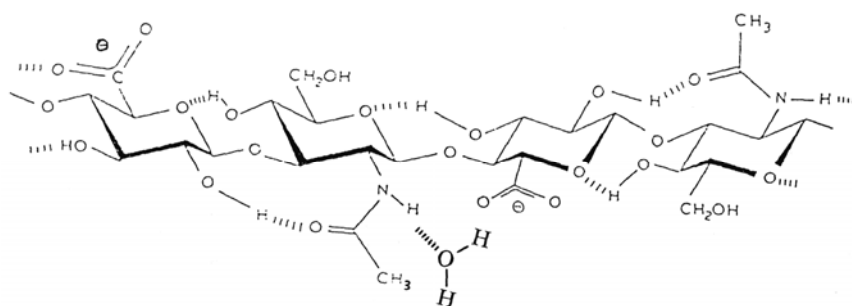


Figure II. 2 : Structure secondaire d'une chaîne de hyaluronate en solution dans un mélange $\text{Me}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}$, d'après Kvam et coll [24].

De même, par RMN ^1H , Darke *et coll.* [26] ont démontré la présence de zones rigides le long de la chaîne macromoléculaire, ces zones bloquant la relaxation des groupements acétamide. La chaîne de HA serait donc constituée par l'alternance de portions rigides ordonnées, maintenues par les liaisons hydrogène, et de zones désordonnées flexibles.

1.2.2. Propriétés physico-chimiques du HA en solution aqueuse

Le HA est un polyélectrolyte. De ce fait, dans l'eau pure, aux faibles concentrations, les répulsions électrostatiques entre les fonctions carboxylates génèrent une expansion des pelotes macromoléculaires, se traduisant par une augmentation de la viscosité en solution. Son pK_a apparent en solution est de l'ordre de 3,2 [15]. Il est parfaitement soluble en solution aqueuse.

Rinaudo *et coll.* ont étudié le comportement du HA, en régime dilué dans l'eau pure ou en présence d'une très faible force ionique [16, 27].

Ils ont ainsi pu calculer une valeur de la longueur de persistance de l'ordre de 70 Å et du paramètre de flexibilité (0,06) en l'absence de répulsions électrostatiques c'est-à-dire en présence de sel. En revanche cette longueur est de 400 Å lorsque la force ionique est très faible d'où des répulsions électrostatiques très fortes [28]. Le HA est un polysaccharide semi-rigide contrairement à d'autres comme le dextrane par exemple qui a une longueur de persistance de 26 Å [29].

Concernant les propriétés rhéologiques des solutions aqueuses de HA, de très nombreuses études ont été réalisées. Elles dépendent de la concentration en polymère, de sa masse molaire, de la force ionique, du pH, de la nature de l'ion compensateur, de la température etc...

I.3. PROPRIETES BIOLOGIQUES

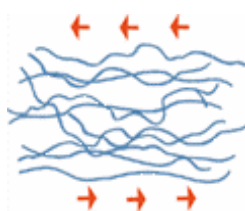
Le HA agit dans le cartilage à la fois par les propriétés physico-chimiques, rhéologiques, mécaniques de ses solutions aqueuses et par son implication dans des processus biologiques.

- Importance des propriétés rhéologiques et mécaniques

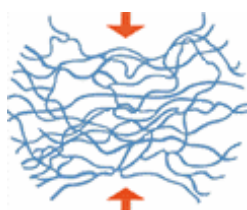
Dans le cas d'altérations dégénératives articulaires (arthrose) on observe entre autres, une diminution de la concentration et de la masse molaire du HA dans le liquide synovial [30, 31]. Le rôle de protection du cartilage n'est alors plus assuré correctement, ce qui entraîne sa dégradation progressive, à l'origine de l'apparition de douleurs et d'une réduction de la mobilité. Un équilibre existe entre la production et la dégradation du HA. Au cours d'une arthrose, la dégradation est supérieure à la quantité produite. Le liquide synovial devient alors plus fluide et ses propriétés lubrifiantes et protectrices sont fortement altérées.

Le HA apporte au liquide synovial des propriétés physiques bien particulières en donnant à ce liquide des propriétés lubrifiantes. Il joue un rôle important dans l'amortissement des chocs et possède une action de filtre qui contrôle le passage des cellules ou des molécules au sein même de l'articulation.

Lors de contraintes de cisaillement progressives, le HA agit comme lubrifiant.



Lors de contraintes de charges très rapides, le HA agit comme amortisseur de chocs.



Le HA forme un film sur toute la surface interne de l'articulation. Ce revêtement a un rôle de protection viscoélastique sur le cartilage articulaire et la synovie, notamment vis-à-vis de lésions mécaniques, mais également contre les radicaux libres et d'autres facteurs inflammatoires.

- Implication dans les processus biologiques

Le HA a beaucoup de répercussions biologiques au niveau cellulaire (synoviocytes ou chondrocytes).

L'interaction du HA avec les synoviocytes peut baisser, par compétition, l'adhésion de molécules tels les facteurs chimiotactiques [32] ou les radicaux libres [33].

L'importance de masse molaire du HA est très importante pour son action. Ainsi un HA de haute masse engendre une augmentation de l'expression de HA synthase [34]. Le HA exogène est ainsi connu pour inhiber de nombreux signaux de voie de synthèse proinflammatoire comme les dérivés de l'acide arachidonique (comme les PGE2 [35]), mais aussi d'autres médiateurs péricellulaires de l'inflammation comme uPA (urinary plasminogen activator), PAi-1 (plasminogen activator inhibitor-1) et u-PAR (urinary plasminogen activator receptor) [36]. L'apport de HA dans le liquide synovial peut engendrer une baisse de l'expression d'une cytokine proinflammatoire : l'IL1 β . Dans ce cas, la réaction est directement liée à l'interaction spécifique entre le HA exogène et le CD44 présent sur les synoviocytes [37]. Cette interaction extracellulaire entraîne des signaux intracellulaires directement corrélés au taux d'expression du gène de l'IL1 β .

Le HA possède aussi des effets biologiques vis-à-vis des chondrocytes. En effet, l'interaction de HA exogène avec les chondrocytes par le biais des récepteurs CD44 mais aussi d'autres récepteurs tels que RHAMM provoque des signaux intracellulaires [38-40].

Les signaux sont transmis dans le compartiment intracellulaire par le biais du cytosquelette et notamment les filaments d'actine, véritable squelette de la cellule. Les différents types de signaux mis en évidence alors sont par exemple :

- Des cascades de phosphorylation, la phosphorylation étant une étape de choix dans la maturation des protéines sur le plan conformationnel donc fonctionnel. Elle peut permettre donc d'activer ou au contraire d'inhiber une voie de synthèse.
- Une synthèse accrue de cytokine anti inflammatoire (IL4, IL10...) ou une baisse des proinflammatoires type PGE2 après stimulation à l'IL1 β [41] ou type métalloprotéases, agrécanases [42].
- Des signaux plus généraux comme la prolifération, la migration cellulaire ou l'endocytose [43]. Ces mécanismes ont comme point commun une déformation de la cellule par le biais du cytosquelette. Dans ce cas précis, l'interaction entre le HA et le CD44 active la GTPase, enzyme permettant de libérer de l'énergie utilisé par l'actine pour modifier le cytosquelette dans des cellules cancéreuses [44].

Tous ces éléments montrent l'importance du HA dans l'articulation. Le HA a un rôle mécanique évident dans le liquide synovial pour la lubrification et les propriétés physico-chimiques. Mais par le biais de récepteurs membranaires tels que le CD44, le HA peut influencer directement sur les propriétés biologiques de l'articulation. Divers processus cellulaires sont alors activés telle la propre synthèse de HA (HA synthase), l'inhibition de cytokines proinflammatoires (IL1 β , PGE2,...)...

Le HA forme de plus un squelette de base pour les agrégats de protéoglycanes essentiels à l'intégrité structurale et fonctionnelle du cartilage articulaire.

Par ailleurs on a déjà vu (Chap. I, par. IV.5.) que le HA a la particularité de disposer d'un récepteur membranaire spécifique sur le chondrocyte : le CD44

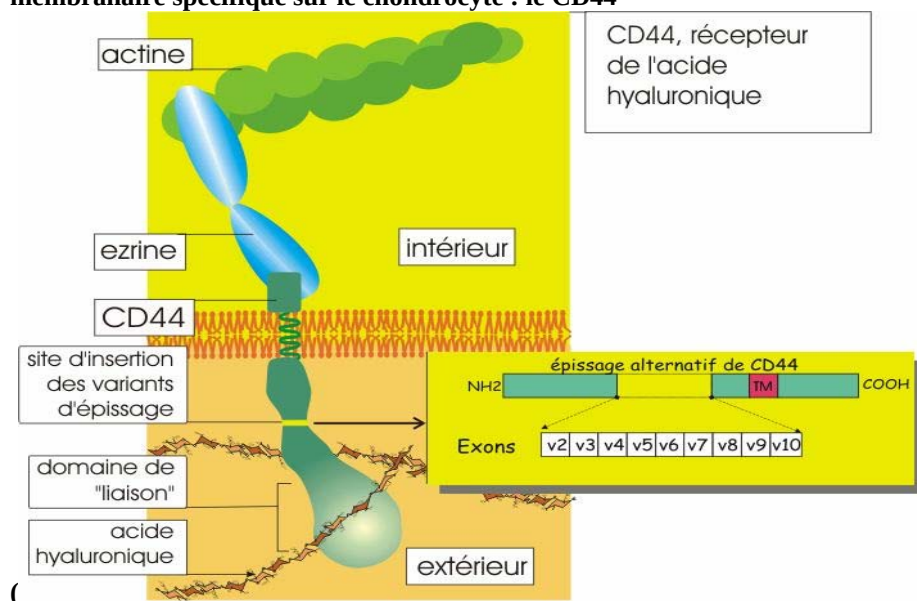


Figure II. 3).

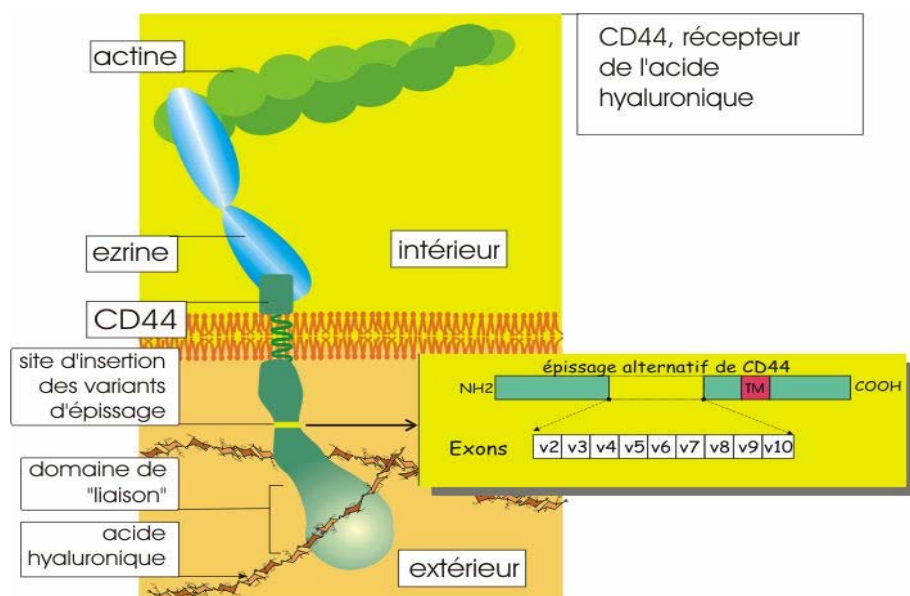


Figure II. 3 : La molécule d'adhérence CD44 est le récepteur du HA

I.4. PRINCIPALES APPLICATIONS DU HA

Le HA est présent naturellement dans divers tissus du corps, comme la peau, le cartilage, et l'humeur vitrée. Il est donc adapté aux applications biomédicales visant ces tissus. Le premier produit biomédical à base d'acide hyaluronique, le Healon, a été développé dans les années 1970 et approuvé pour des usages en chirurgie ophtalmique (i.e. transplantation de cornée, cataracte, glaucome, etc). En effet, Le Healon intracamérulaire s'avère très utile dans les

greffes transfixiantes en protégeant le greffon d'une éventuelle lésion chirurgicale, en minimisant la perte de cellules endothéliales et l'augmentation d'épaisseur de la cornée.

Le HA de haute masse molaire est également utilisé en solution aqueuse pour traiter l'ostéoarthrite du genou : c'est la viscosupplémentation. Naturellement présent dans le liquide synovial sous forme de sel de sodium, le HA sert de squelette aux agrégats de protéoglycanes et stabilise le réseau collagénique. Outre son rôle de lubrifiant, il participe à la trophicité du cartilage et lui permet d'assurer sa fonction d'amortisseur de chocs. Dans l'articulation arthrosique, le hyaluronate de sodium est moins concentré que dans l'articulation normale (soit 0,8 à 2 mg/ml contre 3 mg/ml normalement) et sa masse molaire est réduite (soit 0,5 à 4 kg.mol⁻¹ au lieu de 4 à 5 normalement). C'est pourquoi la viscosupplémentation qui consiste à injecter dans l'articulation du genou, une solution de HA de haute masse molaire (solution de HA réticulé, Hylane[®], commercialisée par la Société Fidia), améliore l'articulation. Ce polysaccharide permet en effet de limiter les frottements dus aux articulations détériorées (aspect purement mécanique) mais aussi jouerait un rôle biochimique direct sur le cartilage [45]. En effet, il pénètre dans le cartilage défectueux pour éviter les protéolyses [46]. Son effet chondroprotecteur est alors dépendant de sa taille [47].

Il peut aussi être utilisé lors de soins post-opératoires pour favoriser la reconstitution des tissus, principalement après une opération de la cataracte.

Dans certains cancers, les taux de HA sont relativement bien corrélés avec la malignité et un pronostic défavorable [48, 49]. Dès lors, le HA est souvent utilisé comme marqueur tumoral pour le cancer de la prostate et celui du sein. Il peut également être utilisé pour suivre l'évolution de la maladie.

Le HA est désormais couramment utilisé comme ingrédient de produits de beauté en raison de ses propriétés hydratantes dues à sa forte hydrophilie.

Depuis quelques années, il est employé en médecine esthétique comme produit de comblement de rides. Des produits à base de HA tels que Restylane[®] (Laboratoire Inamed) ou Surgiderm[®] (Laboratoire Cornéal) sont utilisés par les médecins en remplacement du collagène car le HA réduit les risques d'allergies et dure plus longtemps (6 à 18 mois). De plus, sa résorbabilité empêche tout accident définitif.

Le hyaluronate diversement substitué par des esters plus ou moins hydrophobes forme des hydrogels en milieu aqueux (Hyaff[®], Fidia). Les divers matériaux sont utilisables pour la réparation et l'ingénierie tissulaire, principalement pour la peau, le cartilage, les vaisseaux.

I.4. MODIFICATION CHIMIQUE DU HYALURONATE :

Le HA porte des fonctions réactives qui peuvent être utilisées pour fixer divers groupes chimiques, à savoir des fonctions hydroxyle et carboxyle. Peu d'exemples sont décrits dans la littérature concernant la réaction sur les OH. A titre d'exemple, citons l'O-acylation avec un acide organique en présence d'un catalyseur acide ou de la N,N'-dicyclohexylcarbodiimide ou du N,N'-carbonyl diimidazole. On peut également employer un anhydride d'acide en présence de triéthylamine, de pyridine, de 4-diméthylamino pyridine ou d'un composé analogue [50].

Puisque dans notre travail, nous avons choisi d'utiliser les fonctions carboxyliques pour modifier chimiquement le HA, nous détaillerons un peu plus ce type de modification. Des carbodiimides hydrosolubles ont été utilisées pour coupler des amines aliphatiques sur les COOH du HA avec des taux de conversion en amides dépendant de la nature de la carbodiimide utilisée [51, 52].

Della Valle et coll [53] ont modifié des polysaccharides carboxylés en faisant réagir en milieu homogène, des dérivés bromés de chaînes alkyle sur le sel de tétrabutylammonium du HA. Cette réaction conduit à la formation de liaisons esters. Ce type de réaction a également été utilisé pour modifier l'alginate et la pectine [54-56].

II. MATERIELS ET METHODES

II.1. METHODES CHIMIQUES

II.1.1. Le hyaluronate parent :

Le HA nous a été fourni gracieusement par la Société Bioibérica (Barcelone, Espagne) et est extrait des crêtes de coq. Selon les lots, sa masse molaire moyenne en masse $\overline{M}_w$ variait entre environ 750 000 et 625 000 g.mol⁻¹ et une masse molaire moyenne en nombre $\overline{M}_n$ entre environ 590 000 et 360 000 g.mol⁻¹, selon des mesures que nous avons effectuées par chromatographie d'exclusion stérique couplée à la diffusion de lumière laser multi-angle

(SEC-MALLS).

II.1.2. Protocole général de synthèse des hyaluronates modifiés :

Le protocole de synthèse des hyaluronates amphiphiles est inspiré des brevets publiés par Della Valle *et coll.* [53, 57, 58]. Ils décrivent la synthèse de dérivés amphiphiles de polysaccharides, tels que l'alginate de sodium, le hyaluronate de sodium ou encore la carboxyméthylcellulose, par estérification totale ou partielle en phase homogène, des fonctions carboxylates par différents dérivés halogénés. Le milieu polaire aprotique est constitué de diméthylformamide ou de diméthylsulfoxyde.... L'estérification est réalisée entre un sel d'ammonium quaternaire hydrophobe du polysaccharide et un bromure d'alkyle à chaîne longue. La synthèse de dérivés amphiphiles d'alginate de sodium, de hyaluronate de sodium et de pectine a déjà fait l'objet d'études au LCPM [3, 15, 54, 59-61]. Dans ces travaux, des chaînes hydrophobes (12 ou 18 atomes de carbone) ont été fixées de façon covalente par des liaisons ester sur les groupes carboxylates du squelette polysaccharidique, en phase homogène. Nous avons répété ces expériences en nous limitant à des chaînes alkyle à 6 et 12 carbones et de façon à obtenir des taux de substitution moins élevés que dans ces travaux antérieurs pour les raisons mentionnées dans les généralités du chap. I. Nous avons également fixé des groupes éthylphényle par le même protocole. Cette synthèse conduit à l'obtention de polymères amphiphiles à structure en peigne, dont les segments hydrophobes sont vraisemblablement répartis de façon statistique le long des chaînes macromoléculaires.

Le schéma de synthèse est représenté sur la Figure II. 4.

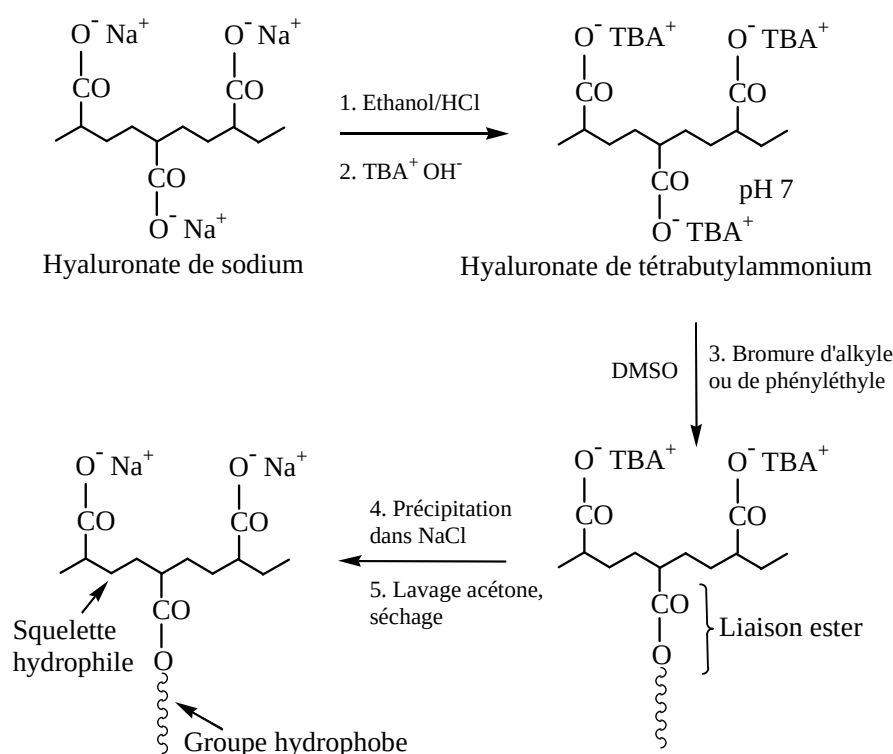


Figure II. 4 : Schéma de la synthèse des hyaluronates amphiphiles

II.1.3. Mise au point de la synthèse

Différentes synthèses ont été réalisées en faisant varier certains paramètres susceptibles d'influer sur les propriétés des dérivés, comme par exemple la masse molaire du polysaccharide après modification chimique et le taux de substitution. Une synthèse dont le protocole est donné ci-dessous, a ensuite été arrêtée et a permis l'obtention de différents produits de façon reproductible:

➤ Première étape

Afin de rendre le HA (initialement sous forme de sel de sodium) soluble dans le DMSO, il faut au préalable le transformer en son sel de tétrabutylammonium :

0,5g de HA sont mis en suspension dans un mélange contenant 24,5 mL d'EtOH 70% et 0,5 mL d'HCl 0,06 M, pendant 20 min à 4°C sous agitation. Le mélange est filtré (filtre borosilicate n°4) puis lavé avec de l'éthanol 70% afin d'éliminer le chlorure de sodium formé au cours de la réaction. Un test au nitrate d'argent (AgNO_3 0,1 mol.L⁻¹) permet de s'assurer de l'élimination complète des chlorures. Le produit filtré est lavé à l'acétone et laissé à température ambiante pendant une nuit pour évaporer l'acétone résiduelle.

Le HA acide est mis en suspension dans 500 mL d'H₂O sous agitation. Une solution de TBAOH (hydroxyde de tétrabutylammonium) 0,15 M est ajoutée jusqu'à neutralisation du mélange à pH 7, pour préparer le HA-TBA. Le mélange est ensuite lyophilisé

➤ Deuxième étape

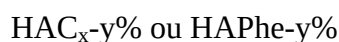
Le HA-TBA lyophilisé est solubilisé à 1% (poids/volume) dans le DMSO pendant 24 h. La quantité de bromure ajoutée est calculée en tenant compte du taux de substitution visé et de la réactivité supposée de chaque dérivé bromé. Les dérivés bromés $C_6H_{13}Br$, $C_{12}H_{25}Br$ et $PheC_2H_4Br$ sont ajoutés et le mélange est laissé sous agitation pendant 24 h.

➤ Troisième étape

5,5 mL de NaCl 2,5 M sont ajoutés au mélange. Celui-ci est laissé sous agitation pendant 1 h à température ambiante. Le produit est précipité dans 300 mL d'acétone, l'agitation étant laissée pendant 15 min. Le produit filtré (filtre borosilicate n°4) est lavé avec tout d'abord un mélange acétone/eau 5/1, puis avec de l'acétone pure ; puis il est laissé à température ambiante pour évaporer l'acétone résiduelle. Le dérivé de HA est finalement stocké à 4°C.

II.1.4. Nomenclature :

La nomenclature suivante a été adoptée pour permettre l'identification de chacun des dérivés polymères préparés :



HA représente le hyaluronate de sodium.

y est le taux de fixation expérimental en chaînes alkyle exprimé en moles de C_6 , C_{12} ou Phe pour 100 moles de motifs monosaccharidiques.

x est le nombre d'atomes de carbone présents dans le bromure d'alkyle utilisé.

II.2. METHODES DE CARACTERISATION DES DIFFERENTS PRODUITS:

II.2.1. Mesure des masses molaires

La détermination des masses molaires moyennes de polysaccharides peut être effectuée par différentes techniques. La chromatographie d'exclusion stérique (SEC) en milieu aqueux permet d'obtenir des valeurs des masses molaires mais elle nécessite l'utilisation d'étalons tels que le pullulane ou le dextrane [62] ce qui conduit à des valeurs relatives. La technique d'électrophorèse capillaire peut également être utilisée [63] mais est beaucoup moins répandue.

L'association de la SEC avec la diffusion de lumière laser multi-angle notée SEC-MALLS, est devenue l'une des méthodes les plus efficaces. Elle permet de déterminer entre autres, les masses molaires moyennes en nombre et en masse des polymères, ainsi que les profils de distribution pour des polymères polymoléculaires, sans qu'il soit nécessaire d'effectuer un étalonnage préliminaire.

Cette technique de SEC-MALLS a été utilisée pour la détermination des masses molaires de certains dérivés du HA mais n'a pu être appliquée aux HA amphiphiles par suite de l'adsorption de ces dérivés sur les colonnes. Nous avons évalué l'étendue de l'altération éventuelle du squelette de HA en caractérisant les différents intermédiaires non amphiphiles selon le protocole décrit dans la thèse d'Amargier [64].

II.2.1.1. Rappels sur théorie de la diffusion de lumière

La théorie fondamentale de diffusion de la lumière par des solutions de polymères découle des travaux de Debye et Zimm, et son application a été considérablement développée depuis l'utilisation de sources laser. L'intensité de la lumière diffusée à un angle donné par une solution diluée de polymère polymoléculaire est donnée par l'équation :

$$\frac{KC}{\Delta R_{\theta}} = \frac{1}{M_w} + 2A_2C + \frac{16\pi^2}{3\lambda^2} R_g^2 \sin^2 \frac{\theta}{2}$$

Où : C est la concentration du polymère en solution,

A_2 est le second coefficient du Viriel,

λ est la longueur d'onde incidente,

R_g est le rayon de giration moyen d'ordre z de la pelote macromoléculaire,

θ est l'angle de mesure par rapport au rayon incident,

$$K = \frac{4\pi n^2}{\lambda N_A} \frac{dn}{dC}$$

N_A est le nombre d'Avogadro,

n est l'indice de réfraction de l'éluant,

dn/dC est la variation de l'indice de réfraction avec la concentration en polymère.

Un photodiffusiomètre permet de déterminer le rapport de Rayleigh :

$$\Delta R_{\theta} = \frac{I_{\theta}}{I_0} \frac{r^2}{V}$$

où I_{θ} est l'intensité de la lumière diffusée par le volume V , mesurée à la distance r de l'échantillon. I_0 est l'intensité de la lumière incidente.

Ainsi, grâce à la méthode graphique de Zimm qui consiste à faire une double extrapolation à angle nul et à concentration nulle de l'équation $K.C / \Delta R_{\theta} = f(C, \theta)$, on peut déterminer le rapport $(1/\overline{M}_w)$ pour un échantillon polymoléculaire.

II.2.1.2. Equipements :

Le diffusiomètre laser multi-angle est couplé à une série de colonnes chromatographiques d'exclusion stérique. Le système de SEC est constitué de :

- une pompe Waters 590,
- un dégazeur (Degazys DG 1310, Uniflow),
- une boucle d'injection de 200 μL ,
- une série de colonnes PL aquagel -OH 30, 40 et 50 μm (de 100 à 1 000 000 g.mol^{-1}) avec une pré-colonne de même type.

Une double détection est effectuée à la sortie des colonnes à l'aide d'un photodiffusiomètre de modèle miniDawn (Wyatt Technology Corporation) et d'un réfractomètre différentiel de type Waters 410 installé en série. La longueur d'onde du laser du MALLS est fixée à 690 nm par le constructeur, et trois photodiodes mesurent l'intensité diffusée à 45, 90 et 140°. Les mesures sont pilotées et traitées avec le logiciel Astra en place.

II.2.1.3. Conditions expérimentales :

Les échantillons ont été analysés selon le protocole décrit ci-dessous.

Le poids sec des échantillons est déterminé afin de préparer des solutions de concentrations précises. L'éluant NaNO_3 0,1 M utilisé, est préparé avec de l'eau milliQ (système de filtration Millipore), puis filtré sur membrane Millipore de 0,1 μm . Nous avons vérifié que, dans ces conditions, les polymères étaient élués quantitativement. Le débit de la pompe est fixé à 0,7 mL.min^{-1} , et 24 h sont nécessaires pour que le système soit équilibré. Les solutions de polymère sont préparées la veille dans l'éluant considéré, à des concentrations de 0,7 g.L^{-1} , puis filtrées juste avant l'injection sur des filtres Millex GS (Millipore) de 0,22 μm . Les solutions sont injectées deux fois et les courbes sont traitées selon la méthode de Zimm.

II.2.2. Détermination des taux de substitution :

Pour déterminer les taux de substitution en chaînes alkyle nous avons au départ envisagé d'utiliser la RMN du proton ^1H ou du carbone ^{13}C . Cette technique est souvent employée pour

la détermination quantitative des taux de fixation en chaînes alkyle. Mais elle est efficace pour des polymères synthétiques tels que par exemple des polyacrylates de sodium modifiés par des amines à chaînes aliphatiques longues [65, 66]. La RMN ^1H est également utilisée par certains auteurs pour des polymères naturels tels que le chitosane [67] et le galactomannane [68] substitués par des chaînes alkyle.

Mais, dans le cas de polysaccharides de masse molaire élevée, tels que le HA de notre étude, cette technique ne peut pas être employée. En effet, les protons du HA ont des temps de relaxation longs et hétérogènes en raison de son irrégularité de structure, ce qui génère un élargissement et une superposition des pics dans D_2O . En outre, l'intensité globale des protons des chaînes alkyle apparaît supérieure à celle des protons du massif polymère alors que leur nombre est théoriquement moins important. Ceci est essentiellement lié au fait que les protons du massif polymère possèdent des temps de relaxation plus longs car portés par des chaînes polymères peu mobiles. Pour ces deux raisons, une estimation quantitative du taux de substitution en chaînes alkyle du HA amphiphile ne peut donc pas être obtenue par comparaison des différents signaux [26, 69]. Du point de vue purement technique, la solubilisation de l'échantillon donne naissance à une solution extrêmement visqueuse et sa mise en place est très difficile.

Nous nous sommes donc tournés vers la chromatographie en phase gazeuse pour les HA substitués par des chaînes alkyle. Pour ceux greffés par des groupements éthylphényle nous avons eu recours à la spectroscopie U.V.

II.2.2.1. Dosage des C_n par chromatographie en phase gazeuse

Cette méthode de dosage a été mise en œuvre au laboratoire pour l'analyse de pectines modifiées par des chaînes alkyle C_{12} , C_{16} et C_{18} [60], d'alginate et de hyaluronate de sodium substitués par des chaînes C_{12} et C_{18} [54].

Pour ce dosage, on commence par hydrolyser en milieu basique, les liaisons esters existant entre les chaînes alkyles et le squelette polysaccharidique. Les chaînes alkyle sont libérées et passent en solution sous forme de l'alcool correspondant dont l'extraction se fait par ajout de toluène. L'alcool contenu dans le solvant organique est ensuite dosé par chromatographie en phase gazeuse par comparaison avec des résultats obtenus grâce à un étalonnage réalisé au préalable avec le même alcool.

Le mode opératoire est le suivant pour le HAC_{12} (ou le HAC_6) :

Préparation des solutions étalons

250 mL d'une solution de tétradécanol (étalon interne du dodécanol) ou d'héptanol (étalon de l'héxanol) à 5 mg.mL^{-1} dans le toluène sont préparés. 1 fiole de 50 mL et 4 fioles de 10 mL

Chapitre II : Synthèse et caractérisation des hyaluronates amphiphiles

contenant respectivement 20, 40, 50, 60, 80 mg de dodécanol (ou d'héxanol) sont complétées jusqu'au trait de jauge par la solution de tétradécanol pour l'alcool en C12 ou de l'héptanol pour celui en C6. Les solutions sont homogénéisées pendant 24 h.

Préparation des solutions à analyser

- 100 mg de polymère modifié sont dissous dans 5 mL de NaOH 0,08 M. L'hydrolyse des liaisons ester a lieu pendant 4 h à température ambiante.
- 3 mL de la solution étalon à 1 mg.mL⁻¹ de dodécanol (ou d'héxanol) préparée précédemment sont ajoutés. Pour bien solubiliser les alcools dans le toluène, le mélange est vigoureusement agité à l'aide d'un agitateur de type Vortex pendant 4 min.
- Le mélange est centrifugé pendant 20 min à 5000 tr.min⁻¹ pour séparer les 2 phases.
- La phase organique est prélevée pour effectuer l'analyse en chromatographie. Pour doser le dodécanol ou l'héxanol, on injecte 0,2 µL de phase organique.

L'appareil de chromatographie utilisé ici est équipé d'une colonne capillaire. Dans ce type de colonne la phase stationnaire est un film liquide directement déposé sur la paroi de la colonne (épaisseur de l'ordre de quelques µm).

Le chromatographe employé (Shimadzu GC 17 AAF) est équipé d'une colonne SE30 de 2 m de longueur et d'un détecteur à ionisation de flamme. Les températures de l'injecteur et du détecteur sont fixées à 280°C. La température de la colonne est à 230°C pour doser le dodécanol à l'aide du tétradécanol comme étalon interne. Le débit de l'azote est de 25 mL.min⁻¹ et la détection se fait par ionisation de flamme. A cette température, le pic correspondant à l'héxanol se situait sous le pic du solvant, le toluène. Ainsi, afin de séparer complètement le solvant de l'héxanol, la température de la colonne a été abaissée à 110°C. Cette température permet l'obtention de pics distincts. L'étalon interne utilisé pour l'héxanol est un alcool de plus petite taille que celui utilisé pour le dodécanol, c'est l'heptanol. On constate l'existence d'un coefficient de partage entre le toluène et l'eau pour l'héxanol. Il sera calculé de façon précise et le dosage en tiendra compte.

Les chromatogrammes sont traités à l'aide du logiciel VP 4.2.

II.2.2.2. Dosage des -CH₂-CH₂-Phe par spectroscopie UV

Le dosage de ces groupements par spectroscopie UV utilise l'absorption des noyaux benzéniques.

La détermination s'appuie sur la loi de BEER-LAMBERT :

$$A = \epsilon l C = \epsilon C$$

A : Absorbance du composé étudié

l : longueur de la cuve (1 cm)

C : concentration du composé étudié en mol/L

ε : coefficient d'extinction molaire

Des études précédentes au LCPM ont montré que l'on pouvait calculer le taux de substitution en $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{Phe}$ du HA en déterminant le coefficient d'extinction molaire à 257 nm de l'alcool correspondant au motif ($\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{Phe}$) dans l'eau. Ce composé a une solubilité faible dans l'eau ($0,167 \text{ mol.L}^{-1}$) mais suffisante pour établir une courbe d'étalonnage pour de faibles taux de substitution en $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{Phe}$.

L'appareil utilisé est un spectrophotomètre UV-Visible de marque Bio-Tek instruments (Uvikon XL).

II.2.3. Etude, par RMN ^1H , de la pureté des polymères préparés

Bien que nous ne puissions pas utiliser la RMN pour déterminer le taux de chaînes alkyle, nous pouvons l'utiliser pour vérifier la pureté des produits synthétisés (absence de DMSO, réaction totale d'échange entre les ions Na^+ et TBA^+) à température ambiante. L'appareil utilisé est un spectromètre Brüker Avance 300.

Le spectre RMN ^1H d'un HA modifié par des chaînes alkyle comporte trois groupes de pics caractéristiques (

Figure II. 5) dans le D_2O :

- L'un autour de 4 ppm : un massif non résolu en raison de l'élargissement des pics représentatifs des protons du squelette polysaccharidique
- Les deux autres entre 0,8 et 1,8 ppm : les pics représentatifs de la chaîne alkyle (CH_3 et CH_2)

La pureté du dérivé obtenu est vérifiée par l'absence :

- du pic relatif au groupement TBA à 3,1 ppm,
- du pic caractéristique du DMSO à 2,7 ppm.

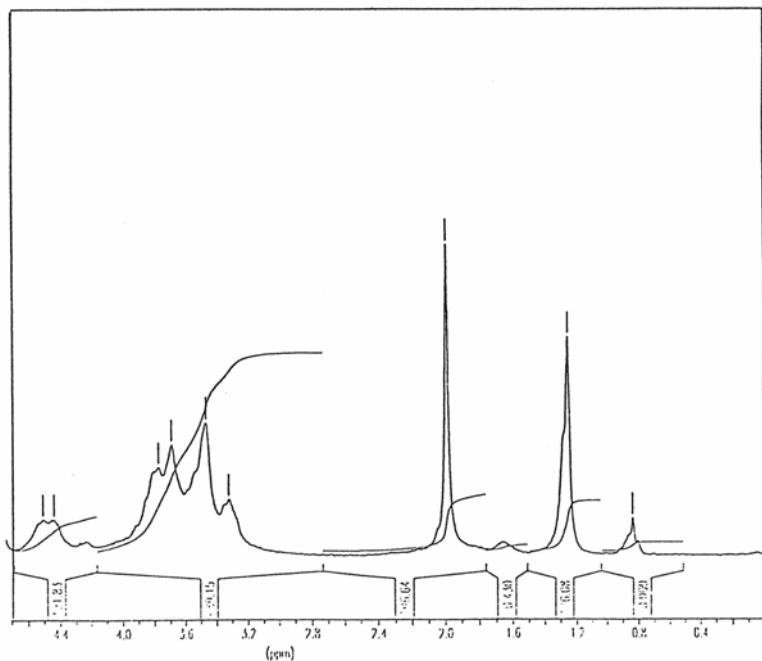


Figure II. 5 : Spectre RMN ^1H d'un hyaluronate modifié par des chaînes alkyle (C_{12}) (concentration de 10 mg.mL^{-1} dans D_2O)

Trois dérivés hydrophobisés (chaînes alkyle en C6, C₁₂ ou Phe) du HA ont ainsi été synthétisés.

Par la suite nous avons étudié leurs propriétés viscosimétriques et tensiométriques en milieu aqueux.

II.2.4. Viscosimétrie

Pour caractériser le comportement des HA modifiés en milieu aqueux, nous avons déterminé la viscosité intrinsèque $[\eta]$ et le coefficient de Huggins k_H , par des mesures viscosimétriques à faible concentration. Ces mesures ont été réalisées avec un viscosimètre automatique de type Ostwald (diamètre de 0,46 mm) de marque Viscologic TI.1 SEMATech®. Elles ont été effectuées dans NaCl 0,15 M à 25°C, milieu qui assure un écrantage de toutes les fonctions chargées.

Ces mesures sont possibles car les solutions de HA natif et modifié sont considérées comme des liquides newtoniens puisqu'on a vérifié que leur viscosité est constante à température constante et ce quelle que soit la vitesse de cisaillement. Le régime d'écoulement capillaire est alors considéré comme laminaire.

Toutes les concentrations de polymères ont été vérifiées par des extraits secs des solutions effectués pendant 24 h dans une étuve à 110°C. Ces tests ont toujours montré une correspondance supérieure à 95% entre la concentration mesurée et celle théorique.

II.2.5. Tensiométrie

L'appareil est un tensiomètre à goutte pendante (IT Concept, Longessaigne, France) dont le principe est donné sur la

Figure II. 6. Le solvant des polymères est du NaCl 0,15 M à une température de 25°C±0,5°C.

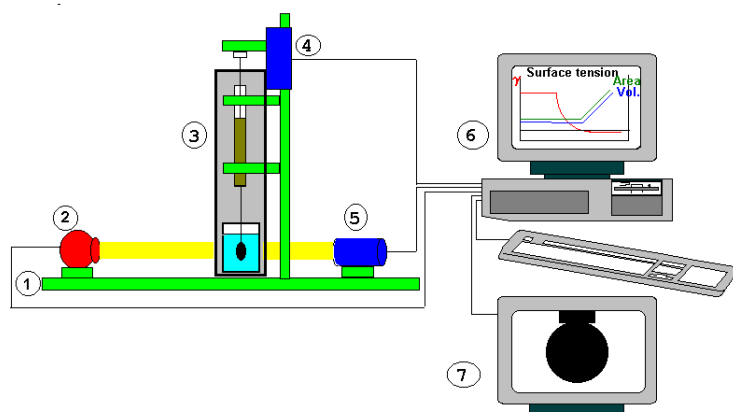


Figure II. 6 : Schéma du tensiomètre à goutte pendante (1 - Banc d'optique, 2 - Source lumineuse, 3 - Cellule de mesure thermostaatée et/ou pressurisée, 4 - Pousse seringue, 5 - Optique et caméra, 6 - Ordinateur, 7 - Ecran de contrôle.)

Principe de mesure :

Dans le cas d'une mesure de tension interfaciale, une goutte de solution est formée automatiquement à l'extrémité de l'aiguille d'une seringue dans une cuvette contenant un autre liquide non miscible. La goutte est éclairée par une source lumineuse uniforme, de type sphère intégrante, l'image de son profil est projetée par un objectif télécentrique sur une caméra CCD (512x512 pixels) ; elle est numérisée et ensuite traitée par logiciel pour déterminer plusieurs fois par seconde la tension interfaciale, la surface et le volume de la goutte grâce aux mesure de l'angle entre la goutte et un support à un point M (Figure II. 7). Pour la mesure de la tension superficielle, la goutte est une bulle d'air que l'on forme dans la solution aqueuse renfermant le produit à étudier.

Principe du calcul. L'équation de Laplace Young :

La tension interfaciale entre deux milieux liquide-liquide ou liquide-gaz peut être calculée à partir de l'étude du contour d'une goutte présentant une symétrie de révolution. La forme de la goutte est déterminée par la combinaison de la tension interfaciale et des effets de la gravitation. Les effets de la tension interfaciale forcent la goutte à prendre une forme

sphérique tandis que les effets de la gravitation ont tendance à l'allonger pour lui donner une forme en poire dans le cas d'une goutte pendante et à l'aplatir dans le cas d'une goutte posée. Lorsque l'importance de ces effets est du même ordre, on peut déterminer la forme du contour apparent et aussi les angles de contact entre la goutte et son support.

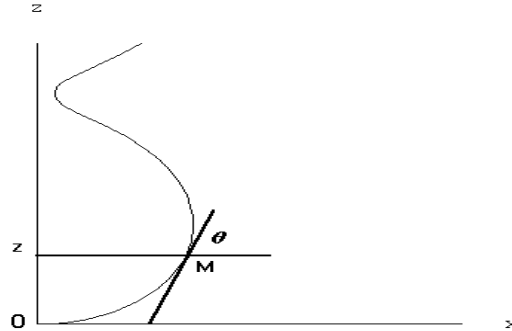


Figure II. 7 : Schéma montrant le principe de mesure de l'angle entre une goutte et un support au point M de coordonnées (x,z).

Le traitement s'appuie sur deux équations fondamentales:

- L'équation de Laplace-Young qui traduit que la différence de pression causée par la courbure de la surface est proportionnelle à la courbure moyenne, le coefficient de proportionnalité étant justement la tension interfaciale:

$$\Delta p = \gamma \left(\frac{1}{R} + \frac{1}{R'} \right)$$

Avec : Δp est la variation de pression à travers l'interface, due à la courbure de l'interface

γ la tension interfaciale

R et R' les rayons de courbures principaux de l'interface

Cette équation résulte d'un équilibre thermodynamique.

- La deuxième équation résulte de l'écriture d'un équilibre des forces au travers de tout plan horizontal:

$$2 \pi x \gamma \sin \theta = V(\rho_h - \rho_l)g + \pi x^2 p$$

Avec (voir Figure II. 7):

x et z les coordonnées du point M de la méridienne

θ l'angle de la tangente en M sur le contour de l'image de la goutte

V le volume du fluide sous le plan horizontal d'altitude z

ρ_h et ρ_l les masses volumiques respectives des deux fluides

g l'accélération de la pesanteur.

Mesures

Le mode opératoire peut être décrit comme suit:

Une solution de polymère, préparée 24 h à l'avance avec de l'eau milliQ, est placée dans une cuve thermostatée à $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$. La seringue en verre utilisée a un volume de 1mL. L'embout de l'aiguille est plongé dans la solution de polymère (HA modifié ou natif) à une concentration connue. Une bulle d'air est formée à un volume fixe de 5mm^3 qui est maintenu constant tout au long de la mesure à l'aide de la régulation automatique. Le temps $t=0$ correspond au temps juste après la formation de la bulle.

Remarque sur la valeur de γ_0 (tension interfaciale γ à l'instant $t = 0$) :

Le logiciel de calcul de la tension interfaciale est basé sur l'analyse des rayons de courbure de la goutte montrée Figure II. 8. L'analyse « idéale » de la tension interfaciale serait que la goutte présente un rayon de courbure uniforme sur toute sa surface. Ce cas idéal, où la goutte serait une sphère, peut être approché en augmentant de façon optimale le volume de cette bulle sans que celle-ci se détache du piston. Le volume de la bulle a donc une influence sur l'exactitude de la tension calculée: plus la bulle a une taille importante, plus la tension calculée se rapproche de la réalité. La tension superficielle eau/air est de 70 mN/m pour un volume de 5 mm^3 , 70,6 mN/m pour 8 mm^3 et 71,2 mN/m pour 12 mm^3 . Ces variations sont beaucoup plus importantes lorsque le volume est inférieur à 5 mm^3 [70]. Dans notre travail, la bulle d'air est stable dans une solution de HA natif ou modifié pour un volume d'air injecté de 5 mm^3 . Par conséquent, nous avons pris une valeur de γ_0 égale à 70 mN/m pour la tension de surface de l'eau pure.

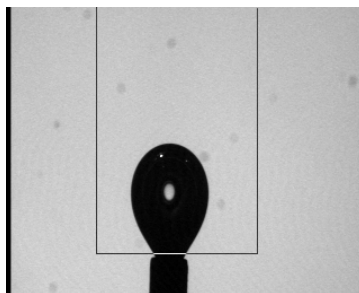


Figure II. 8 : Photo type de la goutte d'air formée dans une solution de HA modifié à 25°C . La zone délimitée par l'encadré permet au logiciel de délimiter la zone de la goutte à traiter numériquement.

Par cette technique, on a donc d'une part caractérisé le temps de mise en équilibre et d'autre part mesuré la tension superficielle des dérivés amphiphiles du HA (HAC_6 et HAC_{12}) à plusieurs concentrations.

III. Synthèse et caractérisation des HA amphiphiles

Comme nous l'avons déjà mentionné précédemment notre objectif était de préparer des HA amphiphiles susceptibles de stabiliser l'émulsion secondaire du procédé de préparation des nanoparticules de PLA (double émulsion/évaporation de solvant). Des travaux antérieurs au LCPM avaient en effet montré que l'utilisation de polymères amphiphiles hydrosolubles comme stabilisants permettait d'obtenir après évaporation du solvant, des nanoparticules cœur-couronne dont la couverture était constituée de la partie hydrosoluble du stabilisant polymère [71]. Nous avons également souligné que contrairement à ce qui avait été fait précédemment au LCPM, nous voulions préparer des HA amphiphiles dont le caractère associatif serait limité de façon à avoir des solutions aqueuses de faible viscosité. Cependant les HA amphiphiles devraient posséder des propriétés tensioactives suffisantes pour stabiliser les émulsions.

Or l'on sait que le caractère associatif d'un polymère amphiphile, est d'autant plus marqué que [2] :

- la chaîne greffée est plus hydrophobe. Pour les chaînes alkyles, l'hydrophobie est d'autant plus forte que la chaîne est longue
- le taux de substitution est plus élevé

La viscosité des solutions aqueuses de polymères amphiphiles dépend de l'établissement de liaisons hydrophobes entre chaînes alkyle (ou de phénomènes de « stacking » dans le cas des noyaux aromatiques) ce qui conduit à la formation d'espèces de grande taille.

Nous avons donc envisagé de greffer des chaînes à 6 (HAC₆) et à 12 (HAC₁₂) atomes de carbone ainsi qu'un groupe à 8 carbones comportant un noyau aromatique -CH₂-CH₂-Phe (HAPhe) de sorte à comparer l'effet du groupe phényle avec celui des chaînes alkyle.

En effet, lors de l'émulsification réalisée pour l'élaboration des particules, le HA amphiphile doit se positionner à l'interface phase organique-phase aqueuse. Le temps de diffusion et d'orientation des chaînes polymères (chaînes hydrophobes venant plonger dans la phase organique, squelette polysaccharidique hydrophile orienté vers la phase aqueuse) dépend de la viscosité de la solution c'est à dire de la concentration en polymère et de sa taille. C'est pourquoi pour éviter que cette cinétique de diffusion soit trop lente au cours de l'émulsification qui, elle, doit se faire assez rapidement, il est donc important de limiter la viscosité de la phase aqueuse contenant le HA amphiphile.

III.1. SYNTHÈSE DES HA AMPHIPHILES : HAC_N (N = 6 ET 12) ET HAPHE

Le schéma de la synthèse utilisée a déjà été donné sur la Figure II.4.

Les conditions expérimentales utilisées ont été détaillées dans le par. II.1.3.

Pour le choix du taux de substitution, les études précédemment réalisées au LCPM et l'expérience acquise nous ont amenés à viser un taux relativement faible pour le HAC₁₂ (environ 6%) et un plus élevé pour le HAC₆ (environ 15%). Le greffon -CH₂-CH₂-Phe n'ayant jamais été testé auparavant, on a décidé de viser un taux intermédiaire d'environ 10%.

Dans les protocoles expérimentaux, les quantités de bromures d'alkyle utilisées pour la réaction ont donc été ajustées en tenant compte de leur réactivité déjà évaluée lors d'études précédentes [59, 61, 72]. Pour le bromure d'éthylphényle (Br-CH₂-CH₂-Phe) nous avons supposé que la réactivité était du même ordre de grandeur. La synthèse des trois types de hyaluronate est rigoureusement la même jusqu'à l'ajout du bromure correspondant aux chaînes hydrophobes.

Le taux de substitution a été déterminé par chromatographie en phase gazeuse (HAC₁₂ et HAC₆) ou par spectrométrie UV-visible (HAPhe).

Les différents taux de substitution seront donnés en moles de greffons pour 100 moles de motifs monosaccharidiques.

III.2. ETUDE DE LA STABILITE DU SQUELETTE DE HA AU COURS DE LA MODIFICATION CHIMIQUE :

III.2.1. Rappel des résultats déjà obtenus au LCPM sur la dégradation du HA au cours de la synthèse

Au LCPM, le protocole de synthèse n'a cessé d'évoluer pour la modification chimique des hyaluronates par des chaînes alkyle.

Dans la thèse de S. Pelletier [3], la phase d'acidification de départ du polymère (par le mélange Et-OH 70%, HCl 0,6 M pendant 16h) avait engendré une très forte dégradation du squelette abaissant ainsi fortement la masse molaire moyenne en masse de 480 000 à 17 000 g.mol⁻¹. Cette dégradation étant gênante pour la suite des études, le protocole a donc été modifié. Ainsi, actuellement l'étape d'acidification (nécessaire pour salifier les carboxylates de sodium par le TBA) est réalisée avec de l'HCl 0,06 M en 15 min et 5°C. Le taux d'acidification des fonctions carboxylates est alors proche 80% et la dégradation est limitée comme on le verra plus loin.

II.2.2. Résultats obtenus au cours de ce travail

A chaque étape de la synthèse, les masses molaires moyennes des dérivés ont été déterminées par SEC-MALLS afin d'évaluer l'influence des conditions opératoires sur la stabilité chimique du squelette polysaccharidique (

Tableau II. 3). On remarquera que seuls les dérivés non amphiphiles ont été analysés. On peut cependant évaluer la stabilité du squelette de HA au cours de la synthèse totale en la réalisant dans les conditions standard, mais sans ajouter les dérivés bromés.

Polymères	$\overline{M}_n$ (kg.mol ⁻¹)	$\overline{M}_w$ (kg.mol ⁻¹)	$I = \frac{\overline{M}_w}{\overline{M}_n}$
HA natif	590	630	1,07
HA après acidification (15 min à 4°C)	550	625	1,13
HA après synthèse complète sans ajout de bromure (acidification, neutralisation, lyophilisation, 48 h dans DMSO, purification	410	500	1,22

Tableau II. 3 : Suivi des masses molaires moyennes à différentes étapes de la synthèse d'un HA amphiphile

On remarquera dans le **Tableau II. 3** que l'étape d'acidification ne provoque pas de baisse significative de la masse molaire. En revanche à la fin de la synthèse, on voit que les masses molaires du HA ont diminué d'environ 30 % sans que nous ayons vraiment pu conclure quant au rôle des différentes étapes (neutralisation par le TBAOH, lyophilisation....) dans cette diminution. Une variation de masse molaire du HA a été observée au cours d'un protocole analogue par Tokita *et coll.* et ils ont attribué cette diminution au procédé de lyophilisation [73]. En effet pendant la lyophilisation, on « surconcentre » la solution condensée par sublimation de l'eau et alors il suffit qu'il y ait un léger excédent d'ions OH^- ou H^+ à la fin de la neutralisation pour qu'on obtienne des milieux hyperbasiques ou acides en fin de lyophilisation qui pourraient être responsables de ce phénomène de dégradation.

III.3. CARACTERISATION CHIMIQUE : DETERMINATION DES TAUX DE SUBSTITUTION EN GROUPES HYDROPHOBES

Le dosage des groupes hydrophobes greffés sur le polymère est effectué par chromatographie en phase gazeuse pour les chaînes alkyle linéaires et par absorption ultraviolet pour le groupe aromatique Phe-(CH₂)₂-.

III.3.1 Dosage des chaînes C_n par chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Le principe de cette détermination a été décrit dans le par. II.2.2.1.

Le dosage des greffons se fait après plusieurs étapes : hydrolyse des fonctions ester par une solution alcaline, extraction par le toluène de l'alcool libéré, dosage par CPG de l'alcool en question. Dans le cas du HAC₆ l'alcool est de l'hexanol. C'est du dodécanol dans le cas du HAC₁₂. La technique de dosage avait été validée pour des dérivés d'alginate substitués par des chaînes en C₁₂ et C₁₈ par l'intermédiaire de fonctions ester (l'alginate est un polysaccharide assez comparable au HA)[3]. Des expériences avaient été faites en rajoutant des quantités connues d'alcool (C₁₂-OH et C₁₈-OH) à une solution d'alginate natif et après traitement par la soude, ces quantités avaient été retrouvées par CPG.

Le dosage des alcools libérés par l'hydrolyse, nécessite de tracer au préalable des droites d'étalonnage reliant l'aire du pic d'alcool obtenu en CPG au temps d'élution. En même temps que les solutions étalons, on injecte également du tétradécanol (dans le cas du dosage du C₁₂-OH, Figure II. 9) et de l'heptanol (dans le cas du dosage du C₆-OH) en quantité connue. Ces alcools jouent le rôle de référence interne

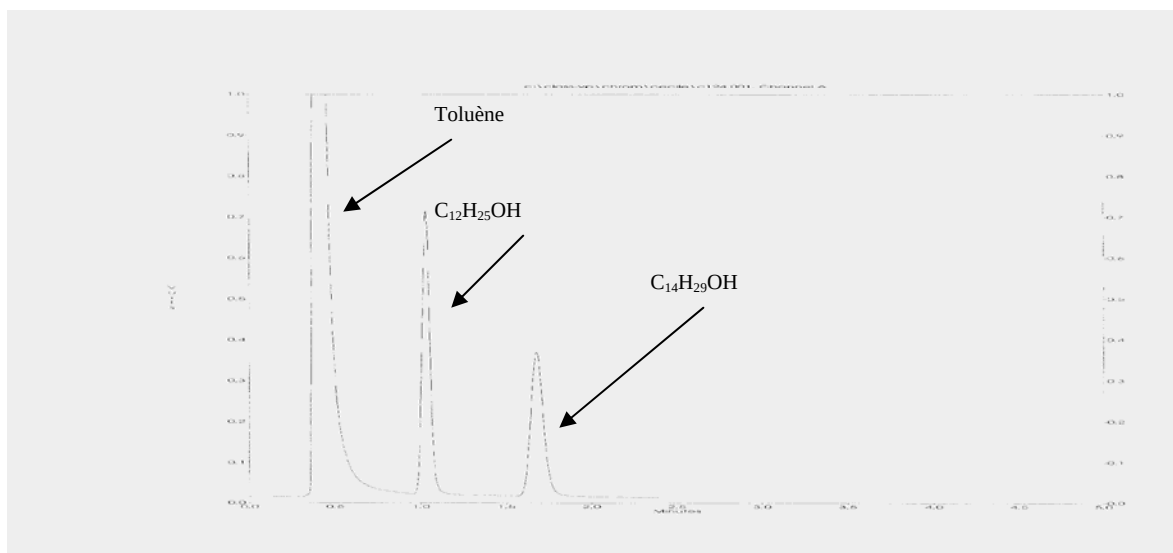


Figure II. 9 : Chromatogramme en phase gazeuse du dodécanol et du tétradécanol dans le toluène (débit N_2 de 25 ml/min ; Température de la colonne 230°C).

La

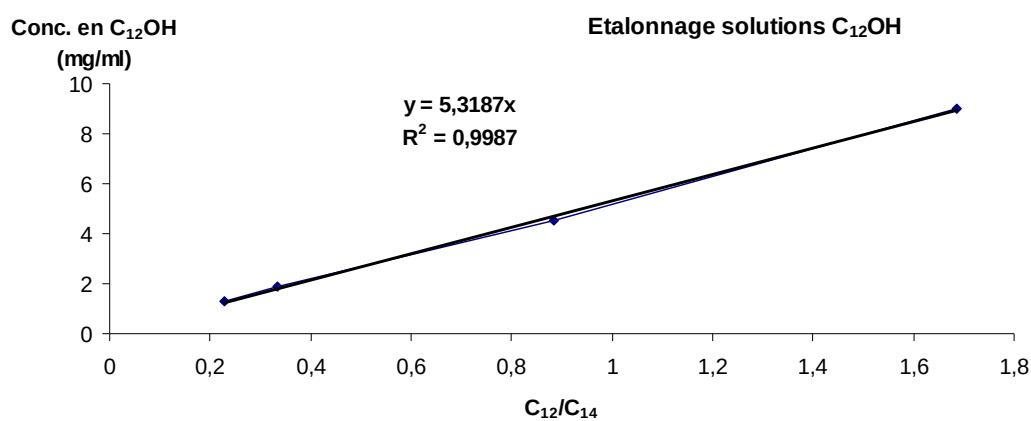


Figure II. 10 montre la courbe d'étalonnage obtenue dans le cas du dosage du dodécanol.

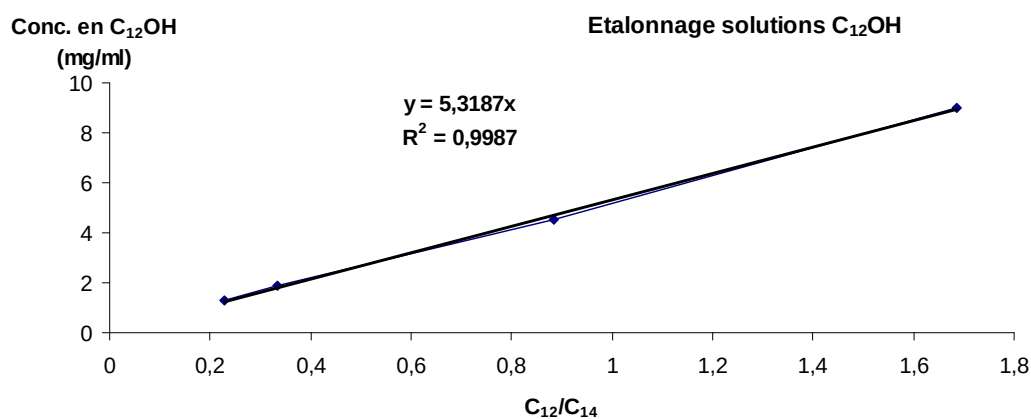


Figure II. 10 : Courbe d'étalonnage représentant la concentration de $C_{12}OH$ en fonction du rapport des aires sous les pics de $C_{12}OH$ et $C_{14}OH$.

Pour la synthèse du HAC₁₂ pour laquelle nous avons visé un taux de substitution d'environ 6%, on trouve 5,5% par cette méthode de dosage.

Dans le cas du HAC₆ des premiers essais en chromatographie en phase gazeuse, réalisés dans les conditions préalablement mises au point au laboratoire (température de la colonne : 230°C), n'ont pas été concluants. En effet le pic du toluène n'a pas pu être séparé du pic de l'hexanol. Comme la température de la colonne influence la vitesse de migration des composés à travers celle-ci, nous avons baissé la température pour tenter d'avoir la séparation escomptée. La configuration optimale de séparation des pics et de temps de séparation a été obtenue pour une température de 110°C.

Avant de tracer une courbe d'étalonnage et afin de pouvoir valider la technique d'extraction de l'hexanol par le toluène, un alginate modèle substitué par des chaînes à 6 C a été soumis au même traitement c'est-à-dire hydrolyse de la liaison ester et extraction par le toluène. Ce même traitement a été appliqué à de l'alginate non modifié auquel on a rajouté une quantité connue d'hexanol.

Les résultats obtenus démontrent que l'on ne parvient pas à extraire par le toluène, la totalité de l'hexanol dissous dans la solution aqueuse résultant du traitement basique, en raison du fait que la solubilité de l'alcool dans cette solution est loin d'être négligeable par rapport à ce qu'elle est dans le toluène.

Dans les études précédemment réalisées au laboratoire, il s'agissait d'alcools présentant des chaînes hydrophobes plus longues (C₁₂ et C₁₈) que les chaînes en C₆, et les alcools libérés au cours de l'hydrolyse des fonctions ester étaient de ce fait beaucoup moins solubles en milieu aqueux.

Pour parvenir cependant à évaluer le taux de greffage en C₆ du HAC₆, en sachant qu'une partie de l'hexanol reste dissoute dans la solution aqueuse d'hydrolyse, nous avons alors mesuré le coefficient de partage de l'hexanol entre le toluène et une solution aqueuse de composition similaire à celle utilisée pour le traitement du HAC₆ par la soude, le tout étant réalisé dans des conditions de volumes de solvants, de soude et de polymère identiques à celles du traitement réel du polysaccharide modifié. Grâce à différents essais réalisés avec des concentrations variables d'hexanol connues et après analyse par chromatographie gazeuse, nous avons alors pu calculer le coefficient de partage de l'alcool entre ces 2 phases qui est de $0,81 \pm 0,05$ ($n = 7$). Nous avons alors tenu compte de ce coefficient dans le calcul de la quantité d'hexanol libérée par le HAC₆ et avons estimé le taux de greffage à environ 14%.

III.3.2. Dosage des groupements $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{Phe}$ par spectroscopie UV

Le HAPhe étant soluble dans l'eau, le dosage a été effectué directement sur sa solution aqueuse.

Le dosage des groupements $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{Phe}$ par spectroscopie UV repose sur le dosage des noyaux benzéniques. Le principe a été décrit dans le par. II.2.2.2.

La Figure II.13 donne le spectre UV du HAPhe ainsi que celui du HA non modifié. Le calcul a été effectué à 257 nm.

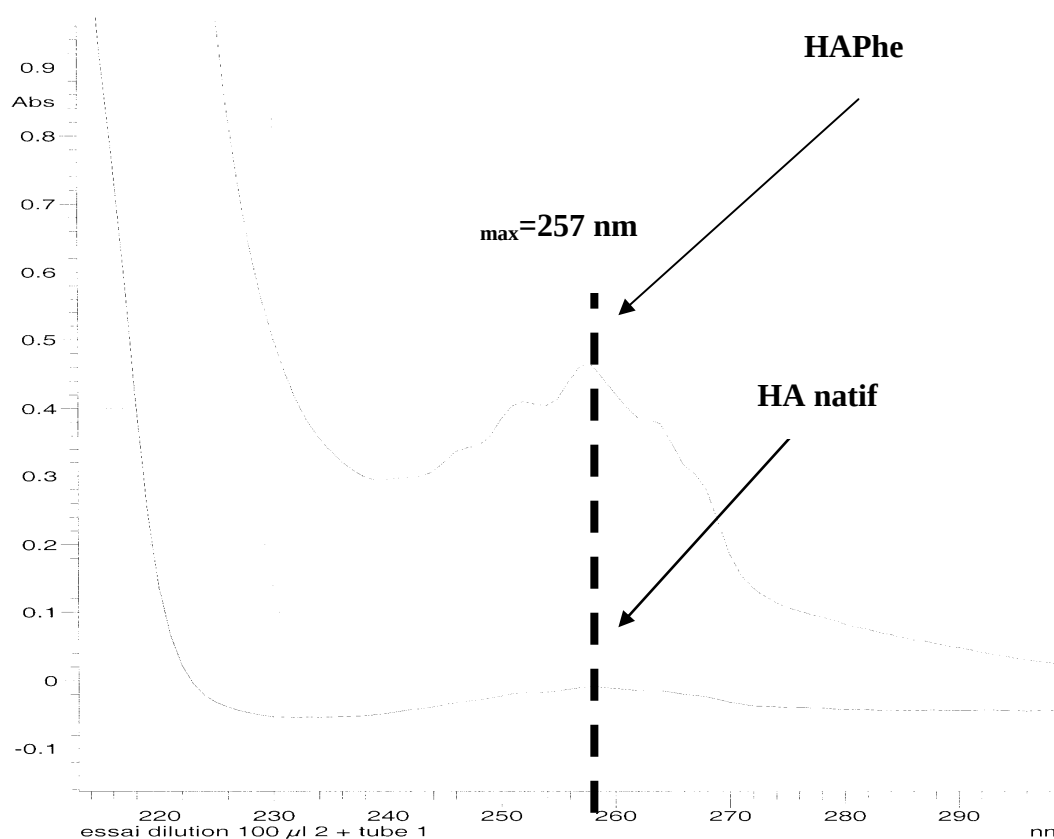


Figure II. 11 : Spectres UV à 257 nm du HAPhe (spectre du haut) et du HA non modifié (spectre du bas) à 1 g/L dans l'eau à 25°C.

La droite d'étalonnage donnée sur la Figure II. 12 a été tracée avec $\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{Phe}$ en mesurant son absorbance à 257 nm à différentes concentrations dans l'eau à 25°C. La Figure II.12 montre que le HA n'a qu'une très faible absorbance à cette longueur d'onde, ceci nous permettant d'utiliser le polymère modifié directement pour doser le taux de substitution en $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{Phe}$.

Dans la loi de Beer-Lambert :

$$A = \epsilon l C = \epsilon C$$

A : Absorbance de la solution

ϵ : Coefficient d'extinction molaire du composé ($\text{L.cm}^{-1}.\text{mol}^{-1}$)

C : concentration du motif $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{Phe}$ (mol.L^{-1})

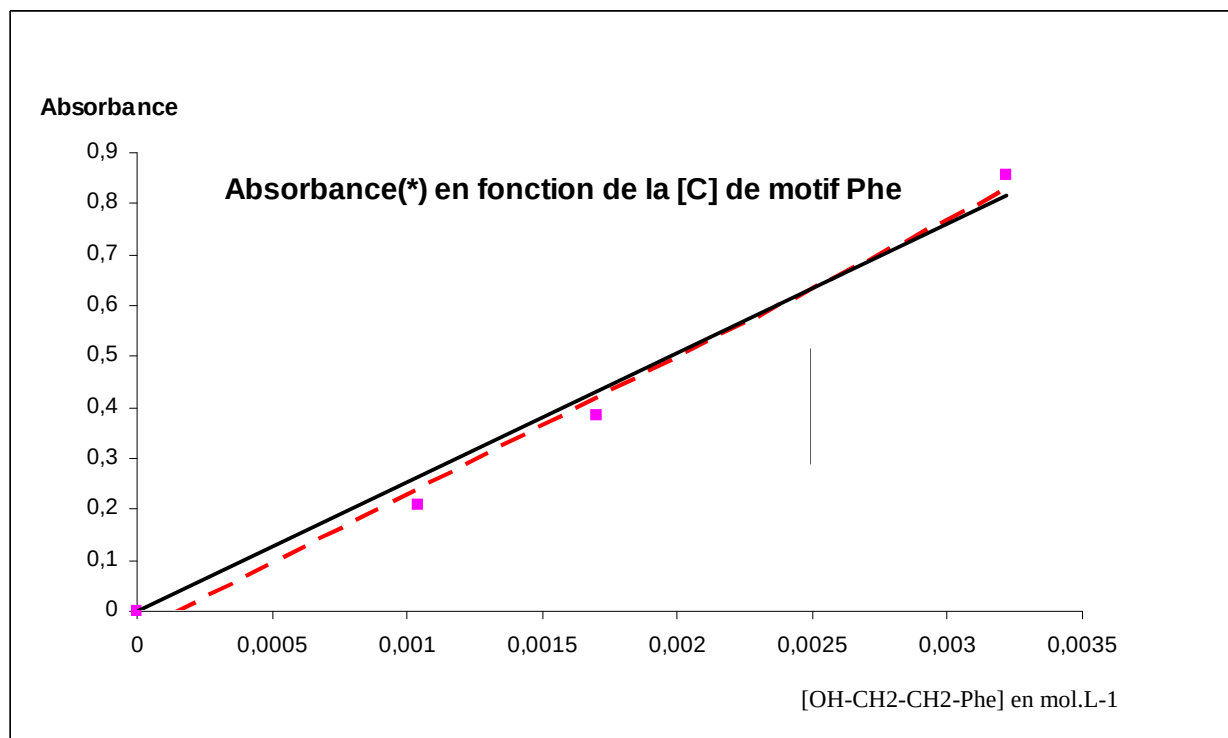


Figure II. 12 : Courbe d'étalonnage représentant l'absorbance de $\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{Phe}$ à 257 nm dans l'eau à 25°C.

Cette droite permet de calculer une moyenne du coefficient d'extinction molaire du groupement $\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{Phe}$: il est de $170 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ dans l'eau à 25°C. Avec le spectre du HA natif (utilisé comme ligne de base) et du HA modifié dans l'eau, on calcule aisément le taux de substitution en motifs $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{Phe}$ sur le HA amphiphile. Le taux de greffage ainsi calculé est de 10 mol de $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{Phe}$ pour 100 mol de motif monosaccharidique.

III.3.3. Conclusion

Après avoir mis au point la synthèse des HA amphiphiles et vérifié la reproductibilité des résultats, nous avons travaillé sur des quantités un peu plus grandes de façon à pouvoir disposer d'environ 1 g de chacun des HA modifiés.

Les taux de substitution des polymères utilisés dans la suite sont les suivants :

Pour le HAC_{12} , 5,5 mol C_{12} /100 mol motif monosaccharidique

Pour le HAC₆, 14 mol C₆/100 mol motif monosaccharidique

Pour le HAPhe, 10 mol motif -CH₂-CH₂-Phe /100 mol motif monosaccharidique

Dans la suite nous nous contenterons donc de nommer les différents HA amphiphiles sans préciser les taux de substitution, soit HAC₁₂, HAC₆, HAPhe.

Pour caractériser les propriétés physico-chimiques de ces dérivés, nous avons ensuite entrepris de les étudier en milieu aqueux.

III.4. PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES EN SOLUTION AQUEUSE

Lors de la synthèse des nanoparticules par double émulsion/évaporation de solvant, le HA natif ainsi que les HA modifiés sont dissous en solution aqueuse.

Les deux émulsifications successives mises en œuvre dans ce procédé, nécessitent un apport d'énergie, l'un sous forme d'entrechoquements et l'autre par émission d'ultrasons. La connaissance de paramètres physicochimiques essentiels tels que la viscosité intrinsèque ou la tension superficielle est d'autant plus importante qu'elle pourrait nous permettre d'expliquer les différences apparaissant lors de changements de durée d'émulsification, de concentration en polymère et du type de HA modifié utilisé.

III.4.1. Etude par viscosimétrie capillaire

III.4.1.1. Principe et choix du solvant

La viscosité intrinsèque d'un polymère $[\eta]$ dans un solvant donné et à une température définie ainsi que le coefficient de Huggins k_H (voir les définitions ci-dessous), permettent d'avoir une idée sur le volume hydrodynamique de la chaîne macromoléculaire en solution et sur l'état d'agrégation éventuel. Plus précisément k_H est d'autant plus faible que les interactions polymère/solvant sont importantes ou, en d'autres termes, que le milieu constitue un bon solvant pour le polymère considéré (k_H est alors compris entre 0,3 et 0,8). A l'inverse, k_H augmente jusqu'à devenir supérieur à 1 lorsque ces interactions sont défavorisées, les interactions polymère/polymère étant alors prépondérantes.

Lorsque les polymères sont étudiés dans l'eau et que ce sont des polyélectrolytes, la présence de nombreuses charges conduit à une expansion des pelotes, responsable d'une très forte augmentation de la viscosité, voire d'une impossibilité de mesurer $[\eta]$. Il est alors nécessaire d'effectuer les mesures de viscosité dans une solution saline de force ionique suffisante pour

écranter les charges. Quand la force ionique est suffisante, on considère que la viscosité intrinsèque mesurée caractérise le polymère neutre.

La viscosité intrinsèque est exprimée selon :

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0 C_p}$$

Avec : η_0 et η viscosité respective du solvant et de la solution de polymère
 C_p : Concentration du polymère

et la viscosité spécifique réduite par :

$$\frac{\eta_{sp}}{C_p} = [\eta] + k_H \cdot [\eta]^2 \cdot C_p + \dots$$

Avec : $\eta_{sp} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0}$: Viscosité spécifique du polymère.

$[\eta]$: Viscosité intrinsèque du polymère.

k_H : Coefficient de Huggins.

Les deux paramètres $[\eta]$ et k_H sont donc fortement liés aux conditions d'étude et, plus particulièrement, à la nature du solvant.

La viscosité intrinsèque est déterminée en portant la valeur de $\frac{\eta - \eta_0}{\eta_0 C_p}$ en fonction de C_p et en

extrapolant à $C_p = 0$. On peut aussi porter la valeur de $\frac{1}{C_p} \text{Log} \frac{\eta}{\eta_0}$ vs C_p et extrapoler à $C_p =$

0. On doit obtenir la même valeur de $[\eta]$.

III. 4.1.2. Résultats et discussion

Les paramètres viscosimétriques du HA natif et des 3 HA amphiphiles sont rassemblés dans le Tableau 5.

	<i>HANa</i>	<i>HAC₆</i>	<i>HAC₁₂</i>	<i>HAPhe</i>
$[\eta] \text{ (mL/g)}$	730±8	240±4	380±4	25±6

k_H	0,6	1,20	0,85	0,25
-------	-----	------	------	------

Tableau II. 4 : Viscosité intrinsèque $[\eta]$ et coefficient de Huggins k_H pour les différents types de HA étudiés, déterminés par viscosité capillaire (NaCl 0,15 M, T=25°C (n=8))

Pour le HA natif, la valeur de $[\eta]$ autour de 730 mL/g et celle de k_H comprise entre 0,3 et 0,8 sont caractéristiques des polymères en bon solvant.

On note que la viscosité intrinsèque des HA modifiés baisse de façon importante ce qui démontre une diminution des interactions polymère-solvant associée ou non à une augmentation des interactions polymère-polymère. Ce phénomène est bien connu et correspond au fait qu'en milieu aqueux à faible concentration et particulièrement en présence de NaCl, des « interactions » hydrophobes s'établissent majoritairement entre des groupes apolaires portées par une même chaîne polymère, ce qui provoque la réduction du volume hydrodynamique de la pelote macromoléculaire d'où une diminution de la viscosité de la solution. Cet effet est d'autant plus important que l'hydrophobie du greffon est plus forte et que le taux de substitution est plus élevé. On voit sur le tableau 5 que la réduction de viscosité est plus importante pour le HAC₆ que pour le HAC₁₂ bien que le C₁₂ soit plus hydrophobe que le C₆. Dans ce cas c'est l'effet du taux de substitution (14% pour le C₆ contre 5,5% pour le C₁₂) qui est prépondérant et globalement c'est le HAC₆ qui a le caractère hydrophobe le plus marqué. Cet effet se retrouve également dans les valeurs de k_H (supérieures à 1 pour les 2 HAC_n ce qui traduit le fait que l'eau est un moins bon solvant pour ces dérivés que pour le HA natif) puisque la valeur de k_H pour le HAC₆ est supérieure à celle de HAC₁₂ (1,19 contre 0,84). La baisse de viscosité intrinsèque la plus nette est obtenue pour le HA modifié avec des groupements -CH₂-CH₂-Phe. Il faut cependant noter à ce sujet que nous n'avons pu dissoudre le HAPhe dans le milieu aqueux de façon satisfaisante. En effet, et même à des concentrations relativement faibles (1 g/L), la limpidité de la solution aqueuse de HAPhe n'est pas parfaite. Nous avons pu constater par spectroscopie de corrélation de photons (PCS voir chapitre III) la formation de nanoaggrégats et mesurer leur taille (50 nm à 1 g/L). Il est clair que dans ces conditions, il ne faille pas accorder beaucoup de sens aux valeurs expérimentales obtenues pour ce dérivé.

III.4.2. Etude par tensiométrie

III.4.2.1. Généralités

Les propriétés d'adsorption des polymères aux interfaces liquide/liquide sont souvent caractérisées par des mesures cinétiques de tension interfaciale. Toutefois, que ce soit d'un point de vue théorique ou expérimental, le nombre de travaux concernant l'étude de ces mécanismes d'adsorption est beaucoup moins important que celui traitant de l'adsorption des polymères aux interfaces solide/liquide. De ce fait, il est encore difficile de définir des relations directes entre la structure d'un polymère donné et ses propriétés d'adsorption aux interfaces liquide/liquide. Cependant, il est clairement établi que les paramètres tels que la masse molaire du polymère, sa concentration, sa polymolécularité, sa flexibilité ainsi que les énergies d'interaction entre les différents blocs qui composent le polymère et les deux phases liquides, sont à prendre en compte [74, 75].

En ce qui concerne l'aspect cinétique de l'adsorption aux interfaces, le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre thermodynamique à l'interface peut varier de quelques minutes à quelques heures selon les polymères. Au début du processus d'adsorption et/ou aux faibles concentrations en polymère, les macromolécules en solution n'interagissent généralement pas avec celles déjà adsorbées à l'interface. Aux fortes concentrations, l'étape la plus lente semble être le réarrangement des chaînes adsorbées à l'interface, vers leur état d'équilibre.

L'aspect conformationnel joue également un rôle important dans l'établissement de l'équilibre d'adsorption. A l'interface solide/liquide, un polymère s'adsorbe dans une conformation dépendant entre autres de la quantité de polymère adsorbé à l'interface. A l'interface liquide/liquide, la conformation du polymère va dépendre en outre des paramètres d'interaction entre les différents blocs du polymère et les deux phases liquides, et donc de la façon dont les blocs du polymère se partagent entre les deux phases.

III.4.3.2. Résultats

La première expérience a consisté à comparer les courbes d'évolution de la tension interfaciale de solutions contenant du HA natif ou modifié à 0,3 g/L dans l'eau. Ces résultats montrés sur la Figure II. 13 montre un effet de la modification chimique sur la cinétique de la tension interfaciale.

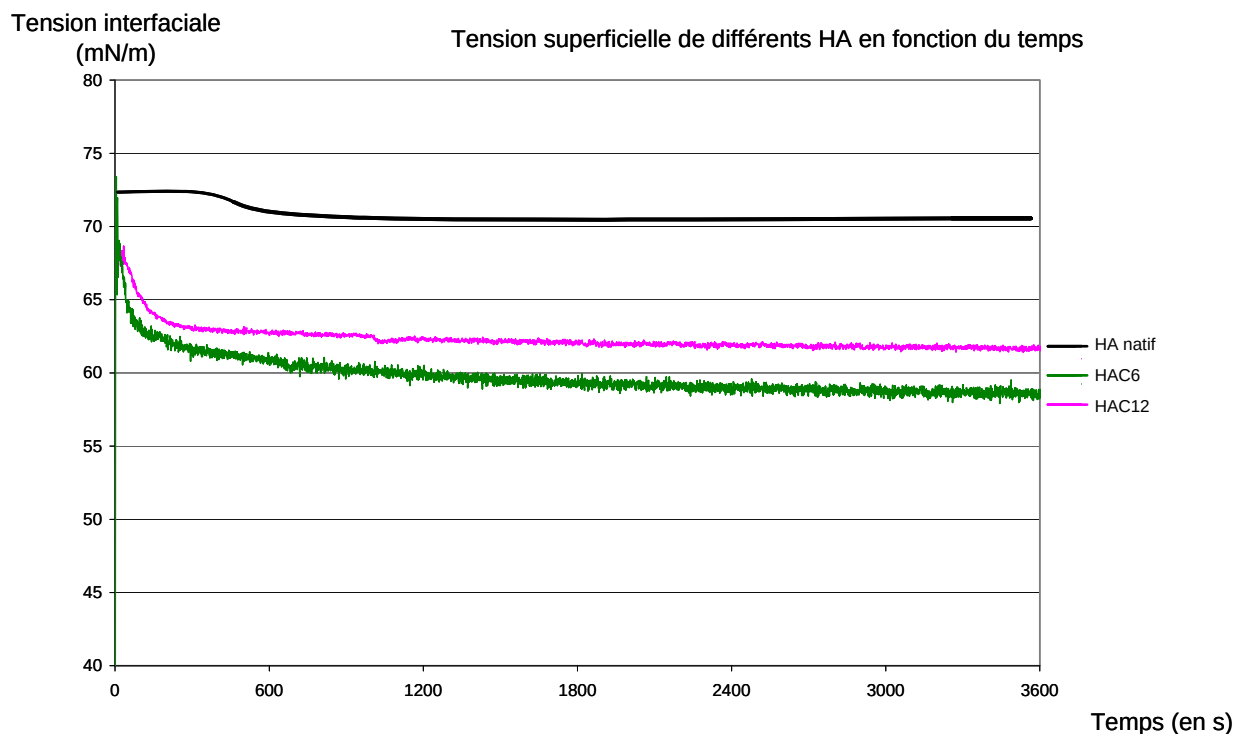


Figure II. 13 : Cinétique de la tension interfaciale pour le HA natif, le HAC₆ et le HAC₁₂ à 0,3 g/L dans l'eau à 25°C.

Cette figure montre deux types d'effet au niveau de la tension interfaciale :

- un effet d'abaissement de la tension interfaciale pour les HA modifiés dont les tensions interfaciale à l'équilibre (γ_e) sont environ de 60 mN/m. en revanche, pour le HA natif cette diminution n'est que relative car γ_e du HA natif reste supérieur à 70 mN/m.

Cet abaissement est dû à la stabilisation de l'interface par les groupements alkyle greffés. La légère baisse constatée avec le HA natif caractérise l'abaissement de tension superficielle air/eau dans un solvant aqueux plus visqueux et du léger caractère amphiphile des groupes CH₃ du HA natif.

- L'absence du plateau initial où la tension interfaciale initiale (γ_0) ne varie pas pendant environ 8 min pour le HA natif.

Dès lors que la bulle d'air est formée dans la solution aqueuse de HA modifié, les chaînes alkyle migrent et stabilisent celle-ci en abaissant la tension interfaciale.

La valeur γ_e et la pente de cet abaissement sont directement liées à la concentration des ces HA modifiés. C'est ce que l'on peut voir sur les Figure II. 14 et Figure II. 15 caractérisant l'évolution de la tension superficielle des solutions de HAC₆ et HAC₁₂ à différentes concentrations. Les concentrations 0,5 et 1 g/L ont été choisies car ce sont celles qui ont servi

à la synthèse de nanoparticules. Des expériences à une concentration de 15 g/L ont été faites dans le but d'amplifier l'effet de la concentration en HA modifié sur les propriétés surfactives.

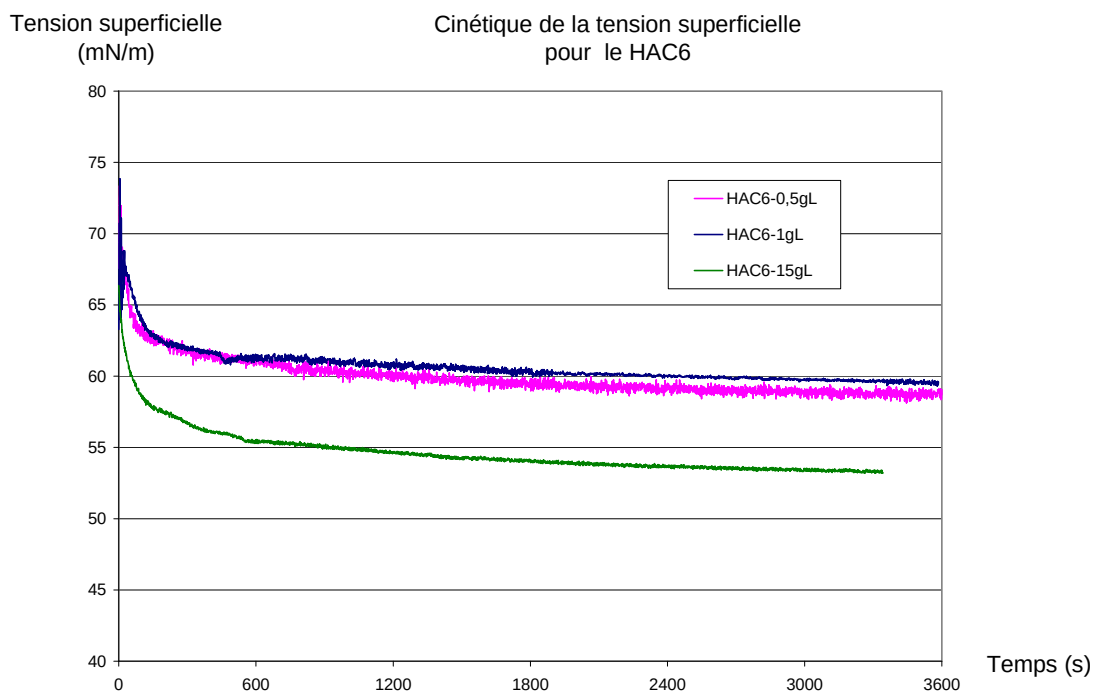


Figure II. 14 : Cinétique de l'évolution de la tension superficielle d'une solution de HAC₆ à différentes concentrations dans l'eau à 25°C.

La Figure II. 14 montre la variation de la tension superficielle avec le temps, de solutions aqueuses de HAC₆ à différentes concentrations. On voit tout d'abord que la tension superficielle baisse assez fortement à partir de 73 mN/m, durant les 15 premières minutes puis beaucoup plus lentement pour atteindre un pseudo-plateau au-delà de 2 heures. Ce pseudo-plateau correspond à une tension superficielle d'environ 58 mN/m pour les plus faibles concentrations (0,5 et 1 g/L). La tension superficielle à l'équilibre pour la concentration la plus élevée (15 g/L) est plus faible, environ 52 mN/m, probablement en raison de la présence d'un plus grand nombre de chaînes amphiphiles aux fortes concentrations. Cette concentration de 15 g/L permet probablement une meilleure saturation de l'interface air/eau avec peut-être un réarrangement stérique permettant d'optimiser le nombre de molécules de HA amphiphile à l'interface et donc d'abaisser la tension interfaciale.

Pour le HAC₁₂ la Figure II. 15 montre la variation de la tension superficielle avec le temps, de solutions dans l'eau à différentes concentrations. On voit que, comme pour le HAC₆ aux plus faibles concentrations (0,5 et 1 g/L), la tension superficielle baisse assez fortement à partir de

75 mN/m, durant les 15 premières minutes. Cependant un plateau d'environ 60-62 mN/m est atteint beaucoup plus rapidement, au bout de 30 minutes. La tension superficielle à l'équilibre pour la concentration la plus forte (15 g/L) est atteinte après un temps beaucoup plus long (près de 6 h) et est bien plus faible, environ 40 mN/m. A cette concentration, la solution de HAC₁₂ commence à être visqueuse et limite la diffusion des chaînes macromoléculaires amphiphiles vers l'interface, ce qui ralentit l'établissement de l'équilibre. La plus faible tension à l'équilibre est également sans doute le résultat d'un plus grand nombre de chaînes amphiphiles à l'interface d'où une meilleure stabilisation de l'émulsion.

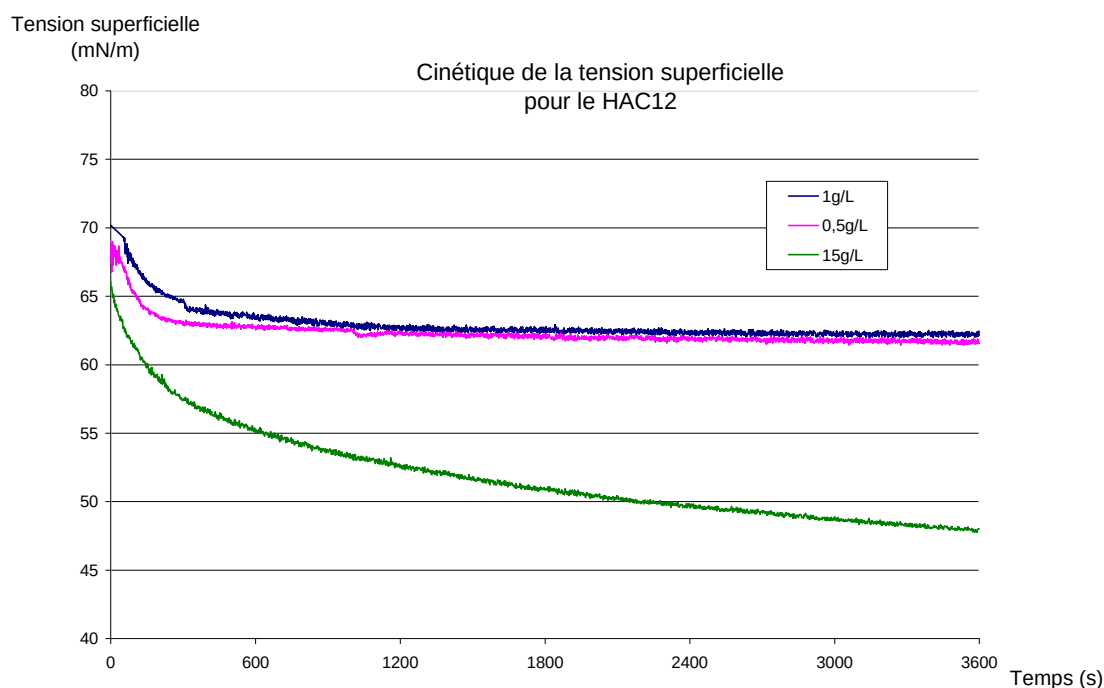


Figure II. 15 : Cinétique de l'évolution de la tension superficielle d'une solution de HAC₁₂ à différentes concentrations dans l'eau à 25°C.

III.4.2.3. Conclusion

D'une manière générale, le nombre des expériences en tensiométrie n'est pas suffisamment élevé pour pouvoir tirer des conclusions sur l'influence des paramètres tels que la longueur des chaînes alkyle et leur taux de greffage, sur l'activité de surface des HA modifiés. La seule tendance évidente est que l'augmentation de la concentration du HA modifié jusqu'à 15 g/L contribue à baisser la tension à l'équilibre de manière plus significative qu'avec 0,5 et 1 g/L (Tableau II.5).

Concentration en polymère (g/L)	HAC ₆	HAC ₁₂	HA
---------------------------------	------------------	-------------------	----

0,3	55-57 après # 2 h	60-62 après # 2 h	71 après # 2 h
0,5	55-57 après 2 h	# 60 après # 5 h	-
1	55-57 après 2 h	# 60 après # 5 h	-

Tableau II.5 : Tension superficielle (en mN/m) de solutions aqueuses de HACn et HA à différentes concentrations.

Globalement, les tensions superficielles à l'équilibre sont plus élevées que celles obtenues pour un dérivé similaire du dextrane, un polysaccharide neutre [76].

Dans le

Tableau II. 6, sont reportées les valeurs de tension superficielle à l'équilibre mesurées dans les mêmes conditions, pour les dérivés du HA et du dextrane, substitués de manière similaire.

	Tension superficielle en mN/m		
Concentration en polymère (g/L)	0,5	1	5
HAC₆-14%	56-58	56-58	55-57
dextraneC₆-15,5%	40	38	34
HAC₁₂-5,5%	60-62	60-62	46-48
dextraneC₁₀-7%	44	37	37

Tableau II. 6 : Comparaison des tensions superficielles à l'équilibre de dérivés amphiphiles de HA et de dextrane de composition analogue [76].

Plusieurs explications peuvent être avancées pour expliquer que, d'une manière générale, les tensions superficielles à l'équilibre, des dérivés du HA sont plus élevées que celles du dextrane dans des conditions comparables.

Ainsi le dextrane possède une meilleure flexibilité que le HA : la longueur de persistance du premier est de 26 Å [77] contre 400 Å pour le HA [78] à faible force ionique, ce qui favorise l'adsorption du dextrane à l'interface eau/air. Par ailleurs le HAC₆ contient des groupements chargés et il a été montré que la fixation de groupes ionisés sur du dextrane-C₆ neutre augmentait la tension superficielle à l'équilibre [79].

Quoi qu'il en soit, les HA modifiés en C₆ et C₁₂ présentent des propriétés tensioactives et elles sont d'autant plus marquées que les concentrations sont élevées. *A priori*, on peut imaginer que dans le procédé d'émulsion/évaporation de solvant qui sera utilisé pour l'élaboration des nanoparticules (cf. chapitre III), il faudra éviter d'utiliser de fortes concentrations de HA amphiphile qui conduisent à des temps d'équilibre assez longs, même si le procédé d'émulsification peut accélérer la diffusion chaînes polymères.

On sait que l'adsorption des chaînes macromoléculaires amphiphiles à une interface se déroule en 3 étapes selon la théorie de Gibbs (Figure II. 16).

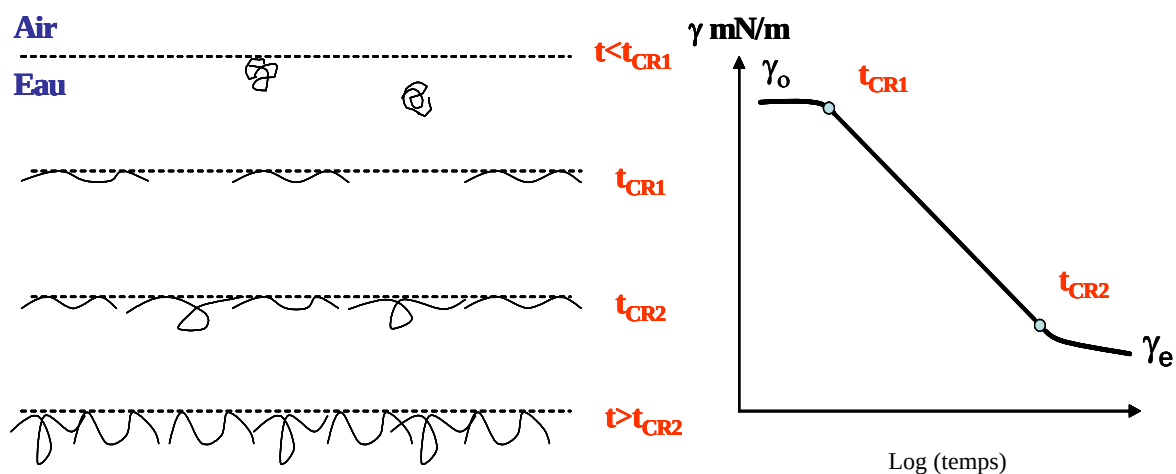


Figure II. 16 : Conformations probables des macromolécules amphiphiles au cours du temps lors de l'adsorption à une interface eau/air (ou eau/huile), reliées aux temps caractéristiques de l'abaissement de la tension superficielle γ en fonction du temps.

Le temps t_{CR1} correspond au temps nécessaire pour que les chaînes macromoléculaires atteignent l'interface. La tension superficielle baisse ensuite jusqu'à t_{CR2} de façon quasi proportionnelle au nombre de macromolécules adsorbées. Après t_{CR2} , la tension superficielle diminue mais de façon négligeable car la saturation de l'interface est atteinte. Seuls quelques mouvements de type réarrangement à l'interface contribuent à la légère baisse de la tension superficielle.

Dans le cas des HA modifiés utilisés comme tensioactifs, on peut donc prévoir qu'à l'équilibre, les chaînes de HA modifié seront plus ou moins aplaties à l'interface selon la concentration du polymère, les parties hydrophiles étant plus ou moins déployées dans la phase aqueuse et les parties hydrophobes adsorbées à l'interface, voire ancrées dans la phase organique.

IV. CONCLUSION DU CHAPITRE

Dans ce chapitre, nous avons décrit la synthèse et la caractérisation de 3 dérivés amphiphiles de HA destinés à stabiliser l'émulsion secondaire du procédé d'émulsion/évaporation de solvant et à produire des nanoparticules à cœur de PLA et couronne de HA.

Les conditions des synthèses ont été prévues de façon à obtenir des HA modifiés hydrosolubles et au caractère hydrophobe peu marqué pour éviter de trop fortes propriétés associatives en milieu aqueux. En effet pour faciliter l'émulsification, il nous a semblé utile d'avoir des solutions de HA amphiphiles peu visqueuses et des polymères susceptibles de diffuser rapidement vers les interfaces liquide/liquide.

C'est pourquoi nous avons fixé sur le HA, des chaînes alkyles peu hydrophobes (à 6 ou 12 atomes de carbone) ou des groupements $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ de faibles taux de substitution. Les taux obtenus ont été les suivants :

- HAC₆-14%
- HAC₁₂-5,5%
- HAPhe-10%

Nous avons ensuite caractérisé les propriétés physico-chimiques de ces 3 dérivés. Cependant le HAPhe-10% s'étant révélé très peu soluble dans l'eau (présence de nanoagrégats de l'ordre de 50 nm à 1 g/L), nous l'avons abandonné dans la suite au profit des HA alkylés.

Nous avons montré que ces HAC_n avaient une viscosité intrinsèque plus faible que celle du HA non modifié, preuve que des interactions hydrophobes intramoléculaires s'établissent en milieu aqueux. Le coefficient de Huggins est supérieur à 1 dans les 2 cas, ce qui traduit la médiocrité du caractère solvant d'une solution de NaCl 0,15 M pour ces 2 composés.

Enfin contrairement au HA natif sans réel potentiel tensioactif en solution aqueuse, le greffage des chaînes alkyle C6 ou C12 sur le HA natif a permis dans les deux cas d'abaisser la tension interfaciale air/eau. Ces diminutions de tension interfaciale air/eau ont été obtenues en utilisant ces HA modifiés solubilisés dans la phase aqueuse. Les deux HAC_n présentent des propriétés tensio-actives plus ou moins marquées et des temps d'équilibre plus ou moins longs, selon les conditions de composition du polymère et de concentration.

Par la suite nous avons répété les réactions de synthèse pour préparer des nanoparticules en quantité suffisante pour mettre en route les expériences d'évaluation biologique.

Ces nanoparticules ont été élaborées principalement à partir des deux HAC_n et nous avons fait varier les paramètres de préparation afin de pouvoir établir des relations entre ces paramètres et les caractéristiques des nanosphères obtenues.

Bibliographie

1. Harada H. and Takahashi M., *CD44-dependent intracellular and extracellular catabolism of hyaluronic acid by hyaluronidase-1 and -2*, J Biol Chem, 2006.
2. Pelletier S., Hubert P., Payan E., Marchal P., Choplin L. and Dellacherie E., *Amphiphilic derivatives of sodium alginate and hyaluronate for cartilage repair: rheological properties*, J Biomed Mater Res, 2001, **54**: p. 102-8.
3. Pelletier S., *Synthèse et caractérisation physico-chimique de dérivés associatifs d'alginate et de hyaluronate de sodium en vue d'applications biomédicales*, Thèse de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy, 1999.
4. Gerard C., Catuogno C., Amargier-Huin C., Grossin L., Hubert P., Gillet P., Netter P., Dellacherie E. and Payan E., *The effect of alginate, hyaluronate and hyaluronate derivatives biomaterials on synthesis of non-articular chondrocyte extracellular matrix*, J Mater Sci Mater Med, 2005, **16**: p. 541-51.
5. Hasegawa S., Tamura J., Neo M., Goto K., Shikinami Y., Saito M., Kita M. and Nakamura T., *In vivo evaluation of a porous hydroxyapatite/poly-DL-lactide composite for use as a bone substitute*, J Biomed Mater Res A, 2005, **75**: p. 567-79.
6. Shive M.S. and Anderson J.M., *Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres*, Adv Drug Deliv Rev, 1997, **28**: p. 5-24.
7. Liu Y., Zheng Shu X. and Prestwich G.D., *Biocompatibility and stability of disulfide-crosslinked hyaluronan films*, Biomaterials, 2005, **26**: p. 4737-46.
8. Lee S.J., Kim S.Y. and Lee Y.M., *Preparation of porous collagen/hyaluronic acid hybrid scaffolds for biomimetic functionalization through biochemical binding affinity*, J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2007, **82**: p. 506-518.
9. Levasseur N., *Hyaluronane : hydrolyse enzymatique, méthode d'obtention des ses fragments applicables à l'industrie, modification chimique de ses fragments et étude de leurs propriétés biologiques*, Thèse d'Université, Rouen, 2006
10. Meyer K. and Palmer J.W., *The polysaccharide of the vitreous humor*, J.Biol.Chem., 1934, **107**: p. 629-634.
11. Goa K.L. and Benfield P., *Hyaluronic acid. A review of its pharmacology and use as a surgical aid in ophthalmology, and its therapeutic potential in joint disease and wound healing*, Drugs, 1994, **47**: p. 536-566.
12. Laurent T.C., Laurent U.B. and Fraser J.R., *The structure and function of hyaluronan: An overview*, Immunol Cell Biol, 1996, **74**: p. A1-7.
13. Laurent T.C. and Fraser J.R., *Hyaluronan*, Faseb J, 1992, **6**: p. 2397-2404.
14. Balazs E.A. and Jeanloz R.W., *The amino sugars : The Chemistry and Biology of Compounds Containing Amino Sugars*, ed. A. press. Vol. II-A. 1965, New-York.
15. Laurent T.C. and Balazs E.A., *Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix, Structure of hyaluronic acid*, ed. A. Press. 1970, Londres.
16. Roure I., Rinaudo M. and Milas M., *Viscometric behaviour of polyelectrolytes in the presence of low salt concentration*. Ber.Bunsenges.Phys.Chem., 1996. **100**: p. 703-725.
17. Weissmann B. and Meyer K., *Structure of hyaluronic acid. The glucuronic linkage*. J.Am.Chem.Soc., 1952. **74**: p. 4729-4739.
18. Jeanloz R.W. and Flowers H., *The Isolation and Synthesis of the Methyl Ester-Methyl α -Glycoside of 3-O- β -D-Glucuronosyl-N-Acetyl-D -Glucosamine (Hyalobiuronic Acid)*. J.Am.Chem.Soc., 1962. **84**: p. 3030-3040.

19. Winter W.T., Smith P.J.C. and Arrott S., *Hyaluronic acid: structure of a fully extended 3-fold helical sodium salt and comparison with the less extended 4-fold helical forms*. J.Mol.Biol., 1975. **99**: p. 219-235.
20. Scott J.E., *Secondary Structures in Hyaluronan Solutions : Chemical and Biological Implications in the Biology of Hyaluronan*, C.F.S. 143, Editor, 1989: Chichester, England.
21. Heatley F. and Scott J.E., *A water molecule participates in the secondary structure of hyaluronan*, Biochem.J., 1988, **254**: p. 489-493.
22. Cowman M.K., Cozart D., Nakanishi K. and Balazs E.A., *¹H NMR of glycosaminoglycans and hyaluronic acid oligosaccharides in aqueous solution: the amide proton environment*. Arch.Biochem.biophys., 1984. **230**: p. 203-212.
23. Atkins E.D.T., Meaer D. and Scott J.E., *Model for hyaluronic acid incorporating four intramolecular hydrogen bonds*. Int.J.Biol.Macromol., 1980. **2**: p. 318-319.
24. Kvam B.J., Atzori M., Toffanin R., Paoletti S. and Biviano F., *¹H- and ¹³C-NMR studies of solutions of hyaluronic acid esters and salts in methyl sulfoxide: comparison of hydrogen-bond patterns and conformational behaviour*. Carbohyd.Res., 1992. **230**: p. 1-13.
25. Almond A., Brass A. and Sheehan J., *Oligosaccharides as Model Systems for Understanding Water-Biopolymer Interaction: Hydrated Dynamics of a Hyaluronan Decamer*. J.Phys.Chem.B, 2000. **104**: p. 5634-5640.
26. Darke A., Finer E.G., Moorhouse R. and Rees D.A., *Studies of hyaluronate solutions by nuclear magnetic relaxation measurements. Detection of covalently-defined, stiff segments within the flexible chains*. J. Mol. Biol., 1975. **99**: p. 477-486.
27. Rinaudo M., Milas M., Jouon N. and Borsali R., *On some original properties of dilute polyelectrolyte solutions at low salt content: sodium hyaluronate example*. Polymer, 1993. **34**: p. 3710-3715.
28. Ghosh S., Xiao L., Christopher E. Reed, and Wayne F. Reed, *Apparent persistence lengths and diffusion behavior of high molecular weight hyaluronate*. Biopolymers, 1990. **30**: p. 1101-1112.
29. Khorramian B.A. and Stivala S.S., *Assessment of branching in hydrolysates of S. salivarius levan and L. mesenteroides dextran from small-angle X-ray scattering*. Carbohyd. Res., 1982. **108**: p. 1-11.
30. Manicourt D.H. and Pita J.C., *Progressive depletion of hyaluronic acid in early experimental osteoarthritis in dogs*, Arthritis Rheum, 1988, **31**: p. 538-544.
31. Ghosh P. and Guidolin D., *Potential mechanism of action of intra-articular hyaluronan therapy in osteoarthritis: are the effects molecular weight dependent?*, Semin Arthritis Rheum, 2002, **32**: p. 10-37.
32. Forrester J.V. and Wilkinson P.C., *Inhibition of leukocyte locomotion by hyaluronic acid*, J Cell Sci, 1981, **48**: p. 315-31.
33. Presti D. and Scott J.E., *Hyaluronan-mediated protective effect against cell damage caused by enzymatically produced hydroxyl (OH.) radicals is dependent on hyaluronan molecular mass*, Cell Biochem Funct, 1994, **12**: p. 281-8.
34. Prehm P., *Biosynthesis of hyaluronate*, Agents Actions, 1988, **23**: p. 36-7.
35. Frean S.P. and Lees P., *Effects of polysulfated glycosaminoglycan and hyaluronan on prostaglandin E2 production by cultured equine synoviocytes*, Am J Vet Res, 2000, **61**: p. 499-505.
36. Nonaka T., Kikuchi H., Ikeda T., Okamoto Y., Hamanishi C. and Tanaka S., *Hyaluronic acid inhibits the expression of u-PA, PAI-1, and u-PAR in human synovial fibroblasts of osteoarthritis and rheumatoid arthritis*, J Rheumatol, 2000, **27**: p. 997-1004.

37. Takeshita S. M.S., Kikuchi T., Yamada H., Namiki O. and Kumaigai K., *The in vitro effect of hyaluronic acid on IL-1 β production in cultured rheumatoid synovial cells*, Biomed Res., 1997, **18**: p. 187-194.
38. Turley E.A., *Hyaluronic acid stimulates protein kinase activity in intact cells and in an isolated protein complex*, J Biol Chem, 1989, **264**: p. 8951-5.
39. Underhill C., *CD44: the hyaluronan receptor*, J Cell Sci, 1992, **103 (Pt 2)**: p. 293-8.
40. Entwistle J., Hall C.L. and Turley E.A., *HA receptors: regulators of signalling to the cytoskeleton*, J Cell Biochem, 1996, **61**: p. 569-77.
41. Akatsuka M., Yamamoto Y., Tobetto K., Yasui T. and Ando T., *In vitro effects of hyaluronan on prostaglandin E2 induction by interleukin-1 in rabbit articular chondrocytes*, Agents Actions, 1993, **38**: p. 122-5.
42. Hiramitsu T., Yasuda T., Ito H., Shimizu M., Julovi S.M., Kakinuma T., Akiyoshi M., Yoshida M. and Nakamura T., *Intercellular adhesion molecule-1 mediates the inhibitory effects of hyaluronan on interleukin-1 β -induced matrix metalloproteinase production in rheumatoid synovial fibroblasts via down-regulation of NF- κ B and p38*, Rheumatology (Oxford), 2006, **45**: p. 824-32.
43. Kawasaki K., Ochi M., Uchio Y., Adachi N. and Matsusaki M., *Hyaluronic acid enhances proliferation and chondroitin sulfate synthesis in cultured chondrocytes embedded in collagen gels*, J Cell Physiol, 1999, **179**: p. 142-8.
44. Bourrguignon L.Y., Iida N., Welsh C.F., Zhu D., Krongrad A. and Pasquale D., *Involvement of CD44 and its variant isoforms in membrane-cytoskeleton interaction, cell adhesion and tumor metastasis*, J Neurooncol, 1995, **26**: p. 201-8.
45. Iwata H., *Pharmacologic and clinical aspects of intraarticular injection of hyaluronate*, Clin Orthop Relat Res, 1993: p. 285-291.
46. Smith M.M. and Ghosh P., *The synthesis of hyaluronic acid by human synovial fibroblasts is influenced by the nature of the hyaluronate in the extracellular environment*, Rheumatol Int, 1987, **7**: p. 113-122.
47. Shimizu C., Yoshioka M., Coutts R.D., Harwood F.L., Kubo T., Hirasawa Y. and Amiel D., *Long-term effects of hyaluronan on experimental osteoarthritis in the rabbit knee*, Osteoarthritis Cartilage, 1998, **6**: p. 1-9.
48. Hautmann S.H., Schroeder G.L., Civantos F., Duncan R.C., Gnann R., Friedrich M.G., Hellstern A., Huland H., Soloway M.S. and Lokeshwar V.B., *[Hyaluronic acid and hyaluronidase. 2 new bladder carcinoma markers]*, Urologe A, 2001, **40**: p. 121-6.
49. Lokeshwar V.B., Rubinowicz D., Schroeder G.L., Forgacs E., Minna J.D., Block N.L., Nadjji M. and Lokeshwar B.L., *Stromal and epithelial expression of tumor markers hyaluronic acid and HYAL1 hyaluronidase in prostate cancer*, J Biol Chem, 2001, **276**: p. 11922-32.
50. Yui N. M.K., Ooya, T., Sato I., *Pharmaceutical preparation for the treatment of gynecological diseases*, 2006, 7,041,310: U.S. Patent.
51. Kuo J.W., Swann D.A. and Prestwich G.D., *Chemical modification of hyaluronic acid by carbodiimides*, Bioconjug Chem, 1991, **2**: p. 232-41.
52. Bulpitt P. and Aeschlimann D., *New strategy for chemical modification of hyaluronic acid: preparation of functionalized derivatives and their use in the formation of novel biocompatible hydrogels*, J Biomed Mater Res, 1999, **47**: p. 152-69.
53. Della Valle F. and Romeo A., *Polysaccharide esters and their salts*, 1990, patent 4,965,353: USA.
54. Pelletier S., Hubert P., Lapique F., Payan E. and Dellacherie E., *Amphiphilic derivatives of sodium alginate and hyaluronate : synthesis and physico-chemical properties of aqueous dilute solutions*, Carbohydr Polym, 2000, **43**: p. 343-349.

55. Houzelle M.-C., *Dérivés amphiphiles associatifs de la pectine : diverses voies de synthèse. Etude comparative des propriétés physicochimiques des solutions aqueuses en régimes dilué et semi-dilué.* Thèse Institut National Polytechnique de Lorraine. Nancy, 1998.
56. Miralles G. Baudoin R., Dumas D., Baptiste D., Hubert P., Stoltz J. F., Dellacherie E., Mainard D., Netter P. and Payan E., *Sodium alginate sponges with or without sodium hyaluronate: in vitro engineering of cartilage*, J Biomed Mater Res, 2001, **57**: p. 268-278.
57. Della Valle F., Crescenzi V., Callegaro L., *Gellan esters*, 1992, Patent 92400352.8: Europe.
58. Della Valle F., Roméo A., *Esters of hyaluronic acid*, 1989, Patent 89108630.8: Europe.
59. Rastello de Boissesson M., Léonard M., Hubert P., Marchal P., Stequert A., Castel C., Favre E. and Dellacherie E., *Physical alginate hydrogels based on hydrophobic or dual hydrophobic/ionic interactions: bead formation, structure, and stability*, J Colloid Interf Sci, 2004, **273**: p. 131-139.
60. Miralles-Houzelle M.C., Hubert P. and Dellacherie E., *Hydrophobic alkyl chains-pectin conjugates. Comparative study of some physicochemical properties in relation to covalent coupling vs ionic association*, Langmuir, 2001, **17**: p. 1384-1391.
61. Rastello de Boissesson M., *Microparticules d'alginate associatifs : élaboration, caractérisation et encapsulation de molécules actives*, Thèse Institut National Polytechnique de Lorraine. 2002
62. Ci S.X., Huynh T.H., Louie L.W., Yang A., Beals B.J., Ron N., Tsang W.-G., Soon-Shiong P. and Desai N.P., *Molecular mass distribution of sodium alginate by high-performance size-exclusion chromatography*. J.Chromatogr.A, 1999. **864**: p. 199-210.
63. Stefansson M., *Assessment of alginic acid molecular weight and chemical composition through capillary electrophoresis*, Anal.Chem., 1999, **71**: p. 2373-2378.
64. Huin-Amargier C., *Contribution à la mise au point d'un biomatériau de comblement à base de hyaluronate pour la réparation du cartilage*, Thèse Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy, 2005.
65. Petit F., *Etude du comportement de polyelectrolytes associatifs en solution et caractérisation de leurs agregats hydrophobes.* Thèse de l'Ecole supérieure de Physique et Chimie Industrielles de Paris (ESPCI), Paris VI, 1996.
66. Magny B., *Polyelectrolytes associatifs: méthodes de synthèse, comportement en milieu dilué et semi-dilué.* Thèse de l'Ecole supérieure de Physique et Chimie Industrielles de Paris (ESPCI), Paris VI, 1992.
67. Desbrières J., Rinaudo M. and Chtcheglova L., *Reversible thermothickening of aqueous solutions of polycations from natural origin*, Macromol.Symp., 1997, **113**: p. 135-143.
68. Sierakowski Milas R., Milas M., Desbrières J. and Rinaudo M., *Specific modifications of galactomannans*, Carbohydr Polym 2000, **42**: p. 51-57.
69. Varum K.M., Anthonsen M.W., Grasdalen H. and Smidsrod O., *Determination of the degree of N-acetylation and the distribution of N-acetyl groups in partially N-deacetylated chitins (chitosans) by high-field n.m.r. spectroscopy*, Carbohydr Res, 1991, **211**: p. 17-23.
70. Lin S.-Y., Wang W.-J., Lin L.-W. and Chen L.-J., *Systematic effects of bubbles volume on the surface tension measured by pendant bubble profiles*, Colloid Surface A, 1996, **114**: p. 31-39.

71. Chognot D., Six J.L., Leonard M., Bonneaux F., Vigneron C. and Dellacherie E., *Physicochemical evaluation of PLA nanoparticles stabilized by water-soluble MPEO-PLA block copolymers*, J Colloid Interface Sci, 2003, **268**: p. 441-447.
72. Huin-Amargier C., Marchal P., Payan E., Netter P. and Dellacherie E., *New physically and chemically crosslinked hyaluronate (HA)-based hydrogels for cartilage repair*, J Biomed Mater Res A, 2006, **76**: p. 416-424.
73. Tokita Y., Oshima K. and Okamoto A., *Degradation of hyaluronic acid during freeze drying*, Polym.Degrad.Stabil., 1997, **55**: p. 159-164.
74. Magdassi S. and Vinetsky Y., *Microencapsulation of O/W emulsions by formation of a protein-surfactant insoluble complex*, J Microencapsul, 1995, **12**: p. 537-545.
75. Paterson I.F., Chowdhry B.Z. and Leharne S.A., *An investigation of adsorption at the air-water and soil-water interfaces for non-micellizing ethylene oxide-propylene oxide surfactants*, Chemosphere, 2000, **40**: p. 1399-1405.
76. Rouzes C., Léonard M., Durand A. and Dellacherie E., *Influence of polymeric surfactants on the properties of drug-loaded PLA nanospheres*, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2003, **32**: p. 125-135.
77. Khorramian B.A. and Stivala S.S., *Assessment of branching in hydrolysates of S. salivarius levan and L. mesenteroides dextran from small-angle X-ray scattering*, Carbohydr Res, 1982, **108**: p. 1-11.
78. Ghosh S., Xiao L., Christopher E. Reed and Wayne F. Reed, *Apparent persistence lengths and diffusion behavior of high molecular weight hyaluronate*, Biopolymers, 1990, **30**: p. 1101 - 1112.
79. Rotureau E., *Dextranes amphiphiles : adsorption aux interfaces liquide/liquide et application à la stabilisation d'émulsions*, Thèse Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy, 2005.

CHAPITRE III :
SYNTHESE ET
CARACTERISATION DES
NANOPARTICULES A CŒUR
DE POLY(D-L, LACTIDE)

CHAPITRE III : SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION DES NANOPARTICULES À CŒUR DE POLY(D-L, LACTIDE)

I. OBJECTIFS

On rappelle que l'objectif de ce travail était de préparer des nanoparticules à cœur dégradable de poly(D-L,lactide) (PLA) et couronne de hyaluronate (HA) dans le but d'y encapsuler des molécules antiarthrosiques hydrosolubles à action lente (HA et chondroïtine sulfate, CS) en vue de favoriser une libération ciblée vers les chondrocytes, les cellules du cartilage. Nous avons également encapsulé l'héparine (Hép) dont le rôle d'anticoagulant dans le traitement des lésions ostéochondrales pourrait être bénéfique. Le procédé retenu pour cette élaboration a été celui utilisant l'émulsion/évaporation de solvant et plus précisément, les principes actifs (PA) étant hydrosolubles, la technique de double émulsion/évaporation de solvant [1-3].

Le principe du procédé est schématisé sur la Figure III. 1. On voit que la molécule bioactive hydrosoluble est dissoute dans la phase aqueuse de la l'émulsion primaire alors que la phase organique contient le PLA. Cette émulsion primaire est alors dispersée dans une solution aqueuse contenant le HA amphiphile qui sert à stabiliser l'émulsion secondaire. Ensuite le solvant organique est évaporé et on récupère une suspension de nanosphères solidifiées.

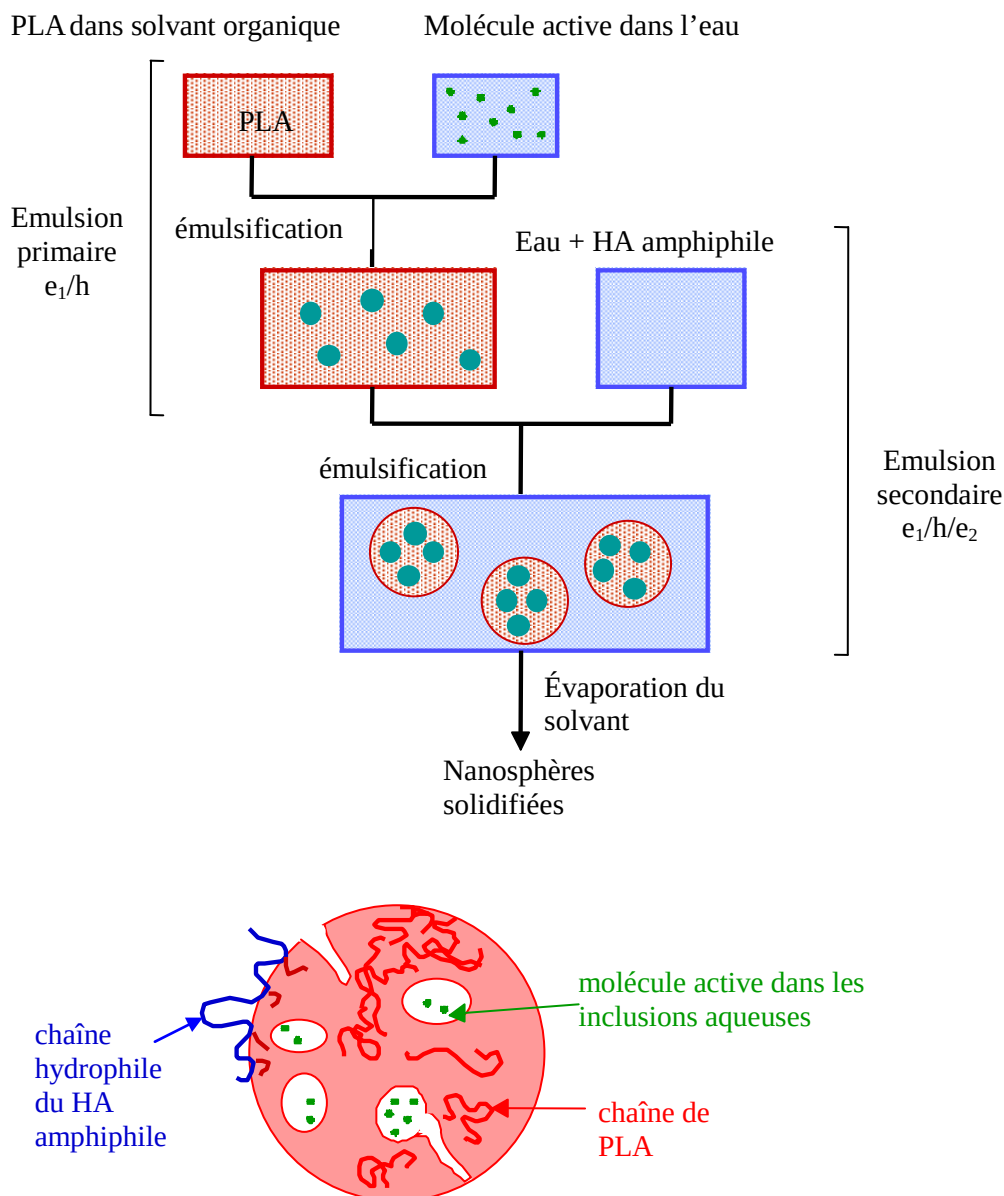


Figure III. 1 : Schéma du procédé de double émulsion/évaporation de solvant pour l'encapsulation de molécules hydrosolubles. Structure attendue des nanosphères ainsi préparées.

Dans un premier temps, nous avons cherché à optimiser le procédé pour obtenir des nanoparticules dont la taille soit de l'ordre de quelques centaines de nm.

Ainsi, l'influence des paramètres de l'émulsification (temps et puissance d'agitation au vortex, type d'énergie fournie (ultrasons ou entrechoquements), temps de sonication, solvant organique à utiliser, concentration en HA amphiphile, etc...) sur la taille de nanoparticules vides (sans PA), a été étudiée.

Par la suite, nous avons appliqué les protocoles optimisés à la préparation de nanosphères chargées en PA et les avons caractérisées en termes de taille, quantités de HA en surface et de PA encapsulé.

II. MATERIELS ET METHODES

II.1. METHODES DE PREPARATION DES NANOPARTICULES

II.1.1. Choix de la technique d'émulsification

II.1.1.1. Théorie de la formation de l'interface

Pour former une émulsion, deux phases non miscibles et un stabilisant ne suffisent pas. Un travail (c'est-à-dire de l'énergie) doit être fourni au système et de manière suffisante pour former l'émulsion qui n'est pas un phénomène spontané. L'interface entre les deux phases non miscibles se déforme pour former des gouttelettes. Les gouttes qui viennent d'être produites vont à leur tour se déformer et se décomposer en plus petites gouttelettes. Dans tous les cas, cette déformation est indispensable pour que les gouttes se divisent mais elle s'oppose à la pression de Laplace (Δp) donnée par l'équation :

$$\Delta p = \frac{2\sigma}{r}$$

Avec σ : Tension interfaciale entre les deux phases.

r : Rayon de la gouttelette.

La présence de tensioactif est essentielle à la stabilisation de l'émulsion car elle va permettre de diminuer la tension interfaciale [4] et par conséquent de baisser la pression de Laplace, ce qui va alors faciliter la déformation des gouttelettes et par la suite leur division.

La diminution de la tension de surface par une molécule tensioactive dépend de nombreux paramètres à fixer :

- des paramètres intrinsèques (nature des tensioactifs, nature des solvants non miscibles en présence, viscosité des solutions...)
- des paramètres extrinsèques (température, pH, concentration...)

D'une manière générale, dans les émulsions classiques huile/eau, un certain nombre de phénomènes (coalescence, mûrissement d'Ostwald,...) peuvent conduire à un vieillissement plus ou moins rapide de l'émulsion avec le temps.

Dans le procédé d'émulsion/évaporation de solvant que nous avons utilisé, ces phénomènes de déstabilisation d'émulsion sont beaucoup plus rares d'une part à cause de la présence de PLA dans la phase organique dont la viscosité est ainsi augmentée, et d'autre part parce que les étapes d'émulsification et d'évaporation du solvant sont généralement rapides comparées au phénomène de vieillissement.

II.1.1.2. Les techniques d'émulsification

Au LCPM, nous disposons de deux sources énergétiques possibles pour l'émulsification :

- par ultrasons par le biais d'une sonde à ultrasons. Elle est très utilisée pour la synthèse de nanostructures nécessitant l'apport d'énergie externe (formation de très petits cristaux unidimensionnels [5, 6] ou synthèse de nanoparticules encapsulant des principes actifs [7]).
- par entrechoquements par l'utilisation d'un microfluidiseur, entre la solution aqueuse et la solution organique dans une chambre d'interaction. La pression à l'intérieur de cette chambre d'interaction module l'énergie apportée aux solutions lors des entrechoquements sur la paroi intérieure de celle-ci. Ce système permet donc de faire varier *in fine* la taille des émulsions obtenues.

** La sonication*

La sonde à ultrasons que nous avons utilisée (Vibracell model 600W, Sonics & Materials, Danbury, USA) permet un large éventail de possibilités. Elle permet de délivrer les ultra-sons selon 2 modes :

- ✓ en continu à une puissance donnée pendant un temps déterminé (100% de cycle actif).
- ✓ en discontinu avec x% de cycles actifs, c'est-à-dire sous forme d'impulsions à une puissance donnée sur une durée variable. Par exemple, 50% de cycle actif correspond à une impulsion de 1 s suivie d'une pause de 1 s.

La puissance des ultrasons est aussi modulable. Elle est réglée de 0 à 10 avec une correspondance telle que la puissance P = 5 équivaut à 255 Watts.

P = 10 équivaut à 600 Watts.

Pour des temps relativement longs (de l'ordre de 2 min) de sonication, on constate une augmentation de la température des solutions. Ainsi et de façon systématique, toutes les opérations de sonication ont été faites en plaçant les solutions dans un bain de glace.

** Le microfluidiseur*

La technique de microfluidisation est basée sur l'existence d'entrechoquements du système eau /solvant organique sur les parois d'un piston. La force de projection de la solution dans le piston est assurée par une pression réglable par manomètre. On peut faire varier la pression et/ou le nombre de cycles. La pression utilisée est fixée à 2 bars. Un cycle représente le parcours de la solution depuis la chambre réservoir en passant par le piston et le retour à la chambre initiale. Quand le nombre de cycles désiré est atteint, un circuit de sortie peut être enclenché et on récupère l'émulsion.

L'appareil que nous avons utilisé est un Microfluidics, model 110S (Microfluidics Corporation, Newton, MA, USA).

II.1.2. Choix de la technique d'évaporation du solvant

L'évaporation du solvant organique est une étape importante lors de la synthèse des nanoparticules et influence la taille finale. Elle doit permettre de passer des émulsions aux nanoparticules solides. Le solvant organique doit être évaporé assez rapidement afin de prévenir tout phénomène de coalescence. Cependant, nous avons constaté qu'une évaporation rapide (moins de 10 min) provoque un assèchement et une agrégation partielle ce qui rend plus difficile la redispersion des nanoparticules dans l'eau.

Dans ce travail, deux types d'évaporation ont été testés :

- l'évaporateur rotatif (sous vide d'air par trompe à eau) pendant 20 min
- le simple barreau magnétique à l'air libre pendant 4 h.

Le barreau magnétique est une technique plus douce que le l'évaporateur rotatif. Bien que le temps nécessaire pour évaporer tout le solvant organique soit plus long (plusieurs h) par évaporation au barreau magnétique, on constate que la taille finale des nanoparticules est toujours inférieure à celle obtenue avec l'évaporateur rotatif (de l'ordre de 20%).

Concernant les autres conditions d'élaboration des nanoparticules par double émulsion/ évaporation de solvant (particules « nues » ou recouvertes de HA ou de poly(alcool vinylique) et contenant ou non une molécule encapsulée), elles sont décrites de manière détaillée dans le paragraphe III.1.2.2.

II.2. MESURE DES TAILLES DE NANOPARTICULES : SPECTROSCOPIE A CORRELATION DE PHOTONS

II.2.1. Principe :

La spectroscopie à corrélation de photons (PCS) permet de mesurer la taille et plus précisément le diamètre hydrodynamique (d_H) des particules submicroniques. Cette technique, est basée sur l'existence du mouvement brownien des particules [8, 9]. La fréquence et l'amplitude de ce mouvement brownien dépendent de la taille de la particule et de la viscosité du milieu dispersant. La vitesse de déplacement des particules est définie par le coefficient de diffusion de translation (D_t) qui, d'après la loi de Stokes-Einstein, est inversement proportionnel au diamètre hydrodynamique de la particule :

$$d_H = \frac{K_B T}{3\eta \pi D_t}$$

Avec : k_B : Constante de Boltzmann,

T : Température,

η : Viscosité du milieu.

II.2.2. Conditions opératoires :

L'appareil utilisé est un Malvern 4600 (Malvern Instruments). Le montage optique est constitué d'une source laser (Argon, 488 nm), d'une cellule de mesure thermostatée et d'un photomultiplicateur qui permet de mesurer les très faibles intensités diffusées par les nanoparticules. Le laser est équipé d'un filtre et d'une optique de focalisation du faisceau au milieu de la cellule. Le photomultiplicateur est placé sur un goniomètre afin d'obtenir un angle d'incidence variable de 8 à 150°. Une solution de NaCl 10^{-3} M constitue le milieu dispersant. La concentration massique en particules dans le milieu dispersant est de l'ordre de 0.005% (w/w). L'échantillon est placé dans le bain thermostaté à 30°C et l'angle d'observation fixé à 90°. Les mesures sont effectuées après stabilisation de l'échantillon pendant 15 min. Le diamètre hydrodynamique des particules est déterminé d'après une moyenne de 3 séries de mesures consécutives (une moyenne étant elle-même une moyenne de 10 sous acquisitions).

II.2.3. Traitement du signal :

Le signal mesuré par le photomultiplicateur correspond aux fluctuations d'intensité de la lumière diffusée dues au mouvement brownien des particules. Ce signal est traité par un corrélateur numérique afin d'obtenir la fonction d'auto-corrélation du système $G(\tau)$ du signal. Cette fonction $G(\tau)$ représente la probabilité de retrouver une particule à un instant $(t+dt)$ au même endroit. Plus une particule est petite, plus son mouvement brownien est rapide, et plus cette probabilité est faible. La fonction d'auto-corrélation $G(\tau)$ est une exponentielle décroissante, traduisant la réduction de corrélation de l'intensité du signal en fonction du temps.

$$G(\tau) = \sum_1^n [I(t) \times I(t + dt)]$$

Avec τ : temps d'échantillonnage.

$I(t)$: Intensité du signal en fonction du temps

La méthode de calcul des cumulants, traitement mathématique utilisé pour une analyse monomodale de la distribution des particules, consiste à étudier la fonction d'auto-corrélation

$G(\tau)$ dans un repère semi-logarithmique. Le principe de cette analyse consiste à effectuer un développement en série de Taylor limité à l'ordre 2, du logarithme de $G(\tau)$ selon l'équation :

$$\ln (G(\tau)-1)=a+b \tau+c \tau^2$$

b est proportionnel au diamètre moyen des particules (correspondant à la taille des particules diffusant avec la plus forte intensité), et $(2c/b^2)$ est la variance de la distribution ou polydispersité en taille.

Cette méthode permet de déterminer le diamètre hydrodynamique moyen (en intensité de lumière diffusée) des particules. L'échantillon est considéré comme monodisperse quand sa polydispersité est inférieure à 0,08. Dans le cas des distributions polymodales, la fonction exponentielle d'auto-corrélation est décomposée en 24 sous-exponentielles, caractéristiques de 24 classes de particules. C'est cette dernière méthode de calcul que nous avons choisi d'utiliser. Pour les distributions polymodales, l'échantillon est considéré comme monodisperse quand sa polydispersité est inférieure à 0,3.

II.3. PROTOCOLES DE DOSAGE DES DIFFERENTS POLYSACCHARIDES, EN SURFACE (HA), ET ENCAPSULES (HA, CS ET HEP)

Le HA et la CS peuvent être quantifiés par différentes méthodes : test spécifique Elisa [10], radiomarquage [11], ESIMS (electrospray ionization mass spectrometry) [12, 13] mais, le plus souvent, cette quantification se fait par HPLC (chromatographie liquide haute performance) [14].

En ce qui nous concerne nous avons utilisé l'électrophorèse capillaire de zone (ECZ) selon le protocole décrit par Payan et al [15]. Cette analyse se fait après hydrolyse enzymatique des polysaccharides et la détection et la quantification des oligosaccharides résultants se fait à $\lambda = 232$ nm. Cette longueur d'onde correspond à l'absorption d'une double liaison entre le C4 et le C5 du résidu guluronique obtenu après l'hydrolyse comme cela est schématisé sur la Figure III. 2. La formation d'une insaturation entre le C4 et le C5 du résidu guluronique est observée pour le HA [16] et la CS [17] mais aussi pour de nombreux autres polysaccharides (alginate, pectine, heparane sulfate...) [18].

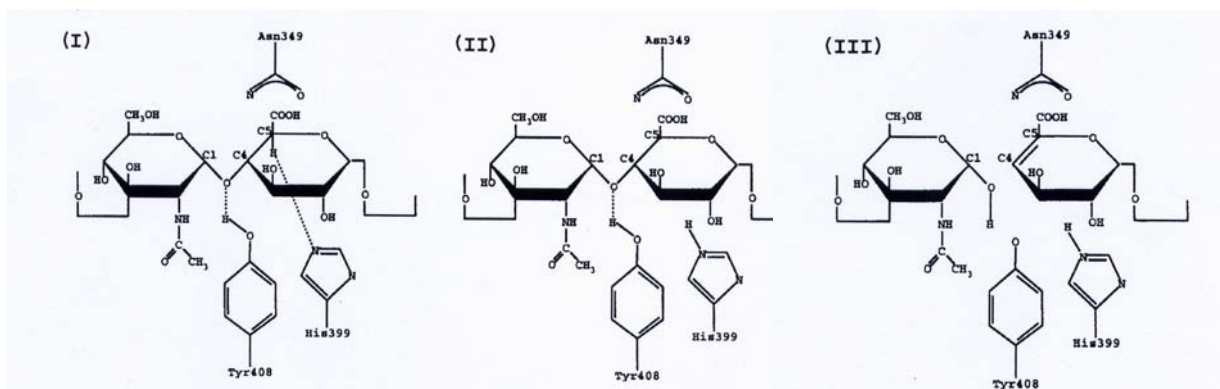


Figure III. 2 : Hydrolyse type d'un polysaccharide (HA) par une lyase (HA lyase). (I) Interaction entre la fonction carboxylique du HA et l'asparagine 349 de l'enzyme, création d'une liaison hydrogène entre la tyrosine 408 et l'oxygène de la liaison glycosidique (O4) ; (II) Déprotonation en β du C5 du HA par l'histidine 399 formant ainsi une double liaison entre le C4 et le C5 ; (III) Déprotonation de la tyrosine 408 par la liaison osidique et clivage de la liaison osidique [16].

La quantification du HA à la surface des nanoparticules a été réalisée après hydrolyse enzymatique du polysaccharide par la hyaluronidase lyase et le dosage des oligosaccharides résultants a été effectué par ECZ.

Les polysaccharides encapsulés ont été quantifiés après hydrolyse chimique de la matrice de PLA par de la soude 2 M. Le HA et la CS ont été respectivement hydrolysés par la hyaluronidase lyase et par la chondroïtine sulfate lyase ABC, et les fragments oligosaccharidiques résultants dosés par ECZ. L'Hép a été quantifiée par dosage colorimétrique au bleu de toluidine.

Dans le cas des particules recouvertes de HA et renfermant ce même polysaccharide, la quantité de HA encapsulée a été calculée par différence entre la quantité totale de HA mesurée après dégradation totale de la matrice et celle déterminée après hydrolyse enzymatique du HA superficiel.

Des lots de particules nues (sans polymère hydrophile en surface) contenant un PA (HA, CS ou Hép) ont été aussi synthétisés et la quantité de PA encapsulé a été déterminée par les mêmes techniques afin de valider les méthodes. Ces lots ont été synthétisés en utilisant dans la phase aqueuse externe du cholate de sodium comme surfactif.

II.3.1. Protocole d'hydrolyse du HA superficiel

300 mg de nanoparticules sont dispersés dans 10 mL de tampon acétate 20mM, pH 6.

200 µL de cette suspension sont mis en contact avec 20 µL de hyaluronidase lyase de Streptomyces hyalurolyticus (Sigma Aldrich, France) ce qui correspond à 1000 unités pour 10 mL de tampon acétate. Le temps de traitement est de 72 h.

Une fois le surnageant récupéré, les oligosaccharides résultants sont dosés par ECZ en prenant soin d'éliminer l'enzyme de masse molaire environ 50 kg/mol. Pour ce faire, le surnageant est filtré sur des tubes à filtre Ultrafree®-MC (Millipore Corporation, Bedford, USA) de 10 000 NMWL (nominal molecular weight limit) qui permet d'éliminer du surnageant, les protéines ayant une masse molaire supérieure à 10 kg/mol. Ceci permet d'avoir un électrophorégramme débarrassé du large pic de l'enzyme.

Le temps de traitement, relativement long, peut entraîner un relargage du principe actif (PA) polysaccharidique éventuellement encapsulé, ce qui pourrait fausser le dosage. C'est pourquoi le dosage a été réalisé sur un lot ne contenant pas de HA en tant que PA en supposant que la quantité de HA en surface était la même qu'il y ait ou non un PA encapsulé.

II.3.2. Protocole de dégradation des nanoparticules

Pour calculer le taux d'encapsulation en principe actif, nous avons démontré que la matrice des nanoparticules devait être complètement dégradée par une solution alcaline (cf par. III.2.3.). Les fonctions ester du PLA sont en effet hydrolysées à pH basique ce qui donne naissance à des oligomères hydrosolubles.

Protocole:

Une suspension de nanoparticules (10 mg/mL) est dispersée dans une solution alcaline de NaOH à pH=10 afin de dégrader complètement la matrice en PLA. Après obtention d'une solution limpide, le pH est ajusté jusqu'à 6 par quelques gouttes d'une solution concentrée d'acide acétique 10 M. L'ensemble est ensuite soumis à l'hydrolyse enzymatique par la hyaluronidase lyase (cas du HA) ou la chondroïtinase sulfate lyase ABC issue de Proteus vulgaris (Sigma Aldrich, France) (cas de la chondroïtine sulfate). Cette hydrolyse est faite à 37°C pendant 72 h. Les conditions précises des traitements sont décrites dans le par. II.3.3.4. Après cette étape, le surnageant est recueilli et l'enzyme est éliminé par filtration sur des tubes à filtre Ultrafree®-MC.

II.3.3. Dosage par électrophorèse capillaire de zone

Les oligosaccharides résultant de l'hydrolyse du HA et de la CS ont été quantifiés par électrophorèse capillaire de zone.

II.3.3.1. Origine et intérêt de la technique

La méthode originale d'électrophorèse, introduite par AWK Tiselius dans les années 30, permettait de séparer les différentes fractions de protéines dans un milieu liquide et la détection se faisait par mesure de l'indice de réfraction. L'idée originale (prix Nobel en 1948) était de mesurer en continu l'indice de réfraction d'un liquide sortant d'une colonne chromatographique. Les modifications de l'indice de réfraction reflètent les changements de la composition du soluté entraîné hors de la colonne par le solvant. Cette méthode se révèle très utile pour la séparation et l'analyse quantitative des solutions de sucres, des hydrolysats, des protéines. Puis la technique s'est diversifiée en passant par l'électrophorèse sur papier, sur gel, en 1 et 2 dimensions, jusqu'à l'électrophorèse capillaire de zone avec J. Jorgenson dans les années 80 [19]. La technique consiste à faire migrer des échantillons dans un capillaire (10 à 100 μm de diamètre interne) et permet la séparation, la détection et la quantification de composés organiques (chiraux ou achiraux) ou inorganiques. La séparation résulte de la migration des électrolytes dans un champ électrique au sein du capillaire suivant le rapport de la charge à la masse molaire des composés (Figure III. 3).

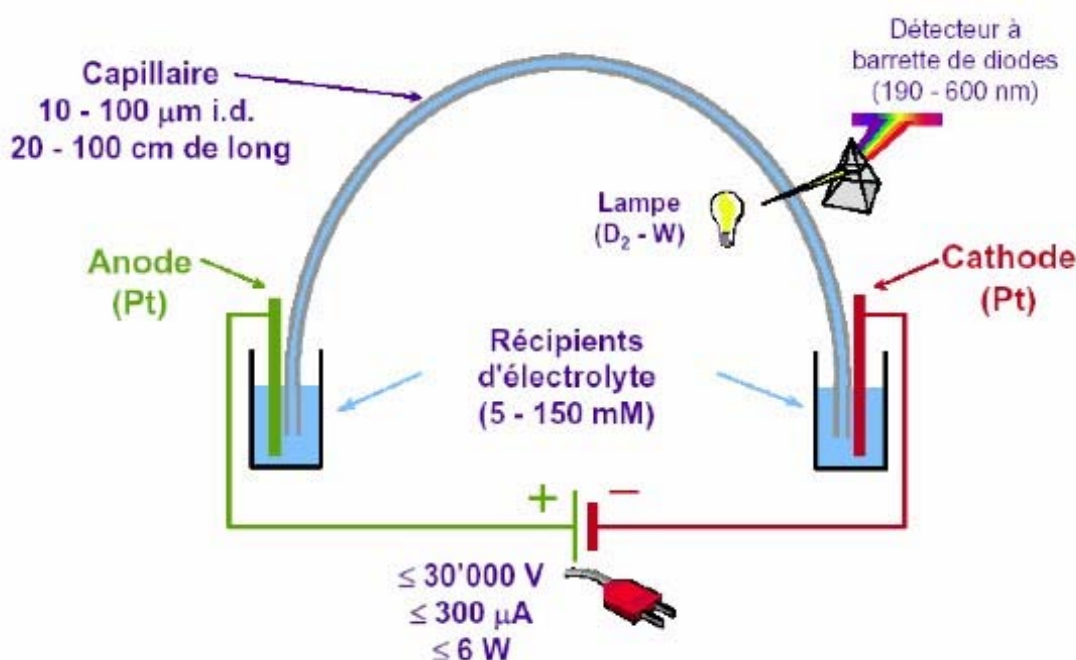


Figure III. 3 : Un appareil d'électrophorèse se compose d'un générateur, de deux électrodes, de deux réservoirs de solution tampon de part et d'autre d'un capillaire en silice et d'un détecteur.

La détection est effectuée par la mesure de l'absorbance des échantillons passant devant un détecteur UV à barrette de diodes. L'absorbance est mesurée par un ordinateur et l'interprétation se fait grâce à l'électrophorégramme (absorbance en fonction du temps).

L'électrophorèse capillaire est une technique rapide, relativement peu coûteuse et extrêmement sensible. C'est en fait une méthode hybride entre l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide et la chromatographie liquide de haute performance qui permet une gamme très large d'applications: analyse de peptides, d'acides aminés, d'oligonucléotides,... La technique peut également être modifiée pour s'adapter à la séparation d'autres composés comme des molécules non ionisées en présence de micelles de détergents appropriés.

II.3.3.2. Electro-osmose ou migration électroosmotique

Le phénomène d'électro-osmose résulte de l'interaction de la solution avec la silice du capillaire. La paroi de silice est tapissée de groupements silanols. Ces groupements se déprotonnent à pH supérieur à 2, ainsi le capillaire porte un grand nombre de charges négatives à pH neutre. Les charges négatives de la paroi du capillaire attirent les ions chargés positivement du tampon, créant une double couche électrique. Cette double couche de charges positives et négatives présente une différence de potentiel appelé potentiel électrocinétique ou potentiel Zêta. Lorsque le capillaire est mis sous tension, les cations de la portion diffuse de la double couche migrent vers la cathode, emmenant l'eau avec eux. Ce flux de tampon contenant les molécules électrolytiques de l'échantillon est appelé flux électroosmotique (EOF) ou mobilité électroosmotique μ_{EOF} .

En électrophorèse capillaire, la vitesse électrophorétique (V) tient toujours compte de la mobilité électrophorétique apparente (μ_{app}) et du champ électrique E. Cependant cette mobilité apparente (μ_{app}) dépend de la mobilité ionique (μ_{ion}) déterminée par la migration électrophorétique (μ_{eff}) mais aussi de la mobilité électroosmotique (μ_{EOF}) (Figure III. 4)

$$V = \mu_{app} E \quad \text{sachant que} \quad \mu_{app} = \mu_{eff} + \mu_{EOF}$$

$$\text{Avec } \mu_{eff} = \mu_{ion} E \quad \text{et} \quad \mu_{EOF} = \zeta \epsilon$$

ζ est le potentiel zêta et ϵ la constante diélectrique du milieu.

En conséquence, la mobilité est affectée par le pH du milieu ainsi que la force de l'ion.

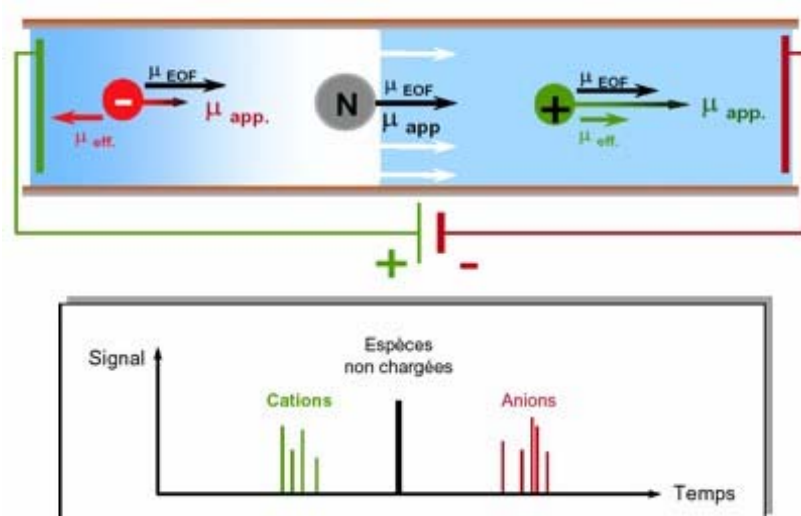


Figure III. 4 : Vitesse et mobilité des espèces en électrophorèse capillaire. La mobilité de la molécule (μ_{app}) tient compte de la mobilité de l'espèce (μ_{eff}) et de la mobilité électroosmotique (μ_{EOF}) : cela se traduit sur un électrophorégramme par l'apparition progressive des cations suivie des espèces neutres puis des anions.

II.3.3.3. Electrophorèse capillaire de zone par association ionique

L'ECZ-AI consiste à ajouter au tampon de travail un contre-ion comme le tétrabutylammonium phosphate. Ce contre-ion a la capacité de modifier la charge des parois du capillaire par association ionique, modifiant de ce fait le déplacement des entités chargées à séparer (Figure III. 5). En effet, les contre-ions provenant de la solution d'électrolyte ont tendance à se plaquer contre la paroi du capillaire et à neutraliser ces charges, formant ainsi une double-couche d'ions et créant une différence de potentiel, appelée potentiel zêta. Sous l'action du champ électrique E , les cations les moins retenus de cette double couche ionique, solvatés, migrent vers la cathode entraînant avec eux toutes les molécules de tampon. Le flux ainsi créé donne aux particules une mobilité μ_{EOF} qui s'ajoute à leur mobilité propre μ_{eff} . De manière générale, μ_{EOF} est largement supérieure à μ_{eff} , ce qui explique la migration de toutes les molécules vers la cathode et ce malgré la charge propre de chaque ion. Ainsi, en tampon alcalin, les fonctions carboxylates du HA ou de la CS sont chargées négativement et sont attirées par l'anode (μ_{eff}) alors que le flux électroosmotique (μ_{EOF}), prédominant, les pousse vers la cathode.

Dans notre étude, cette technique a été appliquée à la séparation et au dosage d'oligosaccharides de structure très proche issus de la dégradation de polysaccharides (HA présent sur le nanovecteur ainsi que la CS et le HA encapsulés). Comme les sous produits de

dégradation enzymatique des polysaccharides ont un rapport m/z (masse/charge propre) identique et afin d'optimiser la migration pour une meilleure séparation et résolution, il a fallu réduire ce flux électroosmotique par ajout d'ions tétraalkylammonium (contenus dans le PIC® Reagent A). Par ailleurs un tampon borate est utilisé pour permettre la mise en place de complexes anioniques avec les oligosaccharides. La formation de complexe (saccharide/borate/tétrabutylammonium) permet ainsi de séparer les produits de l'hydrolyse enzymatique.

Ces complexes ioniques migrent vers la cathode sous l'effet combiné de l'électrophorèse et de l'électroosmose. Les espèces chargées positivement seront détectées en premier, suivies des espèces neutres et enfin des espèces chargées négativement.

Cette technique permet la séparation de nombreuses molécules comme des protéines et des peptides ou encore des sucres.

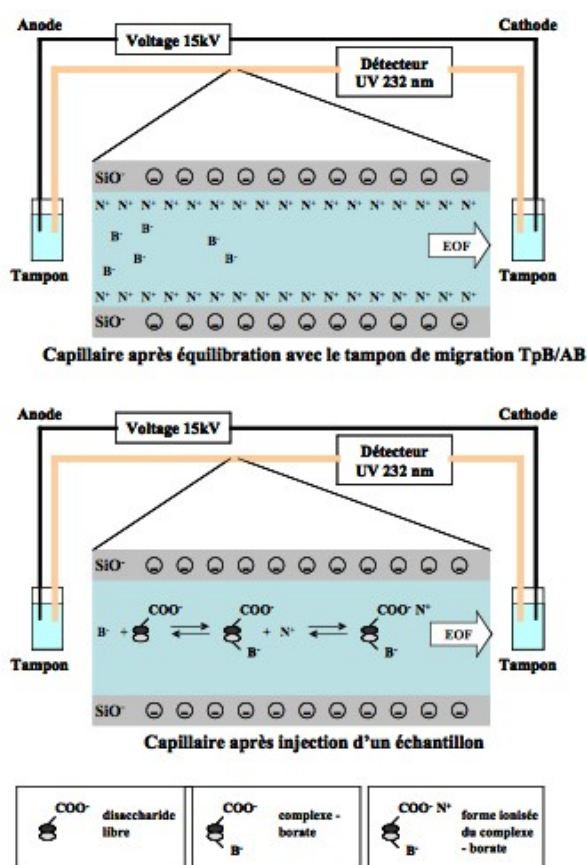


Figure III. 5 : Principe de l'électrophorèse capillaire en présence d'un contre-ion. EOF : flux électroosmotique, B⁻ : ions borate négatifs, N⁺ : ions tétrabutylammonium positifs, SiO⁻ : silice du capillaire chargé négativement.

Dans ce travail de thèse, la mise au point de cette technique d'ECZ-AI pour le dosage des oligosaccharides, a été réalisée sur un appareil d'électrophorèse capillaire Spectraphoresis 1000

(TSP, Les Ulis, France) [15] réadaptée par la suite sur un appareil d'électrophorèse capillaire P/ACETM MDQ Capillary Electrophoresis System, Beckman Coulter, USA).

II.3.3.4. Protocole de dosage du HA et de la CS

Pour déterminer la quantité de HA et de CS présents sur ou dans les nanoparticules, nous avons commencé par tracer des courbes d'étalonnage

Traitement des échantillons :

Pour tracer une courbe d'étalonnage, nous avons effectué une gamme d'expériences à différentes concentrations de HA. On solubilise le HA dans un volume V de tampon acétate de sodium 20 mM pH 6 (Merck, Damstadt, Allemagne). A ce volume on ajoute 30 µL de hyaluronate lyase reconstituée à 100 UI/mL dans ce tampon.

Une gamme en HA allant de 25 µg/mL à 250 µg/mL selon les conditions détaillées dans le

Tableau III. 1, a été préparée et traitée dans les mêmes conditions que celles décrites dans le par. II.3.1).

Pour la CS, une gamme en CS allant de 3 µg/mL à 100 µg/mL est préparée dans des conditions identiques mais en utilisant la chondroïtinase ABC et un tampon Tris-HCl, 50mM pH 8 (Euromedex, Mundolsheim, France) (

Tableau III. 2).

Concentration de HA (µg/mL)	Points de gamme	Tampon acétate (µL)	Volume de la solution de HA (µL)	Hyaluronate lyase (µL)
25	G50	150	50 (HA2)	30
50	G100	100	100 (HA2)	30
100	G200	180	20 (HA1)	30
200	G400	160	40 (HA1)	30
250	G500	150	50 (HA1)	30

Tableau III. 1 : Gamme de HA hydrolysée par la hyaluronidase lyase (100 UI/mL) dans du tampon acétate 20 mM pH 6. (HA1 : HA à 1 mg/mL dans le tampon acétate ; HA2 : HA à 0,1 mg/mL dans le tampon acétate).

Concentration de CS (µg/mL)	Points de gamme	Tampon Tris HCl (µL)	Volume de la solution de CS (µl)	Chondroïtine sulfate lyase ABC (µL)
3	G3	235	7,5µl SM1	50
10	G10	200	25µl SM1	50
30	G30	100	75µl SM1	50
100	G100	200	25µl SM2	50

Tableau III. 2 : Gamme de CS hydrolysée par la chondroïtinase lyase ABC (10 UI/mL) dans du tampon Tris HCl 50 mM pH 8.(SM1 : 0,1 mg/mL ; SM2 : 1 mg/mL)

Pour l'hydrolyse enzymatique, les mélanges contenant une masse connue de HA ou de CS ainsi que l'enzyme ont été placés à 37°C, durant 72 h. 220 µL ont ensuite été prélevés et centrifugés 1 h, à 4°C, à la vitesse de 10 000 tr/min sur des tubes à filtre Ultrafree®-MC de NMWL 10 000. Le dosage par ECZ-AI a été réalisé sur 170 µL de ce filtrat, additionnés de 5 µL de Mix B (Beckman Coulter, USA). Le Mix B est composé de d'acide 4-hydroxybenzoïque (0,72 mM) et d'acide 4-hydroxyphénylacétique (0,66 mM) et sert d'étalon interne pour l'analyse par ECZ-AI.

Analyse par ECZ-AI

Les conditions expérimentales sont valables pour le dosage du HA et de la CS.

La séparation des oligosaccharides résultant de l'hydrolyse a été réalisée sur un capillaire (eCAPTM capillary Tubing, Beckman Coulter, USA) de 50 cm à l'aide du tampon de migration durant 15 min à 30 kV (HA) ou durant 20 min à 15kV (CS). Le tampon de migration se compose de 4,625 mL de tampon borate/acide borique [tampon B/AB : tétraborate de sodium 10 mM (BORAX, Sigma Aldrich, France), acide borique 50 mM (Merck, Damstadt, Allemagne)] additionné de 375 µL de PIC® Reagent A (Waters corporation, Milford, USA) dilué au 3/8^{ème} dans le tampon B/AB. La détection est réalisée en UV à 232 nm. Le conditionnement du capillaire est réalisé de la manière suivante :

- HCl 0,1 M (pour nettoyer le capillaire)
- eau (pour éliminer l'acide)
- NaOH 0,1 M (pour conditionner le capillaire)
- eau (pour éliminer l'excès de soude)
- tampon de migration (pour conditionner le capillaire)

Les différentes solutions sont dégazées et filtrées avant injection sur des tubes à filtre Ultrafree®-MC de NMWL 10 000.

Un conditionnement est réalisé en début d'utilisation de l'appareil et tous les 10 échantillons.

Exploitation des données

Pour le HA :

Selon Payan et al [15], l'hydrolyse du HA par la hyaluronidase lyase engendre des tétrasaccharides (T), des hexasaccharides (H) et des octasaccharides (O). Les deux pics principaux de l'électrophorégramme obtenu à partir du HA (Figure III. 6) correspondent aux tétrasaccharides et hexasaccharides. Le pic d'octasaccharide résulte de la réassociation de deux tétrasaccharides.

Le logiciel d'analyse (PDA, Beckman) fournit le temps de rétention du produit et son aire sous courbe. Les trois pics correspondants au HA ainsi que le standard interne (Mix B) sortent rapidement (en moins de 5 min). L'utilisation d'un standard interne (SI) permet de normaliser les valeurs de l'aire sous courbe du composé, d'une détection à une autre.

La gamme utilisée permet d'obtenir une équation du type $y = ax + b$ où y correspond au rapport des aires sous courbes soit (aire T + aire H + aire O)/aire SI) et x à la concentration en HA. Les quantités de HA présentes sur ou dans les nanoparticules sont ensuite calculées à partir des aires sous courbes de ces échantillons et de l'équation de droite ($x = (y - b)/a$) puis rapportées à la masse totale de nanoparticules (μg de HA par mg de nanoparticules). A titre d'exemple nous montrons également sur la Figure III. 6, l'électrophorégramme obtenu à partir d'un hydrolysats de nanoparticules recouvertes de HA.

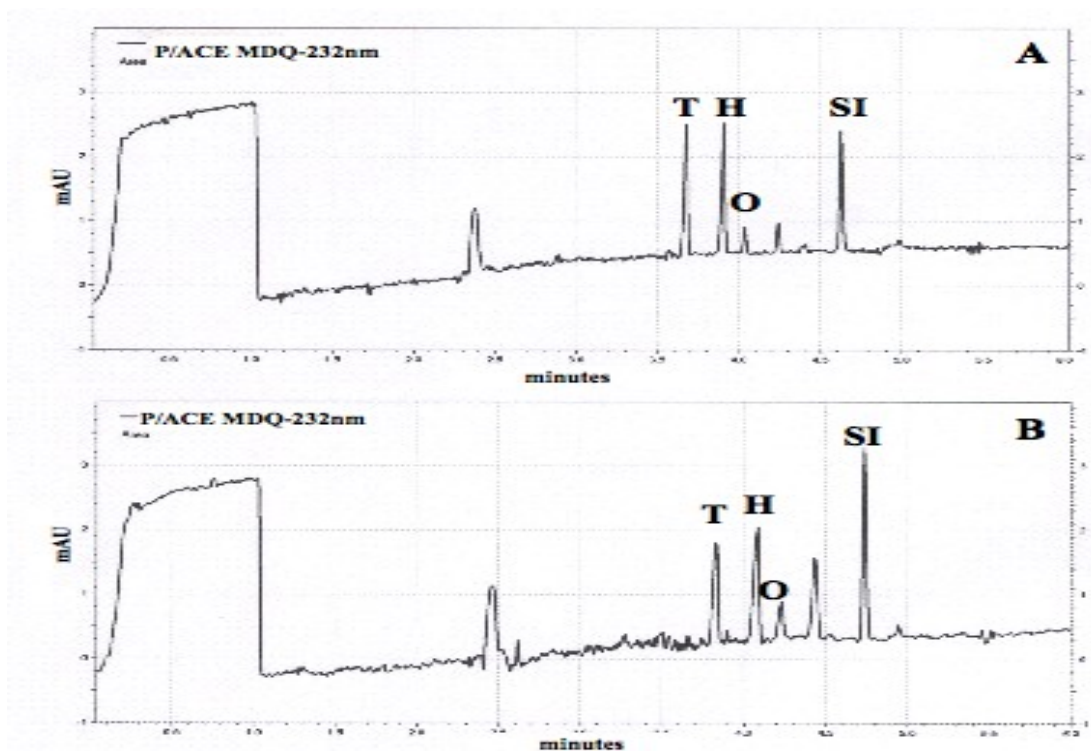


Figure III. 6 : *Electrophorégramme du point 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la gamme en HA (A) et électrophorégramme d'un échantillon d'hydrolysats de nanoparticules recouvertes de HA (B). (T : tétrasaccharide ; H : hexasaccharide ; O : octasaccharide ; SI : standard interne)*

Pour la CS :

L'hydrolyse de la CS par la chondroïtinase lyase ABC, conduit à un seul pic correspondant à des unités disaccharidiques [15]. L'utilisation de l'ECZ-AI permet de séparer et de quantifier ces unités. Les données sont exploitées comme précédemment à l'aide du logiciel d'analyse (PDA ; Beckman).

La gamme de disaccharides utilisée permet d'obtenir une équation du type $y=ax+b$ où y est le rapport des aires sous courbes (aire disaccharide/aire SI) et x la concentration en disaccharides résultant de l'hydrolyse de la CS. Les quantités de CS dans les nanoparticules sont ensuite

calculées à partir des aires sous courbes des échantillons et de l'équation de droite ($x = (y - b)/a$) puis exprimées par rapport à la masse totale des nanoparticules.

A titre d'exemple nous montrons sur la Figure III. 7, l'électrophorégramme obtenu à partir de CS à 100 µg/mL.

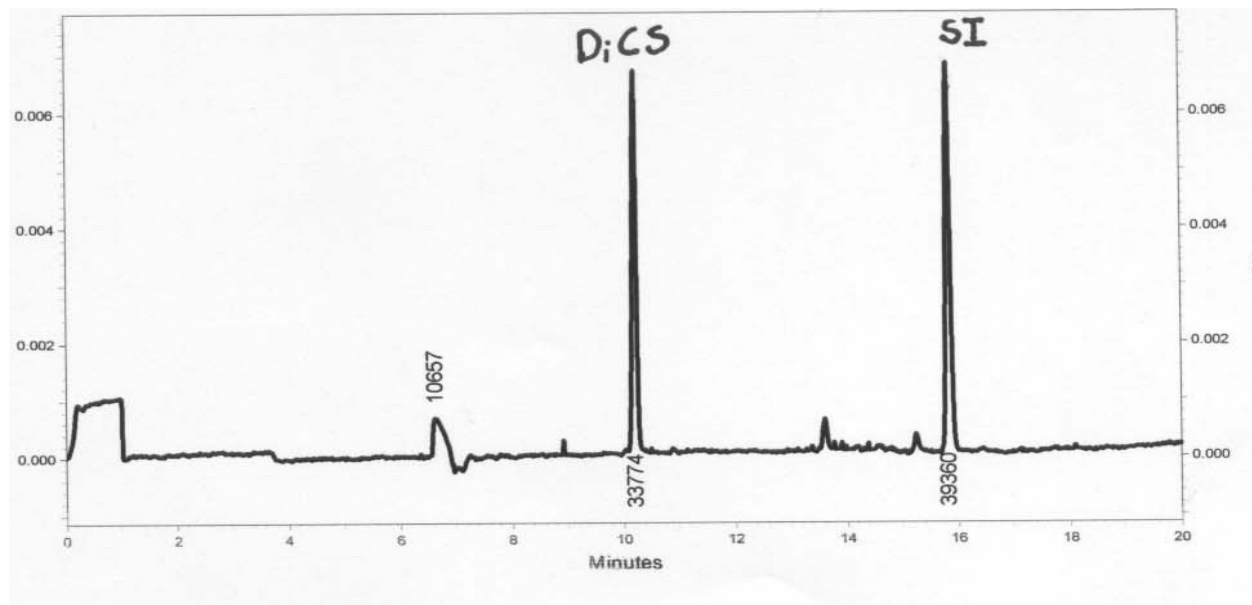


Figure III. 7 : Electrophorégramme du point 100 µg/mL de la gamme en CS (DiCS : disaccharide ; SI: standard interne).

II.3.4. Dosage de l'héparine

L'héparine présente dans la solution résultant de la dégradation de la matrice de PLA des nanoparticules, a été dosée en utilisant une méthode colorimétrique au bleu de toluidine.

Cette méthode a d'abord été décrite par Macintosh [20] puis modifiée par Hermanson [21].

Lorsqu'il se lie à une molécule polyanionique, ce colorant chargé positivement change de couleur passant du bleu au rouge-violet. Son spectre d'absorption est modifié d'où sa propriété métachromatique (la longueur maximale d'absorption est déplacée vers une longueur d'onde plus basse). Ce phénomène est dû au fait que le colorant s'associe réversiblement aux molécules anioniques par l'intermédiaire de liaisons ioniques.

Ainsi la $\lambda_{\max}$ du bleu toluidine en solution dans l'eau est de 631 nm. Celle du bleu de toluidine en solution associé avec de l'héparine est de 540-560 nm selon la concentration en colorant et en Hép.

On ne peut pas doser directement l'héparine en mesurant la diminution d'absorbance à 631 nm car la bande métachromatique du bleu toluidine pur est chevauchante avec celle du bleu de toluidine complexé à l'héparine. Il faut éliminer le complexe colorant-héparine par adsorption à

l'interface d'un solvant organique, ici l'hexane. Ainsi, une fois le complexe éliminé de la phase aqueuse, la diminution de la concentration du colorant libre dans la phase aqueuse peut-être directement déterminée et reliée à la concentration en héparine initiale. Le bleu de toluidine libre restant dans le surnageant est dosé par la mesure de l'absorbance à 631 nm et comparé avec une courbe standard : [héparine] = f (absorbance). La quantification de l'héparine initiale réalisée à partir de la différence entre la quantité de colorant ajoutée au départ et celle restant dans le surnageant après complexation avec la protéine. Des exemples de spectres sont donnés sur la Figure III. 8.

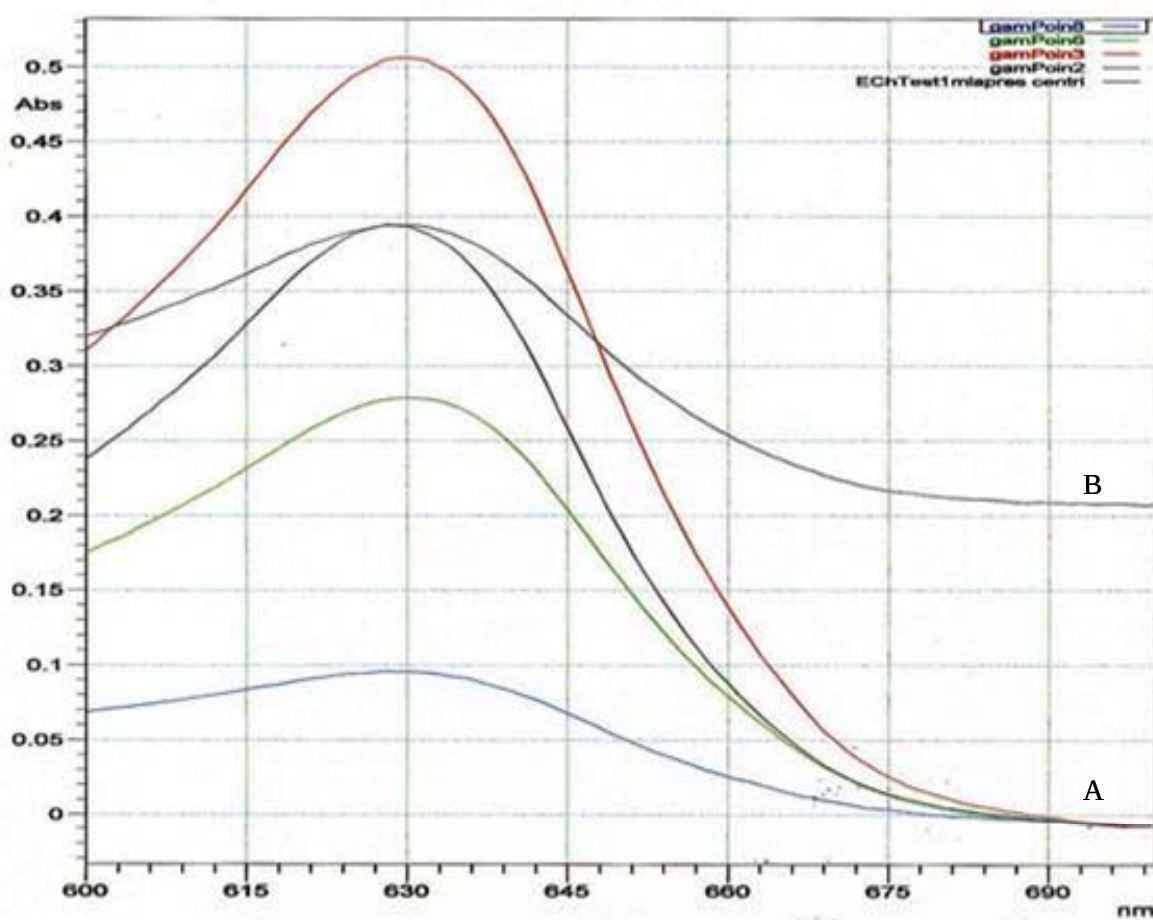


Figure III. 8 : Spectre à 631 nm du bleu de toluidine non complexé dans la phase aqueuse ; A représente une gamme en quantité croissante en héparine (de haut en bas) et, à titre d'exemple, B un échantillon d'hydrolysats de nanoparticules contenant de l'héparine.

Une courbe d'étalonnage a été tracée avec l'héparine fournie par Bioiberica S.A. (Barcelone) selon le protocole suivant :

Dans des tubes en verre, on dépose :

Tubes	0	0,5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Héparine à 200 µg/mL) (µL)	0	5	25	50	100	150	200	250	300	350	400	500	600
NaCl 0,2% (mL)	2,5	2,5	2,5	2,45	2,4	2,35	2,3	2,25	2,2	2,15	2,1	2,0	1,9
Quantité héparine (µg)	0	2	5	10	20	30	40	50	60	70	80	100	120

Dans chacun des tubes on ajoute 2,5 mL de bleu de toluidine 0,006% et on agite au vortex pendant 30 s. On ajoute ensuite 5 mL d'hexane et l'on passe au vortex pendant 30 s. Les deux phases décantent spontanément. La phase aqueuse est récupérée et diluée 10 fois et on lui ajoute 9 mL d'éthanol et 1 mL d'eau. L'absorbance de cette solution est lue à 631 nm dans les 30 min qui suivent.

Le profil de la courbe d'étalonnage est donné sur la Figure III. 9.

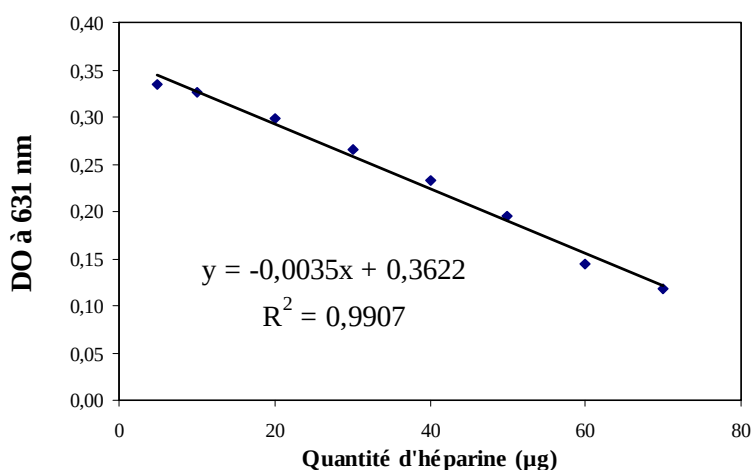


Figure III. 9 : Densité optique à 631 nm du bleu de toluidine non complexé restant dans la phase aqueuse pour différentes quantités d'héparine initiale.

Concernant l'Hép encapsulée dans les nanoparticules, sa quantité est déterminée en utilisant cet étalonnage. Afin d'éviter toute interaction entre le HA en surface des nanoparticules et le bleu de toluidine, seuls des lots sans HA en surface et contenant l'héparine ont été caractérisés. Ainsi, l'hydrolysate des nanoparticules ne contient que l'héparine comme polysaccharide.

III. RESULTATS

III. 1. PREPARATION DES NANOPARTICULES ET CARACTERISATION EN TERMES DE TAILLE

Avant de préparer les particules par un procédé de double émulsion/évaporation de solvant, nous avons préalablement élaboré des nanoparticules de PLA recouvertes de HA par simple émulsion (huile/eau) de façon à étudier l'influence d'un certain nombre de paramètres sur, en particulier, la taille des nanosphères.

III.1.1. Procédé de simple émulsion/évaporation de solvant

III. 1.1.1. Influence de la méthode d'émulsification

Dans un premier temps, comme nous avons à notre disposition 2 méthodes d'émulsification, le microfluidiseur et la sonde à ultra-sons (par. II 1.1.2.), nous avons voulu connaître l'influence de ces 2 techniques sur d'une part la taille des émulsions et d'autre part la masse molaire du HA. En effet on sait que les chaînes polymères peuvent, selon leur structure chimique, être plus ou moins dégradées lorsque leurs solutions sont soumises à des forces mécaniques ou à des ultra-sons.

Pour comparer les effets du mode d'émulsification sur la taille finale des émulsions et sur la masse molaire du HA dans le cas d'une simple émulsion huile dans eau stabilisée avec du HAC₆, nous avons mis au point deux expériences :

➤ Pour la taille d'émulsion

1 mL solution de PLA dans le dichlorométhane (25 mg/mL) est mélangé à 10 mL d'une solution aqueuse de HAC₆ à 0,5 mg/mL.

L'émulsification est réalisée par l'une ou l'autre des 2 méthodes :

Sonication : 2 min de passage au vortex puis 2 min de passage au sonicateur à la puissance 5 avec 50% de cycle actif.

Microfluidiseur : n passages au microfluidiseur (P = 2Bar) correspondant à un cycle de passage complet du mélange au travers du piston (n = 10, 20 et 30).

➤ Pour la masse molaire du HA :

On prépare une solution de 0,5 g/L de HA-TBA (HA traité comme les HA amphiphiles mais sans l'ajout de bromure). Ce HA-TBA a subi l'étape d'acidification et de neutralisation au TBAOH dont on sait qu'elle dégrade légèrement le polymère.

On simule ensuite l'étape d'émulsification en remplaçant dans les manipulations précédentes :

* le HA amphiphile par le HA-TBA (l'utilisation de HA amphiphile n'est ici pas compatible avec des mesures en SEC-MALLS qui seront nécessaires pour la détermination des masses molaires).

* la concentration en PLA dans le dichlorométhane qui passe de 25 g/L à zéro.

Ainsi, on obtient « des pseudo-émulsions » dont les deux phases décantent très vite (moins d'une min) car le HA-TBA ne permet pas l'établissement d'émulsions stables. Puis, on récupère la phase aqueuse ne contenant que le HA-TBA. Celle-ci est placée en étuve (50°C) afin d'obtenir un extrait sec en HA-TBA. Ce HA-TBA (témoin de l'effet des ultrasons ou des entrechoquements sur sa masse molaire) est ensuite caractérisé en SEC-MALLS afin d'en calculer les masses molaires moyennes en nombre et en masse (chapitre II, paragraphe II.2.1.3).

La Figure III. 10 montre le diamètre moyen des gouttelettes des émulsions et la masse molaire des échantillons de HA-TBA, obtenues après traitement des solutions par ces deux techniques d'émulsification.

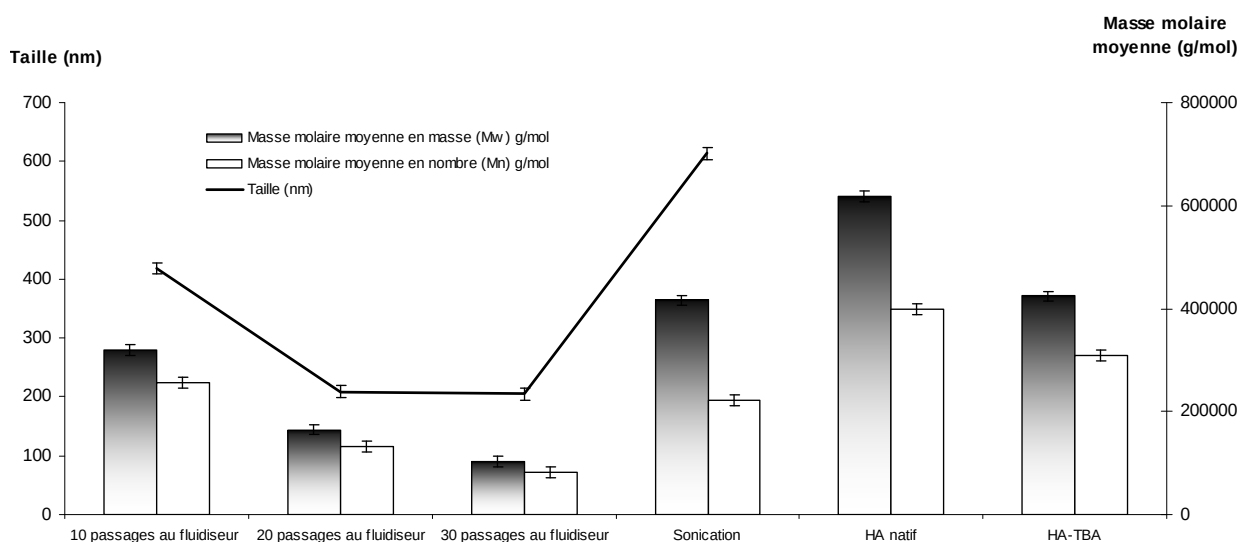


Figure III. 10 : Comparaison de l'effet des techniques d'émulsification (sonication et microfluidiseur à n passages) sur les masses molaires moyennes en nombre et en masse du HA-TBA et sur la taille finale de l'émulsion préparée en présence de HAC₆. Les masses molaires moyennes du HA-TBA sont celles du polymère n'ayant pas subi l'étape d'émulsification. (A titre indicatif, on rappelle les valeurs de $\overline{M}_n$ et $\overline{M}_w$ du HA natif).

Concernant la taille des émulsions obtenues, on voit que le microfluidiseur permet d'atteindre des tailles moyennes d'émulsion plus faibles que celles obtenues par sonication.

Le diamètre moyen des gouttelettes des émulsions après passage au microfluidiseur n'est que de 200 nm à partir de 20 cycles. Cela semble constituer la limite inférieure des tailles possibles à atteindre avec ce procédé car elle est identique après 30 cycles. En comparaison, le diamètre obtenu en utilisant les ultrasons est d'environ 600 nm.

La masse molaire du polymère :

Sur la Figure III. 10, on voit que les 2 masses molaires moyennes du HA-TBA après sonication, sont très proches de celles du HA-TBA non traité aux ultra-sons mais légèrement plus faibles, soit :

- pour le premier $\overline{M}_w = 416\,050\text{ g/mol}$ et $\overline{M}_n = 221\,700\text{ g/mol}$

- pour le 2^{ème} $\overline{M}_w = 423\,950\text{ g/mol}$ et $\overline{M}_n = 307\,850\text{ g/mol}$

Ces résultats montrent que la sonication est responsable d'une très légère dégradation chimique du HA, ce qui a déjà été rapporté par d'autres auteurs dans le cas de polysaccharides et en particulier du HA [22]. Ces auteurs ont attribué cette dégradation à des phénomènes de cavitation, aux contraintes mécaniques et à la formation de radicaux.

En revanche, les masses molaires moyennes obtenues après passage au microfluidiseur chutent de façon importante. Ainsi, $\overline{M}_w$ n'est plus que de 319 520 g/mol après 10 passages et seulement de 257 130 g/mol après 30 passages. Une telle dégradation mécanique par microfluidisation a déjà été décrite pour des polysaccharides et particulièrement pour le xanthane [23] et serait provoquée par les mécanismes de cisaillements et d'entrechoquements ainsi que par les forces de turbulence générées dans le microfluidiseur.

En conclusion, si le microfluidiseur permet d'atteindre des tailles d'émulsion plus faibles qu'avec la sonde à ultra-sons, on constate qu'au fil des passages, le HA-TBA subit une diminution de masse molaire importante (environ 3,5 fois plus petite après 30 passages) signe d'une dégradation chimique significative du polymère.

Cette diminution de la longueur de la chaîne polymère pourrait expliquer que la taille de l'émulsion préparée en présence de HAC₆ diminue avec le nombre de passages.

En effet les fragments résultant de cette dégradation sont vraisemblablement plus flexibles que les longues chaînes initiales de polymère et donc doivent pouvoir épouser plus facilement des rayons de courbure élevés, baissant ainsi le diamètre moyen de l'émulsion. Cette dégradation, engendre aussi une baisse de viscosité de la phase aqueuse ce qui peut favoriser la formation de gouttelettes plus petites.

Finalement au vu de ces résultats, nous avons décidé de privilégier la sonication comme méthode d'émulsification plutôt que la microfluidisation responsable d'une dégradation chimique du polymère. En effet notre objectif était d'encapsuler des polysaccharides bioactifs

qui pouvaient également subir une dégradation analogue pendant les 2 étapes d'émulsification et perdre éventuellement leur activité biologique.

III.1.1.2. Protocole expérimental retenu pour la synthèse des nanoparticules

10 mL de phase aqueuse contenant du HA amphiphile (HAC₆, HAC₁₂ ou HAPhe) utilisé ici comme surfactif, sont placés dans un tube de type Falcon®. Différentes concentrations ont été utilisées: soit 0,5, 1 et 5 g/L.

La phase organique (1mL) est constituée de dichlorométhane dans lequel on a dissous du PLA à une concentration de 25 g/L.

Les 2 phases sont soumises au vortex (2 min) puis aux ultrasons (2 min, puissance 5, cycle actif 50%) dans un bain de glace, pour créer une émulsion huile dans eau.

Le solvant organique est ensuite évaporé le plus souvent à l'air par agitation de la solution à l'aide d'un simple barreau aimanté ou parfois par évaporateur rotatif.

La taille des gouttelettes d'émulsion et celle des nanoparticules obtenues après évaporation du solvant a été mesurée en spectroscopie de corrélation de photons.

III.1.1.3. Influence de différents paramètres sur la taille des émulsions et des nanoparticules

L'influence sur la taille des émulsions, des différents facteurs listés ci-dessous, a été étudiée :

- la nature du HA amphiphile.
- sa concentration dans la phase aqueuse
- nous avons également remplacé le dichlorométhane par de l'acétate d'éthyle pour évaluer l'influence du solvant.

Les résultats sont rassemblés dans le Tableau III. 3. :

		Concentration en polymère (g/L)		
Polymère surfactif	Solvant utilisé	0,5	1	5
HAC ₁₂	Acétate d'éthyle	440±35	560±40	1840±70
	Dichlorométhane	320±30	350±35	1630±80
HAC ₆	Acétate d'éthyle	490±35	770±50	>5000
	Dichlorométhane	290±30	380±40	>5000
HAPhe	Acétate d'éthyle	390±40	530±40	>5000
	Dichlorométhane	390±40	350±40	>5000

Tableau III. 3 : Influence de différents paramètres de l'émulsification sur le diamètre moyen des gouttelettes de l'émulsion.(Protocole expérimental décrit en III.1.1.2.)

La simple émulsion en tant que telle est intéressante pour encapsuler une molécule liposoluble. Dans notre étude où il s'agit d'encapsuler des molécules hydrosolubles, ces résultats nous ont servi en fait à déterminer les meilleures conditions (en termes de taille d'émulsion) pour la double émulsion. En effet, dans la simple émulsion, le facteur stabilisant est le HA amphiphile qui stabilise l'interface entre le solvant organique et la phase aqueuse. Ainsi, la capacité de celui-ci à stabiliser cet interface sera une donnée intéressante pour la mise au point des paramètres de la synthèse de nanoparticules par double émulsion/évaporation de solvant.

* Influence du solvant

On remarque dans le Tableau III. 3 que le solvant joue un certain rôle sur la distribution et la valeur de la taille finale des émulsions. Ainsi le dichlorométhane conduit à des émulsions dont la taille est en général plus faible (environ 25%) que dans le cas de l'acétate d'éthyle. Zhao et al (REF) ont montré l'importance du solvant organique lors de procédé de double émulsion dans la valeur finale de la taille de l'émulsion et le taux d'encapsulation du PA. Il montre notamment qu'un solvant organique (mélange dichlorométhane et acétate d'éthyl) utilisé avec une phase aqueuse externe non saturée avec ce solvant permet d'abaisser significativement la taille des nanoparticules par rapport à une phase aqueuse externe saturée. En utilisant une phase aqueuse non saturée, non seulement la taille moyenne des nanoparticules est 147 nm contre 1649 nm mais aussi le taux d'encapsulation du PA est largement meilleur soit 86,6% contre 39,7%. Aussi, Gaucher et al [24] montrent que des distributions de tailles nettement différentes sont obtenues en changeant de solvant organique dans un procédé de double émulsion-évaporation de solvant. Ainsi, une comparaison est faite entre le dichlorométhane et l'acétate d'éthyle avec le copolymère poly(N-vinyl-pyrrolidone)-bloc-poly D,L lactide (PVP-b-PDLLA) et le poly éthylène glycol-bloc-poly D,L lactide (PEG-b-PDLLA). Ils montrent ainsi que le premier solvant permet une meilleure stabilisation de l'émulsion et conduit à une distribution plus homogène en taille. En revanche pour les émulsions simples huile dans eau, des résultats inverses sont obtenus avec le PEG-b-PDLLA.

* Influence de la concentration en HA amphiphile

On constate dans le

Tableau III. 3, que la taille des émulsions augmente avec la concentration en HA amphiphile. On sait que la viscosité des solutions aqueuses de polymères amphiphiles augmente avec la concentration entre autres parce que les interactions hydrophobes entre chaînes se multiplient, créant ainsi des agrégats. On peut alors supposer que ce sont des agrégats qui s'adsorbent à l'interface de l'émulsion, ce qui conduit à des gouttelettes plus grosses. Les très fortes tailles obtenues à 5 g/L sont probablement aussi le résultat d'une agrégation très importante de même nature mais cette fois-ci entre les gouttelettes stabilisées par du HA amphiphile.

*Influence de la nature du HA amphiphile

On observe assez peu de différence dans la taille des émulsions selon la nature du greffon hydrophobe, ce qui peut-être est à relier au faible taux de substitution des polymères et leur peu de différence dans leurs propriétés tensioactives.

En ce qui concerne les nanoparticules (après évaporation du solvant organique), elles ont subi plusieurs lavages en vue d'éliminer le HA amphiphile non fixé en surface et l'excédent de phase aqueuse interne non encapsulée dans les nanoparticules. Ces lavages successifs ont été effectués par de l'eau milliQ, alternés avec 3 cycles de centrifugation douce (15 min à 4000 tr/min). Ces lots ont ensuite été lyophilisés.

Nous avons étudié l'influence du mode d'évaporation sur la taille des nanoparticules obtenues après évaporation du solvant à l'évaporateur rotatif est toujours plus élevée que lorsque l'opération se fait lentement, à l'air ambiant sous agitation magnétique. A titre d'exemple, la taille des nanoparticules est de 425 nm en utilisant un barreau magnétique contre 505 nm avec un évaporateur rotatif, pour un même lot dont seul le mode d'évaporation du solvant organique diffère.

A partir de ces résultats, nous avons donc retenu les conditions suivantes pour la préparation des nanoparticules par double émulsion :

- solvant : dichlorométhane
- concentration en HA amphiphile : 0,5 g/L
- HA amphiphiles : HAC₆, HAC₁₂ et HAPhe
- évaporation du solvant à l'air ambiant avec un barreau magnétique sauf précision contraire.

III.1.2. Procédé de double émulsion/évaporation de solvant : élaboration de nanoparticules vides (sans principe actif)

III.1.2.1. Emulsion primaire (eau dans huile)

Dans un premier temps nous nous sommes intéressés aux conditions de formation de l'émulsion primaire, préparée avec 400 μ L de phase aqueuse et 4 mL d'une solution de PLA à 25 g/L dans le dichlorométhane. Nous avons observé qu'il n'y avait pas d'émulsion stable dans ces conditions et qu'au bout de 10 min, 2 phases non miscibles s'étaient formées. Conformément à des résultats précédemment obtenus au LCPM qui montraient que l'albumine de sérum bovin (BSA) [25] pouvait stabiliser ce type d'émulsion, nous avons alors ajouté cette protéine dans la phase aqueuse interne.

La BSA, du fait de ses propriétés amphiphiles (Figure III. 11), est en effet souvent utilisée dans les émulsions comme tensioactif.

Des essais concluants pour cette émulsion primaire ont été obtenus en utilisant 50 g/L de BSA dans la phase aqueuse.

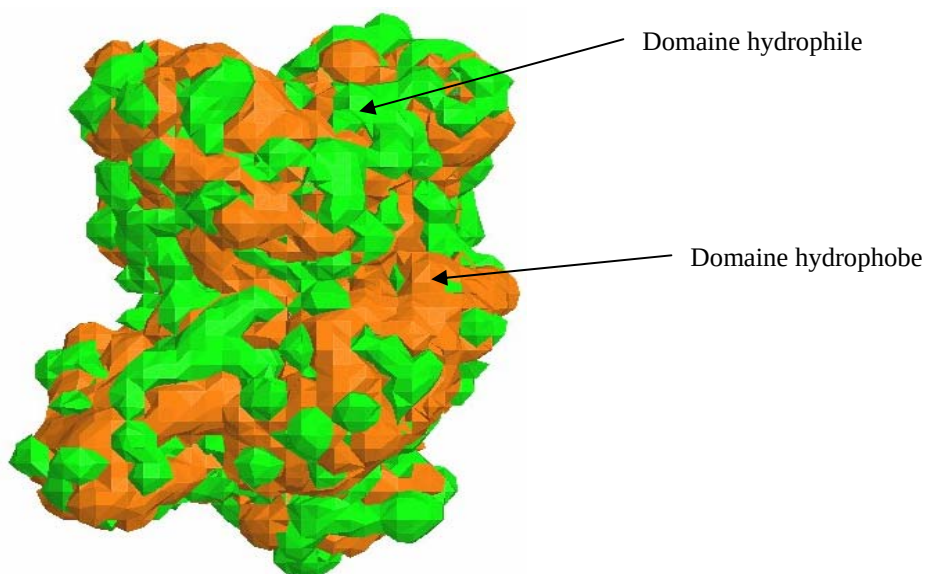


Figure III. 11 : Représentation de la molécule de BSA. (Les surfaces hydrophobes apparaissent en orange, les hydrophiles en vert.) <http://biotechno.acrouen.fr/biochimie/Figurealbumine/albumine7.htm>

III.1.2.2. Double émulsion (eau/huile/eau)

Protocole type

Emulsion primaire:

A 400 μ L de solution aqueuse (eau MilliQ) sans BSA ou avec BSA (50g/L), renfermant ou non le PA (le cas échéant à une concentration de 5 g/L), on ajoute 4 mL d'une solution de PLA à 25 g/L dans le dichlorométhane. Les 2 phases sont agitées au vortex (2 min) puis soniquées.

Emulsion secondaire :

On ajoute 8 mL de solution aqueuse externe contenant du HA amphiphile utilisé comme surfactif à 0,5 g/L. Le système est agité au vortex (2 min) puis soniqué. L'émulsion est ensuite laissée 5 min à l'air pour se stabiliser et on y ajoute 40 mL d'eau milliQ comme phase dispersante.

On effectue ensuite 3 lavages à l'eau successifs chacun suivi d'une centrifugation de 15 min à 5000 tr/min. Les nanoparticules sont ensuite remises en suspension dans 10 mL d'eau et lyophilisées. La lyophilisation se fait par congélation de la suspension de nanoparticules par de l'azote liquide et mise sous vide d'air (0,0036 mBar à -40°C). Le lyophilisateur est de type Freeze Dry, Labconco.

L'ajout de la phase dispersante permet d'augmenter la distance gouttelette-gouttelette d'émulsion avant l'évaporation de solvant. Elle permet ainsi de limiter la coalescence et autres phénomènes de vieillissement nocifs pour la taille finale des nanoparticules avant l'évaporation du solvant organique.

Des nanoparticules « nues » (non recouvertes par un polymère) ont été préparées en remplaçant le HA amphiphile par un tensioactif classique, le cholate de sodium (3g/L), dans la phase aqueuse de l'émulsion secondaire. Le cholate de sodium est un produit Aldrich, France.

De la même façon des particules recouvertes de poly(alcool vinylique) (PVA) ont été élaborées en remplaçant le HA amphiphile par du PVA à la concentration de 10 g/L dans la phase aqueuse externe. Le PVA est un produit Aldrich, Milwaukee, USA (masse molaire comprise entre 13 000 et 23 000 g/mol, hydroxylé à 87-89%).

Enfin des nanoparticules renfermant un marqueur polymère, le dextrane marqué à la fluorescéine thioisocyanate (FITC, masse molaire 500 000 g/mol, taux de greffage de 0,004 mol de FITC/mol de glucose, $E_{\text{EXmax}} = 492 \text{ nm}$ et $E_{\text{EMmax}} = 518 \text{ nm}$, Aldrich, France), ont été obtenues en dissolvant cette macromolécule dans la phase aqueuse de l'émulsion primaire au lieu du PA, à une concentration de 5 g/L.

III.1.2.3. Résultats

D'une manière générale, on a constaté que la taille des émulsions à $t = 0$ est la même que celle des nanoparticules obtenues juste après l'évaporation de solvant c'est-à-dire sans lavages, centrifugation, ni lyophilisation. On verra par la suite (par. III.1.3.2.) que ces différentes opérations entraînent une augmentation de la taille des particules.

Le Tableau III. 4 donne la taille des nanoparticules obtenues en présence d'une phase aqueuse interne renfermant de la BSA à 50 g/L après lavages, centrifugation et lyophilisation.

La phase aqueuse externe contient le HA amphiphile à 0,5 g/L.

Deux protocoles d'émulsification ont été expérimentés : l'un (protocole 1) consiste à préparer l'émulsion primaire en soumettant le système initial au vortex (2 min) puis à la sonde à ultrasons (2 min, 50% de cycles actifs, puissance 5). L'émulsion secondaire est agitée 2 min au

vortex et soniquée 2 min (50% de cycles actifs, puissance 5). Dans le protocole 2, le système initial est soumis au vortex (2 min) et est soniqué pendant 10 s en mode continu à la puissance 10. Pour l'émulsion secondaire on utilise le vortex et la sonication dans les mêmes conditions.

Type de HA amphiphile	Diamètre moyen des nanoparticules (nm)		
	HAPhe	HAC ₆	HAC ₁₂
Protocole n°1	560±25	450±20	650±35
Protocole n°2	660±30	490±30	540±30

Tableau III. 4 : Taille des nanoparticules en fonction du protocole utilisé. [HA amphiphile] = 0,5 g/L dans la phase aqueuse externe. [BSA]=50 g/L dans la phase aqueuse interne. Mesure après évaporation du solvant organique à l'aide d'un barreau magnétique pendant 4h (n=8), après lavages, centrifugations et lyophilisation.

On ne constate pas de grande différence de taille des particules selon le protocole d'émulsification. Par la suite nous avons toujours utilisé le Protocole 1.

Sans évaporation de solvant, les gouttelettes de l'émulsion laissée au repos ont un diamètre qui augmente avec le temps. A $t = 0$, le diamètre de l'émulsion finale pour le HAC₆ est de 450 nm, puis ce diamètre évolue de la façon suivante :

- 550 nm après 6 h de repos.
- 1050 nm au bout de 24 h
- plus de 3000 nm après 36 h

Cette augmentation est principalement causée par la fusion des gouttelettes de plus en plus grosses. Ainsi chaque phénomène engendre non seulement une émulsion de taille plus élevée mais en plus cette probabilité de fusion augmente avec la taille des émulsions. Ces deux phénomènes concourent à une augmentation exponentielle et rapide des diamètres d'émulsion. Après l'évaporation du solvant organique par agitation magnétique à l'air libre, la taille des nanoparticules reste stable après 72 h. La même observation a été faite pour une évaporation à l'évaporateur rotatif.

III.1.3. Procédé de double émulsion/évaporation de solvant : élaboration de nanoparticules chargées en principe actif (PA)

Les principes actifs qui ont été encapsulés sont le HA, la CS et l'Hép. Les PA ont été dissous dans la phase aqueuse interne de l'émulsion primaire, à une concentration de 5 g/L.

Les essais ont été réalisés avec et sans BSA dans la phase aqueuse interne.

Les particules ont été préparées selon le protocole décrit dans le paragraphe III.1.2.2. avec 2 min au vortex, et 2 min de sonication (50% de cycles actifs, puissance 5) pour l'émulsion primaire et secondaire.

III.1.3.1. En absence de BSA

Le tableau 3 présente les résultats de la taille finale des nanoparticules préparées en utilisant une phase aqueuse interne dans laquelle est dissous le PA ([HA]=5g/L dans l'eau) et ne contenant pas de BSA.

Type de HA amphiphile	Diamètre moyen des nanoparticules (nm)		
	HAPhe	HAC ₆	HAC ₁₂
Protocole n°1	740±40	790±40	895±60
Protocole n°2	1120±80	835±60	>1500

Tableau III. 5 : Taille des nanoparticules en fonction du protocole utilisé sans BSA mais avec un PA (HA à 5g/L) dans la phase aqueuse interne. [HAC_n] = 0,5 g/L dans la phase aqueuse externe. Taille des nanoparticules mesurée après évaporation du solvant organique à l'aide d'un barreau magnétique pendant 4 h. (n=8). (les tailles ont été mesurées après lavages, centrifugation et lyophilisation).

On voit que malgré l'absence de BSA dans la phase aqueuse interne mais en présence du principe actif (HA à 5 g/L) dans cette même phase, il est possible de préparer des nanoparticules alors qu'on a vu précédemment (par. III.1.2.1.) que la BSA était nécessaire pour stabiliser l'émulsion primaire faite en absence de PA.

On peut donc supposer que le PA qui est de nature macromoléculaire, contribue à stabiliser l'émulsion primaire, comme le font d'autres polymères comme le poly(alcool vinylique) par exemple [26, 27], du moins pendant le temps nécessaire pour former l'émulsion secondaire.

III.1.3.2. En présence de BSA

Les résultats en termes de taille sont reportés dans le Tableau III. 6.

Type de HA amphiphile	Diamètre moyen des nanoparticules (nm)		
	HAPhe	HAC ₆	HAC ₁₂
Avant évaporation	540±80	280±30	350±30
Après évaporation	850±110	650±40	690±40

Tableau III. 6 : Taille des gouttelettes de l'émulsion (avant évaporation du solvant organique) et des nanoparticules (après évaporation) obtenue avec [HA modifié] = 0,5 g/L dans la phase aqueuse externe. [BSA] = 50 g/L et [HA] = 5g/L dans la phase aqueuse interne. (n=8). (les tailles ont été mesurées après évaporation, lavages, centrifugation et lyophilisation)

L'indice de polydispersité des tailles de gouttelettes d'émulsion est de $0,12 \pm 0,02$, celui des nanoparticules (après évaporation du solvant, lavages, centrifugations et lyophilisation), mesuré au PCS, est de $0,21 \pm 0,05$. Ces indices sont inférieurs à la valeur théorique de 0,3 caractérisant une population peu polydisperse. On peut donc en conclure que les 2 types de « particules » sont relativement monodisperses, les processus d'évaporation du solvant, lavages, centrifugations et lyophilisation, contribuant à un élargissement de la distribution des tailles.

Si l'on examine les clichés obtenus au microscope électronique à balayage (Fig. III.12) pour des nanoparticules observées juste après l'évaporation du solvant, on constate que les tailles sont comprises entre approximativement 200 et 400 nm, et qu'il n'existe pratiquement pas de sphères de taille supérieure. Comme nous l'avons vu précédemment, les processus de lavages, centrifugations et lyophilisation peuvent être responsables d'une augmentation de la taille des nanoparticules, probablement suite à des phénomènes d'agrégation irréversible.

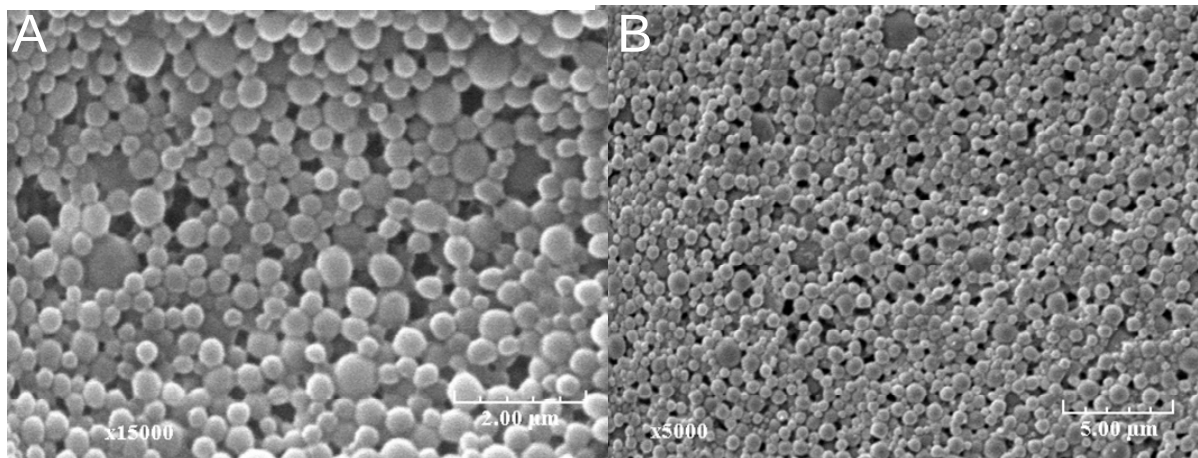


Figure III. 12 : Photos au MEB de nanoparticules recouvertes de HAC6 (0,5 g/L) et renfermant du HA (5 g/L) et de la BSA (50 g/L) avant lavages, centrifugation et lyophilisation. (A)-Grossissement x15000. (B)-Grossissement x5000

Par ailleurs il faut souligner 2 autres paramètres qui peuvent expliquer la différence de taille :

- Pour examiner les nanosphères au ME, on a recours à une métallisation et à une mise sous vide, opérations qui peuvent entraîner une contraction des particules.
- L'exploitation des mesures au PCS utilise un modèle théorique basé sur des simulations successives de calculs de taille en fonction du déplacement des nanoparticules dans un espace dv donné, alors que le MEB permet la visualisation concrète des nanoparticules après métallisation.

Au final, les résultats obtenus avec les HAC_n, dans les différentes conditions, sont récapitulés dans le Tableau III. 7:

Polymère amphiphile	BSA, sans PA	PA, sans BSA	BSA et PA
HAC ₆	450 ± 20	790 ± 40	650 ± 40
HAC ₁₂	650 ± 35	895 ± 60	690 ± 40

Tableau III. 7 : Taille des nanoparticules obtenue dans les différentes conditions. [HA modifié]=0,5 g/L dans la phase aqueuse externe. [BSA]=50 g/L et [HA]=5g/L dans la phase aqueuse interne. Toutes les tailles ont été mesurées après lavages, centrifugations et lyophilisation.

Dans ce Tableau III. 7, si l'on compare les résultats obtenus avec PA et BSA avec ceux obtenus avec PA sans BSA, on voit que la présence de BSA contribue à la diminution de la taille finale des nanoparticules. Si on compare avec les résultats obtenus avec BSA sans PA, on voit que la présence du PA a un effet plus ou moins défavorable sur la taille des particules selon la nature du HAC_n sans que l'on puisse faire d'hypothèses valables sur les raisons de ce phénomène.

Notons que dans les tableaux III.4 à III.6, des résultats sont donnés dans le cas de nanoparticules préparées en utilisant du HAPhe, preuve que ce polymère amphiphile peut également stabiliser l'émulsion secondaire. Cependant comme nous avons mis en évidence par PCS des nanoaggrégats d'environ 40 nm lorsque que l'on essaie de dissoudre ce polymère dans l'eau à 0,5 g/L, le processus de stabilisation de l'émulsion secondaire fait sans doute appel à des mécanismes différents de ceux qui existent pour les HAC_n.

Par la suite, nous avons travaillé uniquement sur les nanoparticules préparées en utilisant des HAC_n comme stabilisant de l'émulsion secondaire.

III.2. CARACTERISATION EN TERMES DE QUANTITES DE HA EN SURFACE
ET DE POLYSACCHARIDES ENCAPSULES

Ces quantités ont été évaluées selon les méthodes décrites dans le paragraphe II.3.

III.2.1. Validation de la méthode de dosage du HA pour les HA amphiphiles

Le dosage du HA non modifié faisant appel à une hydrolyse enzymatique, la question était de savoir si la présence de greffons hydrophobes sur le squelette polysaccharidique ne gênait pas l'interaction de la hyaluronidase lyase avec son substrat et donc son activité catalytique dans l'hydrolyse du polysaccharide.

Pour répondre à cette question, nous avons soumis à l'hydrolyse enzymatique le HA et les HA amphiphiles, en traitant dans les mêmes conditions, des quantités molaires égales de motifs disaccharidiques. Dans ce but, nous avons tenu compte de l'augmentation de la masse molaire de ces motifs due à la présence des greffons hydrophobes.

Sur la Figure III. 13, on a reporté les résultats obtenus en ECZ-AI pour les résidus oligosaccharidiques issus de l'hydrolyse des différents HA. Ces résultats sont exprimés sous la forme du rapport de la somme des aires sous les pics des résidus tétrasaccharidiques (T), hexasaccharidiques (H) et octasaccharidiques (O) soit (T+H+O) à l'aire sous le pic de standard interne (SI). Ces opérations ont été réalisées pour 2 valeurs de quantité initiale de HA soit les points G200 et G500 de la gamme en HA (

Tableau III. 1) et les quantités correspondantes de HA amphiphile. Il suffit alors de calculer le rapport des aires (T+H+O)/SI pour les 2 valeurs de quantité initiale de HA et les quantités correspondantes de HA amphiphile.

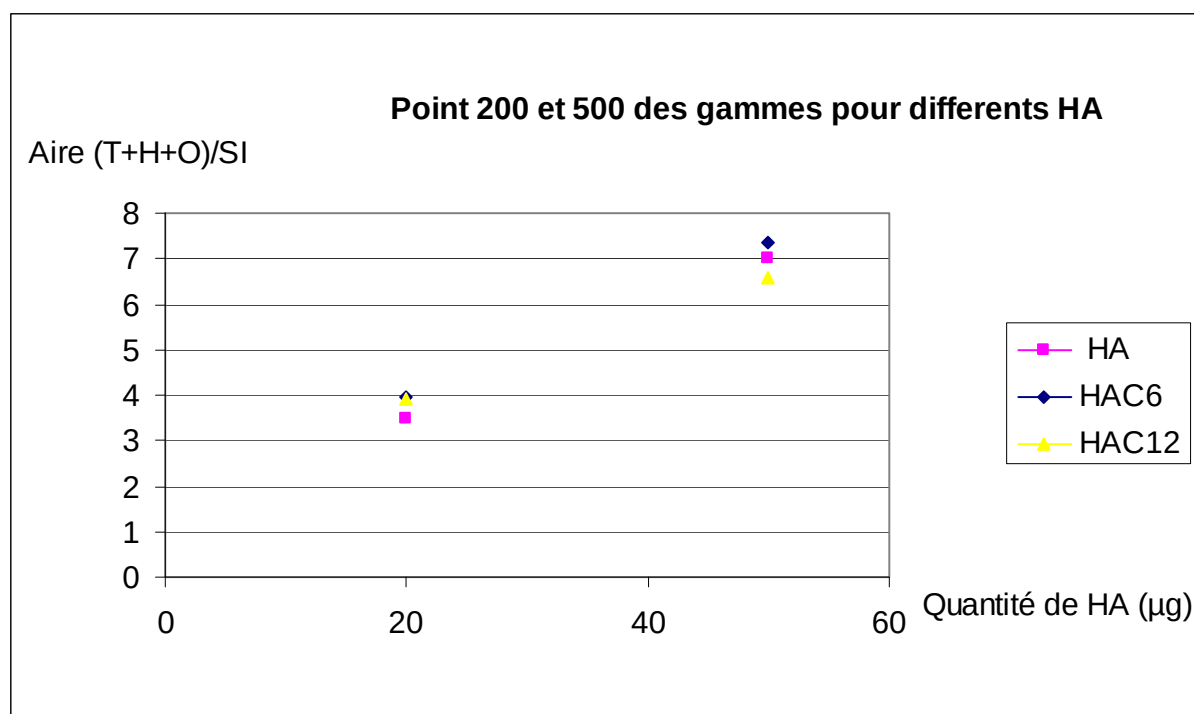


Figure III. 13 : Résultats du dosage par ECZ-AI des différents hyaluronates (natif et modifiés par des chaînes C₆ ou C₁₂) pour deux points de gamme contenant respectivement 100 μg/mL (G200) et 250 μg/mL (G500) de HA natif ou modifié.

On remarque que les points obtenus dans les 2 gammes ont la même ordonnée quelle que soit la nature du HA (natif ou modifié) ($n = 5$). La modification chimique du HA par des chaînes à 6 et 12 carbones n'entraîne pas de perte de produit durant le protocole de dosage. Elle ne modifie donc pas l'action de l'enzyme et le HA en surface des nanoparticules peut être quantifié par le même protocole bien qu'il soit substitué par des groupes hydrophobes.

Enfin, nous avons aussi vérifié que l'étape de centrifugation sur filtre, nécessaire pour séparer l'enzyme avant le dosage ECZ-AI, n'élimine pas les fragments oligosaccharidiques issus du HA modifié une fois celui-ci hydrolysé.

Ainsi le dosage du HA est exactement le même qu'il soit en surface (c'est-à-dire modifié chimiquement) ou encapsulé (HA natif).

III.2.2. Résultats concernant la couronne de HA

300 mg de nanoparticules sont dispersés dans 10 mL de tampon acétate 20 mM pH 6, 200 μL de cette suspension sont mis en contact avec 20 μL de hyaluronidase lyase (1000 unités dans 10 mL de tampon acétate). Le tout est traité comme décrit dans le paragraphe II.3.

Les résultats concernant la quantité de HA en surface des nanoparticules sont donnés dans le Tableau III. 8.

Le calcul a été fait sur des nanoparticules préparées en utilisant le HAC₆ ou le HAC₁₂ comme tensio-actif de l'émulsion secondaire

Nature du HA amphiphile	Quantité de HA en surface (µg/mg de nanoparticules)
HAC ₆	23±5
HAC ₁₂	21±4

Tableau III. 8 : Quantité de HA en surface des nanoparticules. Les particules ont été préparées selon le protocole décrit au par. III.1.2.2. avec [BSA] = 5 g/L dans la phase aqueuse interne et [HAC_n] = 0,5 g/L dans la phase aqueuse externe. (n = 5).

Dans le

Tableau III. 8, on constate que la quantité de HA modifié en surface des nanoparticules est très voisine que les nanoparticules soient recouvertes de HAC₆ ou de HAC₁₂. Notons que ce recouvrement permet aux nanoparticules de ne pas s'agréger lors de la lyophilisation du fait des répulsions entre les molécules de HA superficiel chargé négativement. Il permet aussi une redispersion des nanoparticules dans une solution de NaCl physiologique (0,15 M) ou dans des milieux de cultures cellulaires.

III.2.3. Résultats concernant les polysaccharides encapsulés

Nous avons tout d'abord étudié le comportement de nanoparticules contenant du HA ou de la CS et sans couverture de HA, au cours du traitement enzymatique de 72 h, utilisé pour le dosage des polysaccharides (cf par. II.3.).

La quantité de PA dosée dans le surnageant après 72 h est relativement faible soit :

- pour le HA environ 4±2 µg par mg de nanoparticules.
- Pour la CS environ 7±3 µg par mg de nanoparticules.

Puisqu'il n'y a pas de dégradation de la matrice de PLA, les quantités de PA ainsi mesurées correspondent donc à un léger relargage du PA pendant l'étape de traitement enzymatique.

Cette étape, considérée d'abord comme témoin négatif de l'expérience, a donc montré que les 72 h nécessaires au dosage enzymatique des polysaccharides encapsulés, sont suffisantes pour provoquer un léger relargage du PA. Au vu de ces résultats, nous avons donc décidé de procéder au dosage du PA encapsulé après hydrolyse totale de la matrice de PLA pour obtenir la masse totale de polysaccharides.

Dans le cas où on a encapsulé de l'héparine, le dosage de l'Hép encapsulée a été aussi réalisé après dégradation de la matrice.

*** Dosage du HA et de la CS :**

Le taux d'encapsulation en PA a été calculé après dégradation de la matrice des particules (voir le protocole décrit dans le par. II.3.2.), en utilisant une hydrolyse enzymatique suivie d'une analyse par ECZ-AI (cf par. II.3.3.4.).

Lorsque le PA encapsulé est le HA, ce dosage donne la masse totale de HA par mg de nanoparticules. Connaissant la masse de HA en surface, on peut alors calculer la quantité de HA encapsulé.

Afin de valider ce calcul, un lot de particules nues, sans HA en surface mais contenant un PA (lot B) a été préparé et analysé. Le lot A est constitué de nanoparticules recouvertes de HA et contenant un PA.

Les dosages ont été effectués selon le protocole décrit ci-dessous.

Pour chaque principe actif on prépare 2 lots de nanoparticules (lots A et B)

- à partir du lot A (particules recouvertes de HA et contenant du PA) préparées à partir de HAC₆ ou HAC₁₂

- 90 mg sont dispersés dans 9 mL de tampon acétate 20 mM pH 6
- 90 mg dans 9 mL d'une solution de NaOH concentrée (1M) afin d'hydrolyser la matrice PLA pendant 2 h à 25°C. Le pH de la solution est ensuite ajusté à 6 par quelques gouttes d'acide acétique concentré. Le tout est ramené à un volume de 12 mL par ajout de tampon acétate 20 mM pH 6

- à partir du lot B (particules nues contenant du PA) synthétisé avec le cholate de sodium (3g/L) dans la phase aqueuse externe.

- 115 mg dans 9 mL de tampon acétate
- 115 mg dans 9 mL d'une solution de NaOH 1 M afin d'hydrolyser la matrice PLA pendant 2 h à 25°C. Le reste du protocole est identique à celui du lot A

Lorsqu'il s'agit de doser le HA superficiel, la suspension de nanoparticules dans le tampon acétate est mise en contact avec la hyaluronidase lyase et traitée selon le protocole décrit dans le par. II.3.1.

Le dosage des PA encapsulés est réalisé après dégradation de la matrice de PLA, à l'aide de la hyaluronidase lyase ou la chondroïtine sulfate lyase, selon le protocole rappelé Chap.III par.II.3.2.

Avec ces différentes expériences, on dispose ainsi :

- de la masse de HA totale (en µg/mg de nanoparticules) si PA = HA pour le lot A.
- de la masse de HA encapsulé si PA = HA (lot B).
- de la masse de CS encapsulé si PA = CS (lot B).

Le dosage de la CS encapsulée dans des nanoparticules recouvertes de HA, met en jeu la chondroïtinase ABC après la dégradation de la matrice de PLA. Cette enzyme a la propriété de

lyser la CS qui ne donne qu'un seul pic en ECZ-AI et catalyse également l'hydrolyse du HA avec aussi un pic unique en ECZ-AI.

Cette propriété permet ainsi qu'on le voit sur la figure III.14, de caractériser à la fois la CS encapsulée et le HA en surface.

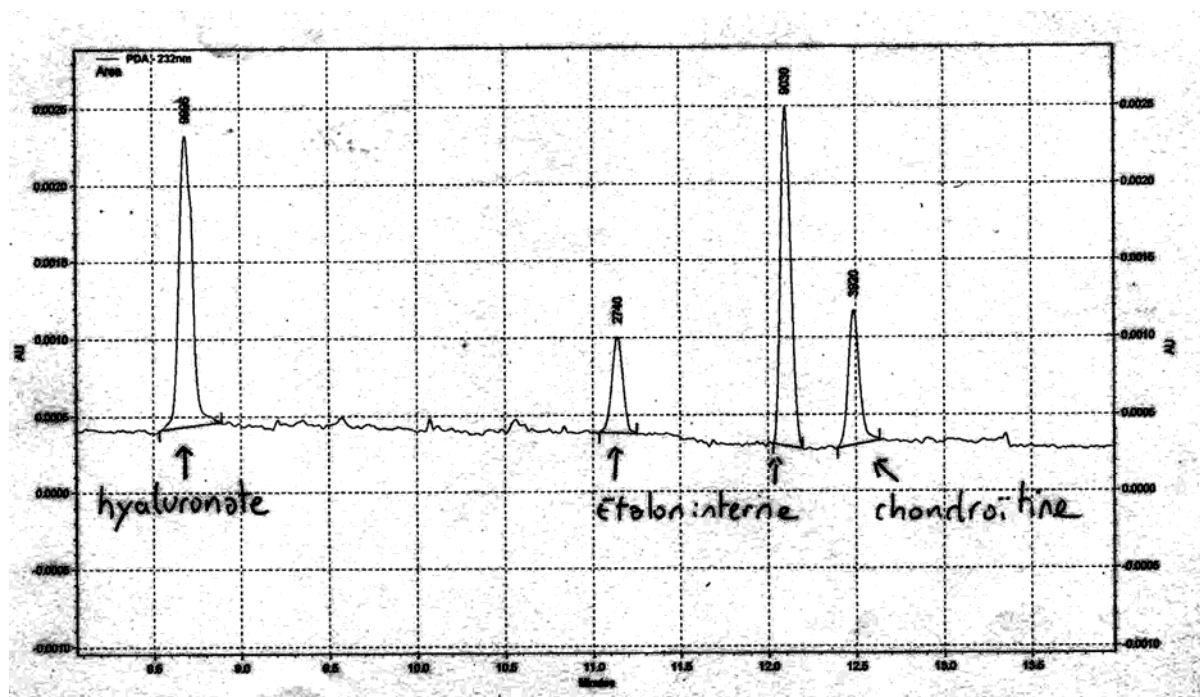


Figure III. 14 : Electrophorégramme d'un hydrolysât de nanoparticules recouvertes de HA et renfermant de la CS après traitement par la chondroïtine ABC.

Dans cet exemple, le HA peut être quantifié en établissant une gamme de HA hydrolysé par la chondroïtine sulfate lyase ABC.

Le Tableau III. 9 montre la quantité de principe actif encapsulé par les nanoparticules pour des lots de nanoparticules (lot A) synthétisés en utilisant du HAC₆ ou du HAC₁₂ comme tensioactif de l'émulsion secondaire.

Molécule encapsulée	Quantité encapsulée (µg/g de nanoparticules)
Hyaluronate	13±1
Chondroïtine sulfate	26±3

Tableau III. 9 : Quantité de principe actif encapsulé pour des nanoparticules préparées avec du HAC₆ ou du HAC₁₂ (n = 3).

On remarque que l'on a bien réussi à encapsuler la molécule bioactive dans tous les cas et que la nature du HA amphiphile utilisé dans l'émulsion secondaire n'a pas d'influence sur le taux d'encapsulation du PA.

Le taux d'encapsulation est très différent pour les 2 molécules encapsulées avec environ 13 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de nanoparticules pour le HA et 26 pour la CS. Les raisons de ces taux d'encapsulation variables selon le PA sont sans doute liées aux interactions BSA/PA lors de l'émulsion primaire. Ainsi, l'hypothèse qui peut être émise serait que la CS interagirait plus fortement avec la BSA que le HA. Cela peut s'expliquer par la présence sur la CS, de groupements sulfates ionisés à tout pH et fortement chargés négativement contrairement au HA qui ne possède que des fonctions carboxylates issues de fonctions acides faibles. Les interactions entre ces groupements anioniques et les fonctions chargées positivement de la BSA, peuvent expliquer que selon leur nombre et leur force on peut encapsuler plus de CS que de HA.

*** Dosage de l'héparine :**

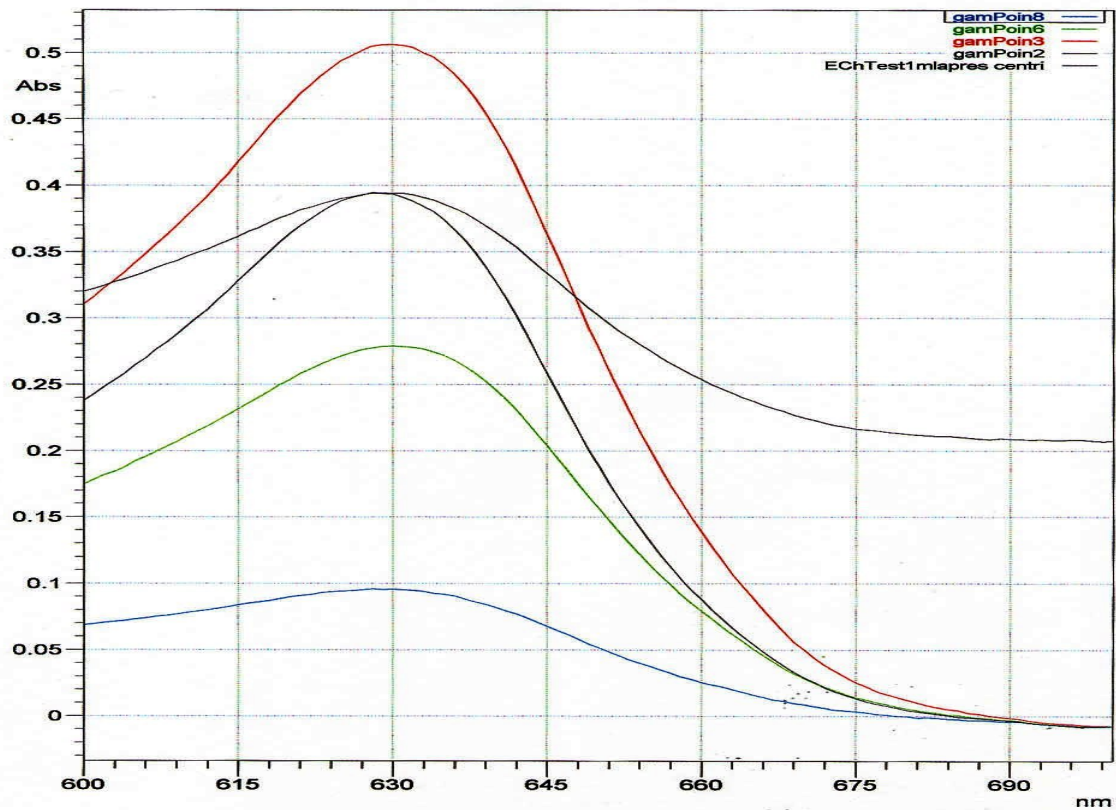
La dégradation de 115 mg de particules est réalisée à pH 10 par une solution de NaOH comme dans le cas du dosage du HA ou de la CS encapsulés. La solution résultante est amenée à pH=7 à l'aide d'une solution d'acide acétique concentré.

2 mL de cette solution sont prélevés et centrifugés à 8000 tr/min. L'héparine est dosée selon le protocole décrit dans le par. II.3.4. en utilisant la droite d'étalonnage de la Figure III. 9.

Le bleu de toluidine chargé positivement pouvant interagir également avec le HA (molécule polyanionique) qui se trouve en surface, les dosages d'Hép ont été effectués sur les particules nues (lot B).

Un exemple de spectre UV-Visible :

Les échantillons obtenus après hydrolyse de la matrice des nanoparticules présentent tous un spectre visible avec une ligne de base de 600 à 700 nm décalé vers le haut



(
Figure III. 15).

Des expériences sur des « blancs » ne contenant que l'hydrolysate de la matrice de PLA nanoparticulaire (même masse de nanoparticules vides que celle des particules contenant de l'Hép), ont montré que les spectres visibles avaient également ce décalage d'absorbance. On peut donc en conclure que celui-ci est provoqué par la présence de « microfragments » de PLA dans l'hydrolysate.

Pour le calcul de la quantité d'Hép encapsulée dans les nanoparticules, ce décalage (de l'ordre de 0,21 unités d'absorbance), a donc été soustrait des valeurs de l'absorbance à 631 nm obtenues pour les échantillons.

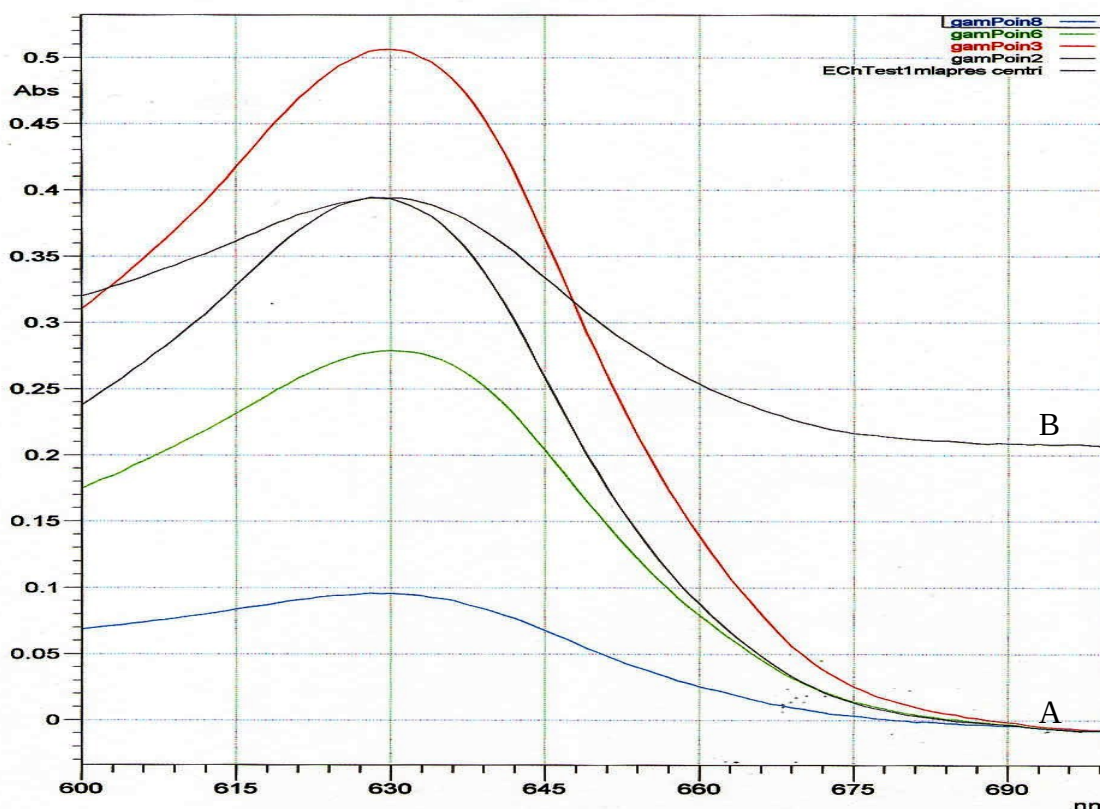


Figure III. 15 : Spectre visible du bleu de toluidine non complexé. A : gamme d'étalonnage du colorant pur. B : hydrolysate de nanoparticules nues contenant de l'Hép.

Pour les particules préparées avec de l'Hép à une concentration de 5 g/L dans la phase aqueuse interne de la double émulsion, la quantité de polysaccharide encapsulé a été trouvée égale à 9 ± 4 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de nanoparticules ($n = 6$).

III.3. ETUDE DE LA LIBERATION D'UNE MACROMOLECULE MODELE ENCAPSULEE

Pour étudier le relargage d'une molécule présente à l'intérieur des nanoparticules, nous avons encapsulé un polysaccharide fluorescent, à savoir du dextrane-FITC (FITC = fluorescéine isothiocyanate). La fluorescéine isothiocyanate est très utilisée dans ce type de manipulation soit directement en molécule détectable par fluorescence, soit en fixant le FITC à une molécule témoin car la synthèse de dérivés ainsi marqués est relativement facile [28, 29].

Dans le choix de la molécule modèle à encapsuler, nous avons tenu compte d'un certain nombre de propriétés :

- son hydrosolubilité car elle devait être encapsulée par le procédé de double émulsion/ évaporation de solvant.
- sa masse molaire car elle devait être du même ordre de grandeur que celle des PA (quelques centaines de milliers de g/mol).
- son marquage car il devait être suffisant pour assurer sa détection par fluorescence mais assez faible pour ne pas modifier les propriétés physico-chimiques de la molécule modèle.

C'est pourquoi, nous avons retenu le dextrane marqué au FITC (Sigma-Aldrich, France) d'une masse molaire d'environ 500 000 g/mol. Ce dextrane-FITC, hydrosoluble et contenant des groupes FITC en concentration suffisante pour servir de marqueur dans nos expériences (0,004 mol de FITC par mol de glucose) a été dissous dans la phase aqueuse interne de la double émulsion, à la place du HA, de la CS ou de l'Hép, à une concentration de 5g/L. Le dextrane-FITC est dosé par spectrofluorimétrie (spectromètre F-2000 Hitachi) en excitant la sonde fluorescente à 492 nm et en récupérant l'émission à 518 nm.

Afin de déterminer la quantité totale et le taux d'encapsulation en dextrane-FITC, trois lots de nanoparticules identiques ont été synthétisés selon le protocole de double émulsion/évaporation de solvant décrit précédemment. La taille de ces nanoparticules a été évaluée à 710 ± 15 nm c'est-à-dire du même ordre de grandeur que celle des nanosphères renfermant un PA.

Protocole de calcul du taux d'encapsulation:

Une synthèse classique de nanoparticules est effectuée par le procédé de double émulsion classique en dissolvant le dextrane-FITC dans la phase aqueuse de l'émulsion primaire. Après l'évaporation du solvant organique, les trois suspensions de nanoparticules sont directement centrifugées à 10 000 tr/min pendant 8 min. On récupère alors le surnageant que l'on dose par spectrophotomètre à fluorescence (F-2000, Hitachi). On dispose ainsi de la quantité de dextrane-FITC non encapsulée et donc par différence avec la quantité initiale on calcule celle qui a été encapsulée.

La masse de nanoparticules est déterminée en effectuant un extrait sec (évaporation de la suspension pendant 4 jours dans une étuve à 60°C) afin de pouvoir calculer la quantité de dextrane-FITC encapsulée par mg de nanoparticules.

Dans un cas le PVA a été utilisé comme stabilisant de l'émulsion secondaire de façon à préparer des nanoparticules renfermant du dextrane-FITC et recouvertes de PVA. Dans l'autre, c'est le HAC₆ qui a servi à stabiliser l'émulsion secondaire de façon à pouvoir disposer de particules renfermant du dextrane-FITC et recouvertes de HA.

Les résultats sont les suivants :

- dans le cas des nanoparticules recouvertes de PVA, la quantité de dextrane-FITC encapsulée est de $20,5 \pm 2$ μg par mg de nanoparticules, soit $63,0 \pm 3\%$ de la quantité initiale.
- dans le cas des nanoparticules recouvertes de HA, la quantité de dextrane-FITC encapsulée est de $22,0 \pm 1$ μg par mg de nanoparticules, soit $67,0 \pm 5\%$ de la quantité initiale.

Ainsi, dans les courbes de relargage du dextrane-FITC, la valeur 100% indiquée représente 20,5 μg de dextrane-FITC par mg de nanoparticules pour la couronne en PVA et 22 $\mu\text{g}/\text{mg}$ avec la couronne en HA.

Protocole du relargage :

Les nanoparticules renfermant du dextrane-FITC (100 mg) ont été mises en suspension dans 10 mL de tampon phosphate 0,02M pH 7, NaCl 0,15M, 37°C. L'observation s'est déroulée sur 20 jours et des prélèvements du surnageant (5 μL) redilués dans 995 μL dans le même tampon ont été effectués régulièrement. La quantité de dextrane-FITC a été mesurée en spectroscopie de fluorescence ($E_{EXMAX}=492$ nm, $E_{EMMAX}=518$ nm avec un spectrophotomètre à fluorescence F-2000, Hitachi).

Lots recouverts de HA :

La Figure III. 16 (A) donne le profil de la cinétique de libération du dextrane-FITC pour des lots de nanoparticules recouvertes de HA. Le 100% correspond à la masse totale de dextrane-FITC encapsulée soit 22 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de nanoparticules :

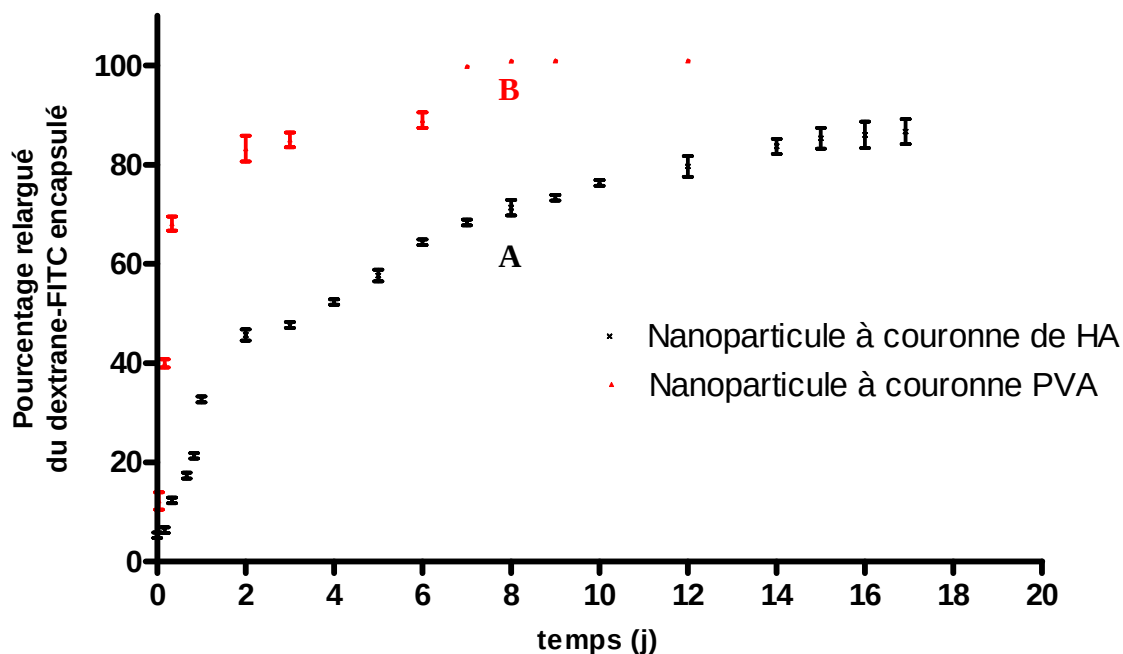


Figure III. 16 : Cinétique de libération (courbes cumulatives en pourcentage par rapport à la masse encapsulée dans les nanoparticules) du dextrane-FITC. Voir conditions expérimentales ci-dessus. (100%=22 μ g/mg de nanoparticules pour le lot recouvert de HA (A) et 20,5 μ g/mg de nanoparticules pour celui recouvert de PVA (B)).

Pour la courbe A, la libération est relativement rapide au cours de la première journée (25% du dextrane-FITC encapsulé) et ralentit ensuite (50% au bout de 5 jours). A partir du 5^{ème} jour, la libération est plus lente et atteint 80% après 20 jours.

Cependant on n'observe pas, comme cela est souvent le cas avec des micro- et nanoparticules, pour des polysaccharides ou des protéines encapsulés, un effet « burst » qui se traduit par un relargage important et très rapide de la molécule encapsulée, aux temps courts, comme on a pu le constater dans de nombreuses publications portant sur des nanovecteurs pharmacologiques [30, 31].

Le profil de libération du dextrane-FITC pour le lot recouvert de PVA (le 100% représente ici 20,5 μ g de dextrane-FITC par mg de nanoparticules), la Figure III. 16 (B) montre qu'il est au départ beaucoup plus rapide que celui correspondant à la couronne de HA. Ainsi, au bout de 48h, on atteint déjà 80% de dextrane-FITC relargué dans le milieu soit 30% de plus que le lot recouvert de HA. Ce lot atteint même très vite le plateau de relargage maximum soit 7 jours au lieu des 20 jours observés pour le lot recouvert de HA. De plus, le lot recouvert en PVA est totalement vide au 7^{ème} jour alors qu'à 20 jours, le lot recouvert de HA contient encore environ 10% de sa charge initiale. La nature du cœur de la nanoparticule (PLA), du PA encapsulé et de la taille des nanoparticules étant similaires, cette différence de relargage ne peut être expliquée que par la présence de la couronne des nanoparticules.

On peut envisager que le HA (polymère de haute masse molaire) forme une barrière beaucoup moins poreuse que celle formée par le PVA. Ainsi, pour un même PA, les mailles du filet formé par la couronne seraient beaucoup plus dures à franchir si la couronne est formée par le HA que par le PVA. Enfin, la conformation exacte du HAC₆ en surface n'est pas connue. La stabilisation de l'émulsion et la présence de HA en surface des nanoparticules démontrent ~~de~~ que des chaînes alkyle sont ancrées dans la matrice de PLA mais il est plus que probable que certaines chaînes alkyle statistiquement distribuées sur le squelette polymère soient libres voire orientées vers l'extérieur de la nanoparticule. Ainsi, on aurait des « microdomaines » hydrophobes qui ne permettraient pas au dextrane-FITC de diffuser de façon aisée vers le milieu aqueux externe.

La matrice nanoparticulaire est totalement détruite au bout de 60 jours dans le tampon phosphate PBS pH 7. Si la libération dans les premiers jours est vraisemblablement due à des processus de diffusion, il n'est pas exclu que la dégradation progressive de la particule contribue également au relargage du dextrane-FITC.

Il est clair que cette étude *in vitro* ne présage en rien de ce que sera la libération *in vivo* tant le milieu biologique est différent du tampon phosphate utilisé (0,02M phosphate de potassium, 0,15M de chlorure de sodium, pH=7) (présence de protéines, d'enzymes, de tensioactifs...). Cependant il était important de vérifier que la macromolécule polysaccharidique encapsulée pouvait être relarguée à partir des nanoparticules dans un milieu aqueux simple.

IV. CONCLUSION DU CHAPITRE

Dans ce chapitre, nous avons montré qu'il est possible de préparer des nanoparticules de PLA recouvertes de HA en utilisant un procédé de double émulsion/évaporation de solvant avec un HA amphiphile comme stabilisant de l'émulsion secondaire (HAC₆, HAC₁₂ et HAPhe). Nous avons également montré que des principes actifs polysaccharidiques (HA, chondroïtine sulfate et héparine) pouvaient être encapsulés en les dissolvant initialement dans la phase aqueuse de l'émulsion primaire.

Nous avons constaté que la synthèse de nanoparticules était reproductible en termes :

- de taille finale après évaporation de solvant ; le protocole de préparation des nanoparticules a été optimisé afin d'atteindre un diamètre moyen d'environ 700 nm après lyophilisation. Les nanoparticules sont alors conservées sous forme d'une poudre redispersable dans du NaCl 0,15 M (molarité physiologique) et dans des milieux de cultures cellulaires.
- de taux d'encapsulation ; les PA sont encapsulés de façon assez proche pour le HA, le dextrane-FITC et la CS (taux d'encapsulation respectivement de 13, 22 et 26 µg/mg de nanoparticules) et avec une bonne reproductibilité d'une synthèse à l'autre (écart type relativement faible). Le taux d'encapsulation de l'héparine est cependant légèrement plus faible car de l'ordre de 9 µg/mg de nanoparticules.
- de taux de recouvrement ; le taux de recouvrement est à peu près constant d'un lot à l'autre. Ni la nature du PA ni le type de modification des HA (C₆ ou C₁₂) ne modifient le taux de recouvrement en HA qui reste autour de 20-25 µg de HA/mg de nanoparticules.

Pour les nanoparticules recouvertes de HA, l'étude de la libération d'un polysaccharide modèle fluorescent, le dextrane-FITC (500 kg/mol), a montré que le relargage était étalé dans le temps avec des doses de dextrane-FITC régulièrement délivrées pendant une période assez longue de 16 jours au moins, et sans réel effet de libération importante (« burst effect ») aux temps courts. L'évaluation biologique a ensuite été réalisée *in vitro* sur des cellules cartilagineuses. Dans un premier temps, les différentes nanoparticules qui ont ainsi été étudiées, ont été préparées en utilisant du HAC₆ comme stabilisant de l'émulsion secondaire du procédé de préparation et en utilisant de la BSA dans la phase aqueuse interne.

Les différentes propriétés de ces particules de diamètre moyen de 700 nm, sont récapitulées ci-dessous :

- elles sont chargées en HA (13 µg/mg de nanoparticules) ou en dextrane-FITC (21µg/mg de nanoparticules). Les nanoparticules chargées en dextrane-FITC ont été utilisées pour leur aptitude à être détectées par des techniques physiques d'analyse basée sur la fluorescence,
- elles sont nues (synthèse avec le cholate de sodium comme stabilisant de l'émulsion secondaire), ou recouvertes de HA (de l'ordre de 23 µg/mg de nanoparticules) ou de poly(alcool vinylique) (PVA) polymère neutre, bio-inactif. Les nanoparticules recouvertes de PVA ont été synthétisées en vue d'étudier le comportement des nanoparticules avec les 2 types de recouvrement (HA et PVA).

Les conditions du procédé de synthèse des nanoparticules à cœur de PLA et recouvertes de HA font l'objet d'un brevet français déposé le 25-07-02 par le CNRS [32]. Des demandes d'extensions internationales ont été déposées par le CNRS le 25-07-03 [WO2004014347] et un projet d'achat de licence est en cours de négociation avec Bioibérica S.A. (Barcelone).

BIBLIOGRAPHIE

1. Giovagnoli S., Blasi P., Schoubben A., Rossi C. and Ricci M., *Preparation of large porous biodegradable microspheres by using a simple double-emulsion method for capreomycin sulfate pulmonary delivery*, Int J Pharm, 2007, **333**: p. 103-111.
2. Chognot D., Leonard M., Six J.L. and Dellacherie E., *Surfactive water-soluble copolymers for the preparation of controlled surface nanoparticles by double emulsion/solvent evaporation*, Colloids Surf B Biointerfaces, 2006, **51**: p. 86-92.
3. Ciombor D.M., Jaklenec A., Liu A.Z., Thanos C., Rahman N., Weston P., Aaron R. and Mathiowitz E., *Encapsulation of BSA using a modified W/O/O emulsion solvent removal method*, J Microencapsul, 2006, **23**: p. 183-194.
4. Griffiths P.C., Khayat Z., Tse S., Heenan R.K., King S.M. and Duncan R., *Studies on the mechanism of interaction of a bioresponsive endosomolytic polyamidoamine with interfaces. 1. Micelles as model surfaces*, Biomacromolecules, 2007, **8**: p. 1004-1012.
5. Li B., Zhao Y., Xu X., Zhou H., He B., Wu Z. and Zhang Z., *A simple method for the preparation of containing Sb nano- and microcrystallines via an ultrasound agitation*, Ultrason Sonochem, 2006, **14**: p. 557-562.
6. Li H., Guo Z. and Liu Y., *The application of power ultrasound to reaction crystallization*, Ultrason Sonochem, 2006, **13**: p. 359-363.
7. Arica Yegin B., Benoit J.P. and Lamprecht A., *Paclitaxel-loaded lipid nanoparticles prepared by solvent injection or ultrasound emulsification*, Drug Dev Ind Pharm, 2006, **32**: p. 1089-1094.
8. Cruz L., Schaffazick S.R., Dalla Costa T., Soares L.U., Mezzalira G., da Silveira N.P., Schapoval E.E., Pohlmann A.R. and Guterres S.S., *Physico-chemical characterization and in vivo evaluation of indomethacin ethyl ester-loaded nanocapsules by PCS, TEM, SAXS, interfacial alkaline hydrolysis and antiedematogenic activity*, J Nanosci Nanotechnol, 2006, **6**: p. 3154-3162.
9. Yegin B.A. and Lamprecht A., *Lipid nanocapsule size analysis by hydrodynamic chromatography and photon correlation spectroscopy*, Int J Pharm, 2006, **320**: p. 165-170.
10. Popot M.A., Bonnaire Y., Guechot J. and Toutain P.L., *Hyaluronan in horses: physiological production rate, plasma and synovial fluid concentrations in control conditions and following sodium hyaluronate administration*, Equine Vet J, 2004, **36**: p. 482-487.
11. Lindenhayn K., Heilmann H., Niederhausen T., Walther H.U. and Pohlenz K., *Elimination of tritium-labelled hyaluronic acid from normal and osteoarthritic rabbit knee joints*, Eur J Clin Chem Clin Biochem, 1997, **35**: p. 355-363.
12. Price K.N., Al Tuinman K., Baker D.C., Chisena C. and Cysyk R.L., *Isolation and characterization by electrospray-ionization mass spectrometry and high-performance anion-exchange chromatography of oligosaccharides derived from hyaluronic acid by hyaluronate lyase digestion: observation of some heretofore unobserved oligosaccharides that contain an odd number of units*, Carbohydr Res, 1997, **303**: p. 303-311.
13. Prebyl B.S., Kaczmarek C., Tuinman A.A. and Baker D.C., *Characterizing the electrospray-ionization mass spectral fragmentation pattern of enzymatically derived hyaluronic acid oligomers*, Carbohydr Res, 2003, **338**: p. 1381-1387.

14. Prieto J.G., Pulido M.M., Zapico J., Molina A.J., Gimeno M., Coronel P. and Alvarez A.I., *Comparative study of hyaluronic derivatives: rheological behaviour, mechanical and chemical degradation*, Int J Biol Macromol, 2005, **35**: p. 63-69.
15. Payan E., Presle N., Lapique F., Jouzeau J.Y., Bordji K., Oerther S., Miralles G., Mainard D. and Netter P., *Separation and quantification by ion-association capillary zone electrophoresis of unsaturated disaccharide units of chondroitin sulfates and oligosaccharides derived from hyaluronan*, Anal Chem, 1998, **70**: p. 4780-4786.
16. Ponnuraj K. and Jedrzejewski M.J., *Mechanism of hyaluronan binding and degradation: structure of Streptococcus pneumoniae hyaluronate lyase in complex with hyaluronic acid disaccharide at 1.7 Å resolution*, J Mol Biol, 2000, **299**: p. 885-895.
17. Yamagata T., Saito H., Habuchi O. and Suzuki S., *Purification and properties of bacterial chondroitinases and chondrosulfatases*, J Biol Chem, 1968, **243**: p. 1523-35.
18. Linhardt R.J., Galliher P.M. and Cooney C.L., *Polysaccharide lyases*, Appl Biochem Biotechnol, 1986, **12**: p. 135-176.
19. Jorgenson J.W. and Lukacs K.D., *Free-zone electrophoresis in glass capillaries*, Clin Chem, 1981, **27**: p. 1551-1553.
20. Macintosh F.C., *A colorimetric method for the standardization of heparin preparations*, Biochem J, 1941, **35**: p. 776-782.
21. Smith P. K., Mallia A.K., Hermanson G. T., *Colorimetric method for the assay of heparin content in immobilized heparin preparations*, Anal Biochem, 1980, **109**: p. 466-473.
22. Lii C.Y., Chen C.H., Yeh A.I. and Lai V.M.F., *Preliminary study on the degradation kinetics of agarose and carrageenans by ultrasound*, Food Hydrocolloids, 1999, **13**: p. 477-481.
23. Lagoueyte N. and Paquin P., *Effects of microfluidization on the functional properties of xanthan gum*, Food Hydrocolloids, 1998, **12**: p. 365-371.
24. Gaucher G., Poreba M., Ravenelle F. and Leroux J.C., *Poly(N-vinyl-pyrrolidone)-block-poly(D,L-lactide) as polymeric emulsifier for the preparation of biodegradable nanoparticles*, J Pharm Sci, 2007, **96**: p. 1763-1775.
25. Chognot D., *Nanosphères de PLA/POE: nouveau procédé d'élaboration, caractérisation et encapsulation de la protéine C*, Thèse de l'Institut nationale polytechnique lorraine, Nancy, 2003.
26. Bala I. B.V., Hariharan S., Kharade S.V., Roy N. and Ravi Kumar M.N., *Sustained release nanoparticulate formulation containing antioxidant-ellagic acid as potential prophylaxis system for oral administration.*, J Drug Target., 2006, **14**: p. 27-34.
27. Sonaje K., Italia J.L., Sharma G., Bhardwaj V., Tikoo K. and Kumar M.N., *Development of biodegradable nanoparticles for oral delivery of ellagic acid and evaluation of their antioxidant efficacy against cyclosporine A-induced nephrotoxicity in rats*, Pharm Res, 2007, **24**: p. 899-908.
28. Liu Y., Miyoshi H. and Nakamura M., *Novel drug delivery system of hollow mesoporous silica nanocapsules with thin shells: Preparation and fluorescein isothiocyanate (FITC) release kinetics*, Colloids Surf B Biointerfaces, 2007, **58**: p. 180-187.
29. Kim J.H., Lee S., Kim K., Jeon H., Park R.W., Kim I.S., Choi K. and Kwon I.C., *Polymeric nanoparticles for protein kinase activity*, Chem Commun (Camb), 2007: p. 1346-1348.
30. Panyam J., Dali M.M., Sahoo S.K., Ma W., Chakravarthi S.S., Amidon G.L., Levy R.J. and Labhasetwar V., *Polymer degradation and in vitro release of a model protein from poly(D,L-lactide-co-glycolide) nano- and microparticles*, J Control Release, 2003, **92**: p. 173-187.

31. Hedberg E.L., Shih C.K., Solchaga L.A., Caplan A.I. and Mikos A.G., *Controlled release of hyaluronan oligomers from biodegradable polymeric microparticle carriers*, J Control Release, 2004, **100**: p. 257-266.
32. Dellacherie E., Léonard M., Gref R., Payan E. and Netter P., *Particules revêtues en surface de hyaluronane ou d'un de ses dérivés et leur utilisation à titre de vecteurs biologiques pour des matières actives*, 2003, FR2842737: France.

CHAPITRE IV :
EVALUATION
BIOLOGIQUE
DES
NANOPARTICULES

CHAPITRE IV : EVALUATION BIOLOGIQUE DES NANOPARTICULES

Lors de l'établissement d'un biomatériau, après l'avoir complètement caractérisé sur le plan physico-chimique, des tests complets *in vitro* doivent être mis en œuvre afin de démontrer la biocompatibilité ainsi que l'absence d'effets délétères (inflammatoire, cytotoxique) vis à vis des différents types cellulaires qui peuvent entrer en contact avec.

Ces éventuels problèmes induits par le contact de nanoparticules avec les cellules peuvent être dus non seulement à la nature de ces biomatériaux (forme, taille, composition...), mais aussi au processus de synthèse de celui-ci (processus de lyophilisation, séchage, solvants utilisés, contamination bactérienne...).

Dans ce chapitre, il est proposé d'examiner plus particulièrement l'effet des nanoparticules sur les cellules articulaires de trois manières :

- Cytocompatibilité : étude de la viabilité cellulaire lors de différentes conditions (concentrations, type cellulaire) et de différents temps de contact entre les cellules du cartilage et les différents lots de nanoparticules.
- Inflammation : analyse en PCRq de l'expression des gènes de l'inflammation suite aux contacts entre les cellules et les nanoparticules.
- Synthèse matricielle : analyse en PCRq de l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse matricielle du cartilage suite aux contacts entre les cellules et les nanoparticules.

Ces études seront effectuées sur différents lots de nanoparticules synthétisées (recouvrement et molécule encapsulée différentes), différentes concentrations de nanoparticules et avec deux types de cellules articulaires (synoviocytes et chondrocytes).

Le mode d'interaction des nanoparticules avec les cellules et leur devenir après interaction sera aussi abordé dans de ce chapitre. Une molécule hydrosoluble marquée (dans le but de pouvoir être visualisée en microscopie de fluorescence), le dextrane-FITC, a alors été encapsulée afin de pouvoir suivre la localisation des nanoparticules suite à la mise en contact avec les cellules. Ces observations seront effectuées par microscopie confocale fluorescence.

Enfin, les premiers essais *in vivo* seront entrepris sur des rats sains, après injections intraarticulaires bilatérales. Suite à ces injections, différents paramètres comme la cytocompatibilité, l'expression de certains médiateurs de la réponse inflammatoire mais également la synthèse matricielle (explants rotuliens) ont été étudiés.

I. Evaluation in vitro des nanoparticules sur des cellules articulaires de rat :

I.1. MATERIELS ET METHODES

I.1.1. Définition des différents types de lots de nanoparticules testés :

Lots synthétisés pour les tests biologiques :

Lors d'une étude préliminaire, sept lots de nanoparticules avaient été synthétisés afin de d'effectuer une étude de cytocompatibilité (MTT). L'utilisation de ces lots doit explorer les effets du procédé de fabrication des nanoparticules sur la compatibilité des nanoparticules vis-à-vis des cellules.

1) Lot n°1 :

Phase aqueuse interne : BSA (50 g/L) et HA (5g/L) dilué dans l'eau milliQ

Phase aqueuse externe : HAC6 à 0,5 g/L dans l'eau milliQ

2) Lot n°2 :

Phase aqueuse interne : BSA (50 g/L) et HA (5g/L) dilué dans NaCl 0,15M

Phase aqueuse externe : HAC12 à 0,5 g/L dans l'eau milliQ

3) Lot n°3 :

Phase aqueuse interne : BSA (50 g/L) et Dextran-FITC ($M_w=500$ kDa) (5g/L) dilué dans l'eau milliQ

Phase aqueuse externe : HAC12 à 0,5 g/L dans l'eau milliQ

4) Lot n°4 :

Phase aqueuse interne : BSA (50 g/L) et Glucosamine (5g/L) dilué dans l'eau milliQ

Phase aqueuse externe : HAC12 à 0,5 g/L dans l'eau milliQ

5) Lot n°5 :

Phase aqueuse interne : BSA (50 g/L) et HA (5g/L) dilué dans l'eau milliQ

Phase aqueuse externe : HAC12 à 0,5 g/L dans l'eau milliQ

Lyophilisation avec adjuvant tréhalose (2g/L)

6) Lot n°6 :

Phase aqueuse interne : BSA (50 g/L) et HA (5g/L) dilué dans l'eau milliQ

Phase aqueuse externe : HAC12 0,5 g/L dans l'eau milliQ

7) lot n°7 :

Phase aqueuse interne : BSA (50 g/L) et HA (5g/L) dilué dans NaCl 0,15M

Phase aqueuse externe : HAC6 à 0,5 g/L dans l'eau milliQ.

Suite à des tests préliminaires sur les sept lots de nanoparticules précédents, nous en avons sélectionné trois sur lesquels une étude plus complète a été effectuée. Les caractéristiques de ces trois lots de nanoparticules sont détaillées dans le Tableau IV. 1 :

	Spécification des nanoparticules	
	En surface	Encapsulé
Lot 1	HAC6	HA natif
Lot 2	HAC6	Dextrane-FITC
Lot 3	PVA	Dextrane-FITC

Tableau IV. 1 : Caractéristiques des lots de nanoparticules, utilisés lors des expériences *in vitro* et *in vivo*.

Ces lots sont ensuite soumis à une stérilisation aux ultra-violets, sous hotte à une longueur d'onde de 290 nm pendant 10 minutes afin qu'ils puissent être mis en contact avec les cellules.

I.1.2. Biologie cellulaire.

I.1.2.1. Culture cellulaire de chondrocytes

Les chondrocytes sont préparés à partir de cartilage articulaire de rats sains. Le cartilage est prélevé au niveau de l'épiphyse des têtes fémorales. Il est lavé trois fois avec une solution de NaCl 0,9 % (B.Braun, Boulogne, France) supplémenté en pénicilline et en streptomycine (10 mg/ml) (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) puis soumis à une digestion par une solution de pronase (2 mg/ml) (Sigma) dans du NaCl 0,9 % durant deux heures à 37 °C sous 5 % de CO₂. Après trois rinçages par du NaCl 0,9 %, le cartilage est soumis à une deuxième digestion par une solution de collagénase B (1,5 mg/ml) (Roche) pendant une nuit à 37 °C sous 5 % de CO₂. La collagénase permet la libération des chondrocytes. Elle est reconstituée dans du milieu de culture DMEM/F12 (Invitrogen) supplémenté à 1 % en pénicilline et en streptomycine. Les solutions sont filtrées sur filtre de 0,22 µm de diamètre afin de les

stériliser. Cette suspension est ensuite prélevée et centrifugée à 250 g pendant 8 minutes. Le culot est récupéré et mis en culture dans des flasques de 75 cm² contenant du milieu complet (DMEM/F12 supplémenté par 2 mM de L-glutamine (Invitrogen), 100 U/mL de pénicilline et 100 µg/mL streptomycine) contenant 10 % de SVF (sérum de veau fœtal) décomplémenté.

1.1.2.2. Culture cellulaire de synoviocytes

Les synoviocytes sont récupérés à partir de membranes synoviales de genoux de rats sains. Les membranes synoviales sont incubées dans une solution de collagénase/dispase (0,1 U/mL et 0,8 U/mL, Roche) pendant toute une nuit. Les suspensions sont ensuite prélevées et centrifugées à 250 g pendant huit minutes. Le culot cellulaire est récupéré et mis en culture dans des flasques de 75 cm² avec du milieu complet à 10 % de SVF. Les cultures sont maintenues dans un incubateur à 37 °C en atmosphère humide contenant 5% de CO₂.

1.1.2.3. Entretien des cellules

Les cellules se multiplient et sont transférées dans de nouveaux flacons une fois à confluence. Lors de nos tests, nous avons utilisé des chondrocytes en 1^{er} passage et des synoviocytes en 3^{ème} passage pour limiter la dédifférenciation de ces cellules. Pour chaque passage, les cellules à confluence sont lavées avec du PBS (Invitrogen) et récupérées suite à l'action de 2,5 mL de trypsine (Invitrogen) pendant cinq minutes à 37°C et une neutralisation par du milieu complet. La suspension de cellules est centrifugée, puis le culot cellulaire est repris dans du milieu complet. Un comptage sur cellule de Malassez est réalisé afin de déterminer le nombre de cellule en vue de leur utilisation.

1.1.2.4. Culture en système tridimensionnel (billes d'alginate)

L'alginate (AA) en poudre (moyenne viscosité issu de *Macrocystis pyrifera*, Sigma Aldrich, France) est préalablement autoclavé à 120°C pendant 20 minutes avec un barreau magnétique dans des tubes en pyrex. La solution d'alginate à 20 g/L est alors réalisée par ajout de NaCl 0,9% stérile (Braun, France). Il est nécessaire de mettre cette solution à agiter plusieurs heures pour avoir un hydrogel bien homogène. Le culot cellulaire est mélangé avec la solution alginique à raison de 3 millions de cellules par millilitre de polymère. Cette suspension cellulaire est prélevée à l'aide d'une seringue stérile (Terumo, Leuven, Belgique).

Les billes sont obtenues en faisant tomber le mélange polymère-cellules goutte à goutte à travers une aiguille de 18G (Terumo, Leuven, Belgique) dans une solution de CaCl₂ à 102

mM (Sigma Aldrich, France). Les billes se forment par réticulation de l'alginate au contact des ions Ca^{2+} selon le modèle « boîte à œufs » (Figure IV. 1).

Les billes sont incubées 10 minutes dans du CaCl_2 (102 mM), temps nécessaire à une réticulation suffisante, puis sont rincées 3 fois pendant 5 min dans du sérum physiologique puis une fois avec le milieu de culture (DMEM FIX12, GibcoBRL, France) supplémenté de 10 % (v/v) SVF, 3 mM CaCl_2 (Sigma Aldrich, France), 1 % (v/v) de pénicilline-streptomycine et 0,1 % (v/v) d'amphotéricine B). Les billes sont alors cultivées à 37°C dans le milieu de culture. Des billes « blanches », c'est-à-dire des billes sans cellules sont réalisées dans les mêmes conditions à titre de référence. Enfin, les billes avec ou sans cellule sont cultivées en incubateur à 37 °C sous 5 % de CO_2 dans 10 ml de milieu complet supplémenté avec 1 mM de CaCl_2 (Sigma)

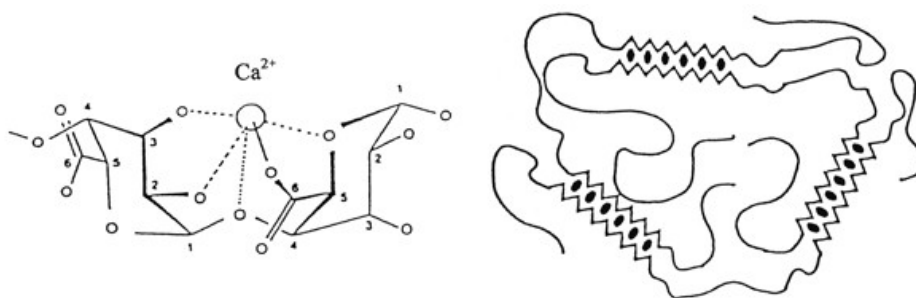


Figure IV. 1 : A gauche : Chélation des résidus guluronates de l'alginate par le calcium, à droite : représentation schématique du model « boîte à œufs »

Les billes sont réparties à raison de 50 billes par boites e pétrit dans 25 mL de milieu. Celui-ci est changé trois fois par semaine. Un milieu sans rouge de phénol est utilisé afin de s'affranchir des interactions de ce composé avec les méthodes analytiques utilisées, en particulier en électrophorèse capillaire.

A la fin des différents temps de l'étude, les cellules sont récupérées en solubilisant le biomatériau alginique. Pour se faire, les billes sont solubilisées pendant 5 minutes à 37 °C dans une solution de Citrate-EDTA à pH 6.8 (Citrate de sodium tribasique 55mM (Sigma) ; EDTA 50 mM (Sigma)). L'ensemble est centrifugé par un pulse, puis lavé 5 fois dans du PBS. Le culot final est congelé à sec à -80°C.

I.1.3. Biocompatibilité - Cytocompatibilité (LDH et MTT)

La cytotocompatibilité des 7 lots synthétisés préalablement et des trois lots sélectionnés par la suite est testée par deux test : le test MTT et le test LDH. Les variables expérimentales définies étant :

- La concentration en nanoparticules variant de façon croissante soit 50, 75 et 100 µg de nanoparticules sèches par ml de milieu complet DMEM sans rouge de phénol.
- Le temps de contact entre les nanoparticules et les cellules en monocouche variant de 24, 48 et 72h dans un incubateur à 37°C.
- Les types cellulaires du cartilage (chondrocytes ou synoviocytes) et la morphologie même des nanoparticules (7 lots différents spécifiés plus haut).

Lors de l'étude en monocouche, ces test de cytotocompatibilité sont effectués directement sur des cellules cultivés en plaques 96 puits sur lesquelles on dépose les différents concentrations en nanoparticules.

Pour l'étude en bille d'alginate, un temps de contact de 24h entre cellules et nanoparticules en monocouche est préalablement effectué. Puis le tout est incorporé dans la solution alginique et mise en bille par réticulation calcique.

Les résultats sont donnés sous forme d'histogramme où la viabilité de chaque échantillon est rapportée par rapport aux cellules témoins. Ces cellules témoins représente la valeur 100% de notre étude car cultivées dans du milieu DMEM sans nanoparticules.

I.1.3.1. Test MTT

Le test MTT (bromure de 3-[4, 5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tétrazolium) est une méthode colorimétrique utilisée pour évaluer la viabilité cellulaire. Ce test repose sur la réduction du MTT par la succinate déshydrogénase mitochondriale conduisant à la formation de cristaux bleus de formazan. La diminution de cette activité est directement liée à l'apparition d'une toxicité.

Le test MTT se déroule identiquement que les cellules soient en bille ou en monocouche. Pour l'étude en monocouche, les cellules sont directement cultivées en plaques 96 puits alors que pour l'étude tridimensionnelle, les billes avec et sans cellules sont déposées en plaque 96 puits à raison d'une bille par puits.

La suite est commune aux deux études, les cellules en monocouche ou les cellules en billes sont cultivées avec 100 µL de milieu de culture supplémentés de 25 µL de MTT (5 mg/mL

dans du PBS 1x) à 37°C sous 5% de CO₂ durant 4 heures avant de remplacer ce milieu par 100 µL de tampon de lyse SDS/DMF (80 g de SDS, 200 ml de DMF (diméthylformamide), 200 mL d'eau distillée, pH 4.7 avec HCl 1 N). La densité optique (DO) est déterminée sur un spectrophotomètre Thermo Labsystems Multiskan EX à 580 nm, 24 heures après l'ajout du mélange SDS-DMF (temps de solubilisation des cristaux de formazan).

1.1.3.2. Test LDH :

Principe : Mesure de l'activité dépendante de la lactate déshydrogénase :

La mesure de l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) présente dans le surnageant de culture est réalisée à l'aide d'un kit (« cytotoxicity detection kit », Roche).

La méthode est basée sur la réduction du NAD en NADH,H⁺, suite à la transformation par la LDH du lactate en pyruvate. La diaphorase transfère alors le H⁺ du NADH sur le sel de tétrazolium (chlorure de 2-[4-iodophényl]-5-phényltétrazolium) qui sera réduit en sel de formazan. L'augmentation de l'activité LDH est directement corrélée avec la formation de formazan. Ainsi, la coloration rouge qui se forme est proportionnelle au nombre de cellules dont la membrane cytoplasmique est altérée.

Le surnageant de culture (100 µl) est mélangé avec 100 µl d'une solution contenant du NAD⁺, du sel de tétrazolium et du lactate de sodium. L'ensemble est incubé 10 min à l'obscurité. La réaction est ensuite arrêtée par 50 µl de chlorure d'hydrogène (1N) et l'absorbance est lue à 490 nm (lecteur de plaques MR 5000 Dynatech, Guyancourt, France).

1.1.3.3. Biosynthèse des protéoglycanes par incorporation de ³⁵S :

Cette technique permet d'évaluer la synthèse de protéoglycanes (PGs) par mesure de l'incorporation de soufre radioactif (³⁵Na₂SO₄²⁻) (Perkin Elmer) durant leur biosynthèse dans les cellules. Pendant 4 h, les billes sont placées dans des plaques 24 puits, avec du milieu de culture contenant 10 µCi/ml de ³⁵S à 37°C. Les billes sont lavées 5 fois dans 2 ml de NaCl 0,9 % + 3 mM CaCl₂. Les billes sont ensuite dissoutes dans 500 µl de Citrate - EDTA sur la nuit à température ambiante. Après ajout de 4,5 ml de scintillant (Ultima Gold, Perkin Elmer), le

comptage de chaque échantillon de 5 billes a lieu sur un analyseur de scintillation liquide (Tri-Carb 2100 TR, Packard).

1.1.3.4. Dosage du DNA

Le Hoechst (Hoechst 33258, Molecular Probes) est un agent fluorescent intercalant de l'ADN. Sa quantification permet de nous informer sur le nombre de cellules contenues dans chaque bille et donc de la prolifération cellulaire au sein des biomatériaux. Le réactif de Hoechst est solubilisé à 0,1 µg/ml dans un tampon tris 10 mM-1 mM EDTA - 0,1 M de NaCl à pH 7.4. Une gamme étalon de 0 à 0,5 µg/ml est établie à partir d'ADN de thymus de veau (Sigma). Les culots cellulaires, obtenus à partir de 3 billes, sont repris dans 100 µl de tampon. Les échantillons sont placés trois fois dans de l'azote liquide puis dans un bain-marie à 37 °C. Deux millilitres de solution de Hoechst sont ajoutés à chaque échantillon. Le dosage est effectué à une longueur d'onde d'excitation de 356 nm et une longueur d'onde d'émission de 458 nm sur un spectrofluorimètre (Hitachi F-2000, France). Le nombre de cellules est calculé à partir de la quantité d'ADN dosé en utilisant la correspondance suivante : 7,8 pg ADN/chondrocyte.

1.1.3.5. Immunofluorescence

Les cellules sont cultivées sur lamelles de verre 12 mm, à une densité de 50 000 cellules par puits dans du milieu complet pendant 24-48 heures. Puis les cellules sont incubées avec les nanoparticules contenant du Dextran-FITC (100 µg/ml) pendant 6h, 12h et 24 heures. Ensuite, les cellules sont fixées avec une solution de PAF 4% pendant 15 min à température ambiante. Lors des expériences de compétition avec le récepteur de l'acide hyaluronique (CD44), les cellules sont au préalable incubées avec une solution d'anticorps (5 µg/ml) pendant 2 heures puis incubées avec les différents lots de nanoparticules (50 µg/ml). Pour terminer, le protocole décrit précédemment pour l'immuno-localisation des nanoparticules contenant du FITC est utilisé.

1.1.3.6. Microscopie confocale

Les images en microscopie confocale et les spectres d'émission ont été réalisés à l'aide d'un microscope confocale à balayage laser SP2, dépourvu de filtre (Leica microsystems, France), équipé de lasers argon (raies 457 nm, 476 nm, 488 nm, 514 nm) et Hélium-Néon (543 nm et 633 nm) et d'un objectif à immersion huile corrigé x63 (HCX PL

APO CS 63.0 x 1.32, code 506180 Leica). Le signal d'émission de fluorescence est recueilli de manière optimisée, pour chaque canal, après décomposition de la lumière de fluorescence sur un prisme (AOBS - Acoustical Optical Beam Splitter), et sélection d'une bande passante spécifique (FITC XX nm).

I.1.4. Biologie Moléculaire

I.1.4.1. Extraction des ARN totaux

i) Cellules en monocouche

Après décongélation des cellules à température ambiante, l'extraction des ARN s'effectue grâce au kit RNeasy (Qiagen). Les cellules sont récupérées dans 350 µL de tampon RLT additionné de β-mercaptoéthanol à 10 µl/ml (Sigma). Cette étape permet de lyser les membranes cellulaires et de libérer le contenu des cellules en acides nucléiques. 350 µL d'éthanol à 70 % est alors ajouté et le mélange est déposé sur la colonne d'extraction d'ARN. Les ARN totaux retenus sur la membrane de silice sont alors lavés à l'aide de différents tampons fournis dans le kit, une fois au RW1 (700 µL) et deux fois avec du RPE (500 µL). L'élution est alors réalisée avec 50 µL d'eau exempte de nucléases.

La membrane de silice qui compose les colonnes du kit RNeasy permet de séparer assez spécifiquement les ARN totaux de l'ADN plasmidique et génomique, mais afin de s'affranchir d'une quelconque contamination d'ADN, les ARN issus de cellules transfectées sont traités à la DNase (RNase free DNase Set, Qiagen). Nous avons donc effectué une étape supplémentaire pendant l'extraction d'ARN après le passage du mélange contenant les acides nucléiques et l'éthanol sur colonne. Après un premier lavage au RW1, les ARN totaux contenus sur la membrane ont été mis en présence de 35 µl de tampon RDD contenant la DNase à 1 U/µl pendant dix minutes, puis la membrane est à nouveau lavée avec du RW1 avant d'être traitée selon le protocole exposé préalablement.

ii) Cellules cultivées en billes d'alginate

Aux différents temps, les billes sont prélevées et solubilisées pendant 5 minutes à 37 °C dans une solution de Citrate-EDTA à pH 6.8 (Citrate de sodium tribasique 55mM; EDTA 50 mM) (Sigma). L'ensemble est centrifugé par un pulse (13 000 rpm), puis lavé 5 fois dans une solution PBS 1X. Le surnageant est éliminé et le culot final est congelé à sec à -80 °C.

1.1.4.2. Vérification de l'intégrité des ARN totaux

i) Dosage spectrophotométrique

Ce dosage permettra d'effectuer l'étape de transcription inverse à partir de la même quantité d'ARN totaux dans tous les échantillons. La quantité d'ARN est mesurée par spectrophotométrie à 260 nm. La concentration en ARN est donnée par la formule suivante : $[ARN] = A_{260} \times 1/D \times 40 \mu\text{g/ml}$, où D = facteur de dilution de l'échantillon.

Parallèlement, le rapport A260/A280 doit être compris entre 1,8 et 2 pour vérifier la pureté de nos extraits d'ARN vis-à-vis des protéines.

ii) Migration sur gel d'agarose

Afin de vérifier que les ARN récupérés ne sont pas dégradés, on effectue une migration sur gel d'agarose 1 %. Les dépôts sont composés de 2 μl d'extrait d'ARN additionnés de 5 μl de bleu de charge. Un agent intercalant des acides nucléiques, le BEt (Bromure d'Ethidium, Eurobio) est ajouté au gel d'agarose. Il permet de révéler les bandes sous UV. Les extraits d'ARN dégradés donnent sur gel une traînée diffuse, alors que s'ils ne le sont pas, nous pouvons observer deux bandes distinctes qui correspondent aux ARN majoritaires, 18 S et 28 S.

1.1.4.3. Transcription inverse (M-MLV)

Cette réaction permet d'obtenir un ADN simple brin complémentaire (ADNc) à l'aide d'une amorce poly-dT et d'une enzyme, la transcriptase inverse MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus / Invitrogen). Cette enzyme présente une activité ADN polymérase ARN dépendante ainsi qu'une activité exoribonucléasique hybride dépendante permettant la dégradation des ARN contenus dans les hybrides ADN-ARN.

L'ADNc est obtenu à partir d'une quantité d'ARN, entre 500 ng et 1 μg (la quantité d'ARN est différente selon les manipulations, elle dépend de l'extraction d'ARN réalisée auparavant), en utilisant des amorces se fixant sur la partie poly-Adénylée des ARN messagers (ARNm). Suite au dosage des ARN, il faut réaliser différentes dilutions afin que nos échantillons aient tous la même concentration. Le mélange réactionnel contient 11 μl de solution d'ARN et 9 μL de tampon réactionnel. Ce tampon est composé de 4 μl de tampon de RT, de 2 μl de DTT, de 1 μl de dNTP, 1 μl d'oligodT, 1 μl de transcriptase inverse. La réaction de transcription inverse se déroule pendant une heure à 37 °C. Les ARN restants sont dénaturés par la chaleur (durant cinq minutes à 95 °C).

1.1.4.4. PCR quantitative en temps réel

i) Principe

L'étude de l'expression des gènes est réalisée en biologie moléculaire à l'aide d'une technique, imaginée par K Mullis en 1985, appelée PCR (Polymerase Chain Reaction) pour amplification en chaîne de l'ADN par une polymérase. Cette technique permet d'obtenir à partir d'un échantillon, d'importantes quantités d'un fragment d'ADN spécifique et de longueur définie. Pour cela il est nécessaire, à partir de l'échantillon, d'extraire les ARN totaux des cellules et de les rétrotranscrire (RT) en ADN complémentaire (ADNc).

Cet ADN complémentaire va servir de matrice à la technique de PCR pour connaître l'expression des gènes à étudier à l'aide d'amorces spécifiques. Pour chaque gène étudié, il est possible de déterminer quantitativement (PCR quantitative en temps réel) ou semi-quantitativement (PCR classique ou semi-quantitative) le taux d'expression de ce gène dans la cellule.

La réaction de PCR se déroule en trois étapes : dénaturation, hybridation et élongation (Figure IV. 2). Elle nécessite, en plus de l'ADNc, la présence d'amorces spécifiques du gène à étudier, d'oligonucléotides qui vont servir à la synthèse des brins complémentaires, d'une Taq polymérase thermostable qui va synthétiser les brins complémentaires et de tampon contenant du $MgCl_2$ pour stabiliser la réaction.

Dans un premier temps, les brins d'ADNc (ADN complémentaire) sont dénaturés à 95°C, ce qui entraîne une séparation des deux brins d'ADN, puis les amorces oligonucléotidiques spécifiques vont se fixer sur les brins d'ADN, c'est l'étape d'hybridation.

Enfin, l'élongation des amorces a lieu à 72°C, la Taq-polymérase synthétisant le brin complémentaire après la séquence d'hybridation, côté 3'. Ces cycles sont répétés en général une quarantaine de fois et la quantité d'ADN correspondant au gène, doublant à chaque cycle, augmente de façon exponentielle et devient majoritaire dans le mélange réactionnel.

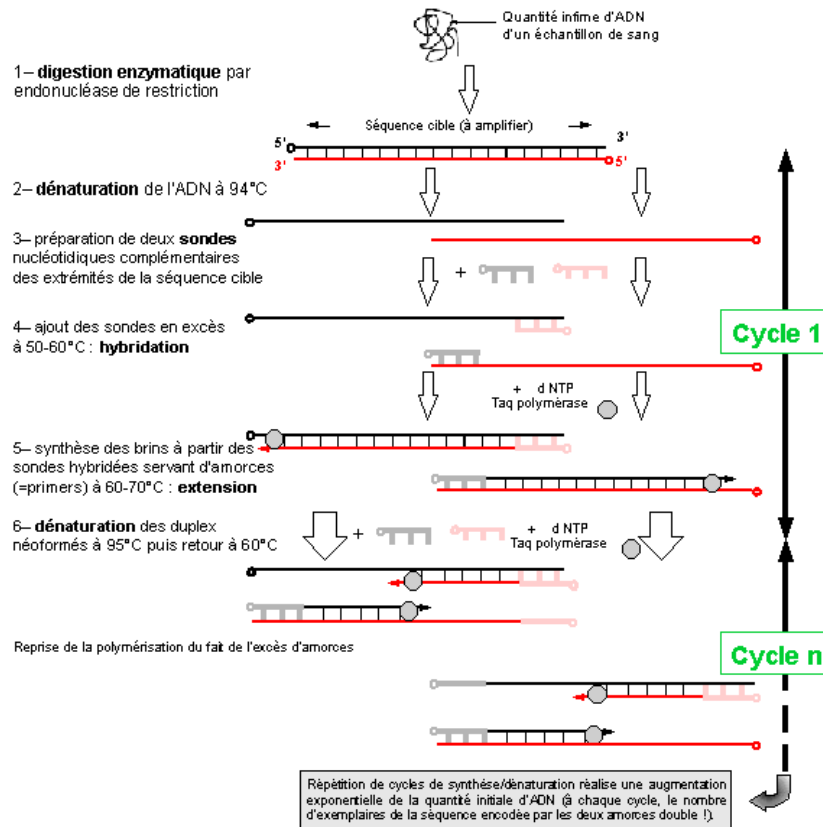


Figure IV. 2 : Principe de la technique de PCR. Les brins d'ADN complémentaires sont dénaturés à 95°C puis les amorces spécifiques se fixent sur les brins et enfin la polymérase synthétise les brins complémentaires à l'aide des oligonucléotides présents dans le milieu réactionnel.
(<http://www.inrp.fr/Acces/biotic/biomol/techgen/html/schemppcr.htm>)

A l'heure actuelle, deux grandes techniques de PCR quantitatives basées sur des principes différents sont utilisées. La première utilise des molécules se liant à l'ADN double brin de manière non spécifique ; technique la plus couramment utilisée aujourd'hui est le SyBR Green (intercalant fluorescent). La seconde technique utilise des sondes fluorescentes et des transferts d'énergie par résonance (type TaqMan, par exemple). Dans cette étude, seule la première technique (SyBR Green), utilisée dans ce travail, sera développée.

ii) Intérêt de la technique de PCR quantitative

Comparativement aux autres techniques de biologie moléculaire classiquement utilisées pour étudier l'expression des gènes (PCR classique, Northern-Blot), la PCR quantitative apporte une plus grande fiabilité. Cette technique est rapide, sensible, quantitative (avec une grande précision) et très reproductible. En outre, quelques nanogrammes d'ADNc suffisent pour l'analyse.

iii) Appareillage

Le LightCycler est un thermocycleur rapide (à air pulsé), couplé à un microspectrofluorimètre. Il est piloté par un ordinateur qui permet l'acquisition et le suivi en temps réel des données ainsi que leur traitement (Figure IV. 3). Les échantillons sont déposés dans des capillaires en verre (pas de résistance thermique) portés par un carrousel d'une capacité de 32 tubes. Le carrousel tourne en permanence pour que tous les échantillons subissent le même traitement.

La température est distribuée de façon homogène dans tout le capillaire et la lumière émise par le fluorophore est concentrée au bas du capillaire. A chaque cycle, chaque capillaire passe devant le système optique où la fluorescence est mesurée. Il faut 3 secondes pour lire les 32 capillaires (une expérience dure de 30 mn à 1h, avec maintien de l'activité de la polymérase et sans dégradation du fluorophore).

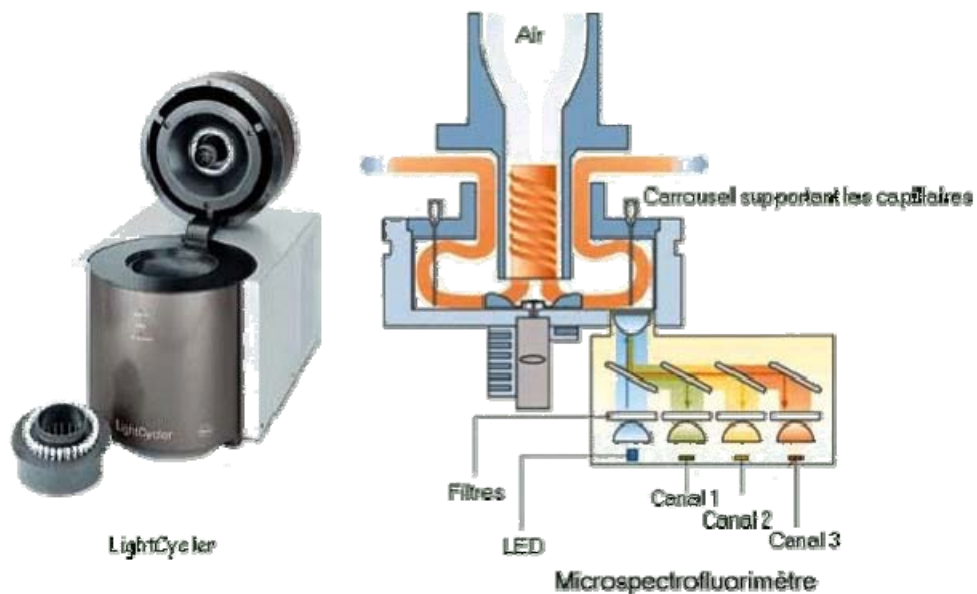


Figure IV. 3 : Appareillage du LightCycler utilisé en RT-PCR en temps réel.

iiii) Principe de la technique de PCR quantitative

Les trois étapes de la réaction de PCR quantitative sont les mêmes qu'en PCR classique (dénaturation, hybridation, élongation). A la différence d'une PCR classique, la PCR quantitative utilise du SyBR Green qui permet la quantification de l'amplicon formé en temps réel. Le SyBR Green est un fluorophore capable d'émettre une fluorescence quand il est lié à de l'ADN double brin.

Au début de la réaction, le mélange réactionnel contient de l'ADN dénaturé, les amorces et le fluorophore non lié. Après hybridation des amorces, le fluorophore se lie au double brin. La liaison à l'ADN se traduit par une augmentation de la fluorescence. Pendant l'étape d'élongation, le nombre de molécules de fluorophore lié à l'ADN synthétisé augmente ce qui se traduit par une augmentation de la fluorescence. La fluorescence est mesurée à la fin de l'étape d'élongation de chaque cycle (Figure IV. 4).

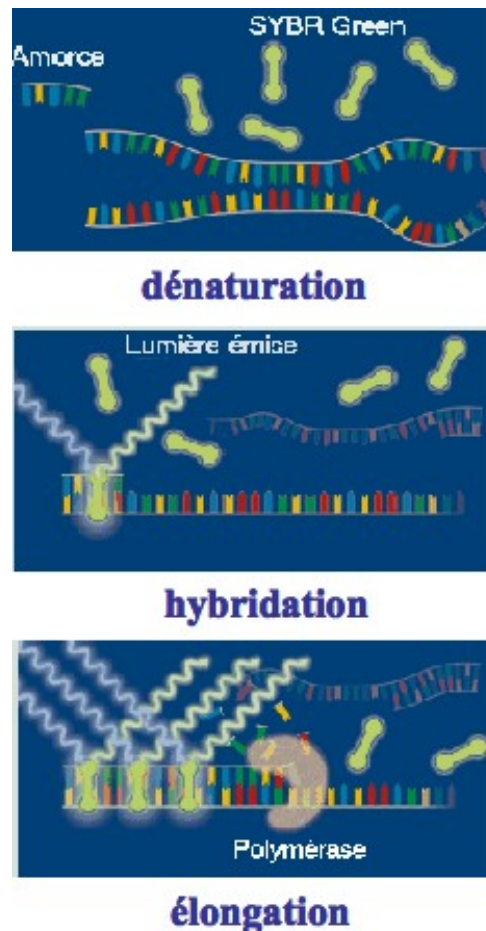


Figure IV. 4 : Principe de la RT-PCR en temps réel avec un fluorophore (SyBR Green). Le SyBR Green non fixé à l'ADN n'émet pas de fluorescence. Lors de l'hybridation, les amorces se fixent sur les brins d'ADNc avec insertion de la sonde. Pendant l'élongation, l'intensité de fluorescence croît avec l'insertion de sondes dans les doubles brins formés

1.1.4.5. Exploitation des données

i) Courbe de fusion

Chaque produit d'ADN double brin synthétisé a une température de fusion (T_m) spécifique, définie comme étant la température à partir de laquelle 50 % de l'ADN est sous forme double brin et 50 % sous forme simple brin (Figure IV. 5). Après le dernier cycle de PCR, la

température est rapidement élevée à 95°C, ce qui a pour but de dénaturer l'ADN double brin, puis elle est abaissée à la température de couplage ce qui provoque la reformation d'ADN double brin. La température est ensuite élevée lentement à 95°C. La fluorescence est lue en continu pendant cette remontée.

Le SyBR Green est fluorescent tant qu'il est lié à l'ADN double brin. Quand la température augmente, l'ADN double brin se dissocie, ce qui entraîne la libération du SyBR Green dans le milieu et une diminution progressive de la fluorescence. Lorsqu'une quantité de 50 % de l'ADN double brin est dissociée, la fluorescence chute brutalement, c'est à cette température que correspond la température de fusion du produit synthétisé. En traçant la courbe de la dérivée première négative de la fluorescence en fonction de la température, nous obtenons un maximum qui correspond à cette température de fusion. Cette courbe de température permet de vérifier que les produits synthétisés correspondent bien au même gène. La position du T_m sur l'axe des températures est donc caractéristique d'un amplicon donné et doit toujours apparaître à la même position.

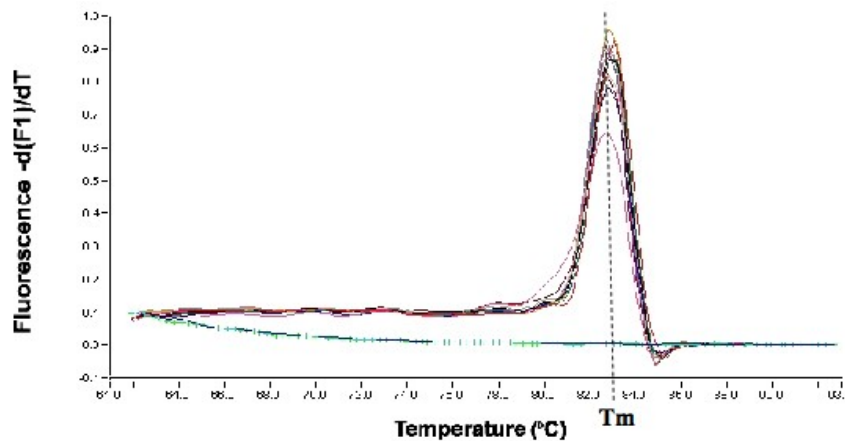


Figure IV. 5 : Détermination de la température de fusion (T_m) d'un gène étudié en RT-PCR en temps réel

Cette technique permet de faire une quantification relative de gènes d'intérêt dans des échantillons donnés par rapport à un gène de référence, dont l'expression ne varie pas en fonction des conditions expérimentales. Il permet aussi de faire une quantification absolue (détermination en nombre de copies) par rapport à une gamme d'ADNc (Figure IV. 6).

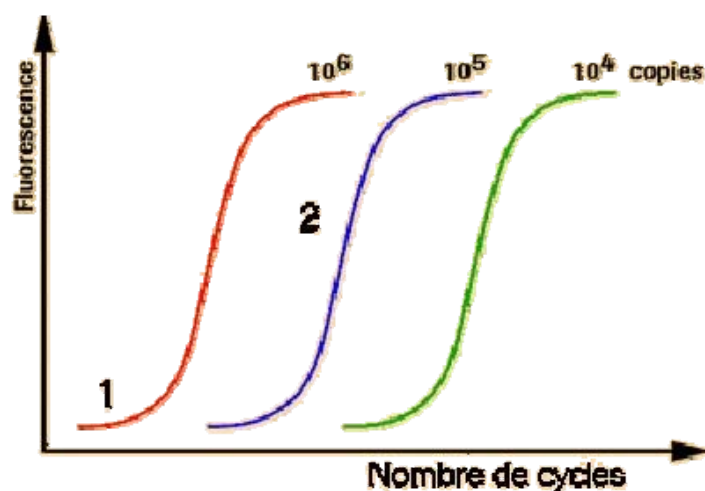


Figure IV. 6 : Quantification de l'expression d'un gène en fonction d'une gamme d'ADNc

Une gamme est réalisée, en parallèle des échantillons, afin de pouvoir quantifier l'expression des différents gènes. Pour cela, de l'ADNc correspondant au gène à étudier est récupéré, purifié et dosé, puis une dilution est réalisée pour faire une gamme de 10^{-3} à 10^{-7} $\mu\text{g/mL}$ (Figure IV. 6). Cette gamme est analysée en même temps que les échantillons et permet de quantifier le gène étudié.

Cette technique va nous permettre de suivre en temps réel l'amplification d'un fragment d'ADN donné, grâce au kit QuantiTech SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen) et un appareillage particulier le LightCycler (Roche Applied Science). Le principe général est celui d'une PCR classique. Ainsi, grâce à l'utilisation d'une matrice d'ADN, d'amorces spécifiques, et du mélange réactionnel fourni dans le kit – ce dernier comprenant, la Taq polymérase, les dNTP, et un tampon de PCR adéquat (Tris HCl, KCl, $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, 5 mM MgCl_2 , pH 8,7) - un fragment d'ADN déterminé va être amplifié par réaction de polymérisation en chaîne. La différence essentielle provient de la présence dans la solution réactionnelle d'un intercalant de l'ADN nommé le SYBR Green. Ce fluorophore possède la capacité d'émettre une fluorescence très vive lorsqu'il est intercalé dans de l'ADN double brin, fonction disparaissant dès qu'il se retrouve sous sa forme libre. La réaction s'effectue dans des capillaires en verre de 1,5 mm de diamètre et de 3 cm de hauteur. Ceci favorise les échanges thermiques entre le mélange réactionnel et l'appareil, diminuant ainsi les durées des différentes étapes de la PCR, et donc le temps nécessaire à l'exécution du programme. Pendant toute la durée du processus, un micro-spectrofluorimètre couplé au LightCycler va nous permettre de mesurer la fluorescence émise par le SYBR Green. Ainsi il est possible de suivre l'évolution en temps réel de la quantité d'amplicons, en effectuant des relevés de fluorescence à la fin de chaque étape d'élongation. Cette évolution peut-être représentée par

une sigmoïde. En effet, la fluorescence émise ne sera détectée qu'à partir d'un seuil nécessitant plusieurs cycles d'amplification avant d'augmenter exponentiellement jusqu'à un second seuil, le SYBR Green se trouvant alors en quantité limitante. Ce n'est donc que durant la phase exponentielle que la quantité d'amplicons obtenus sera directement proportionnelle à la fluorescence émise.

ii) Protocole expérimental

Chaque extrait d'ADNc obtenu après la transcription inverse est dilué au quart dans de l'eau ultra pure (exempte de DNase).

Le mélange réactionnel contient 2 µl d'extrait d'ADNc, 10 µl de « SYBR Green PCR Master Mix », 1 µl d'amorce sens, 1 µl d'amorce antisens et 6 µl d'eau ultra pure. Les amorces sont choisies spécifiquement suivant le gène que l'on veut amplifier (Tableau IV. 2). Il existe une étape initiale d'activation de l'enzyme et de dénaturation de 15 minutes à 95 °C. Ensuite, le Lightcycler réalise quarante cycles composé de 10 secondes à 95 °C pour la dénaturation de l'ADNc, 20 secondes à la température d'hybridation des amorces (T[°]hyb.) et 15 secondes à 72 °C, température à laquelle se réalise l'élongation.

Gènes	Amorce Forward	Amorce Reverse	T en °C
RP29	AAGTGGGTCACCAG CAGCTCTACTG	AGACGCGGCAGAGC GAGAA	61
Col II	GCCTCGCGGTGAGCC ATGATC	CTCCATCTCTGCCAC GGGGT	60
Col 1A2	CAACCTCAAGAAGTC CCTGC	AGGTGAATCGACTG TTGCCT	60
Agrécane	ACACCCCTACCCTTG CTTCT	AAAGTGTCCAAGGC ATCCAC	59
Versican	GCAGCGACCAGCAG ATACACT	TGACCGCCCCGATGT C	60
TNFα	ATGGGCTCCCTCTCA YYCAGT	ACTCCAGCTGCTCCT CTGCT	81
COX-2	TACAAGCAGGTGGC AAAGGCC	CAGTATTGAGGAGA ACAGATGGG	81
IL-1β	CTTCCCCAGGACATG CTAGG	CAAAGGCTTCCCCTG GAGAC	80
HAS-2	TCGGAACCACACTGT TTGGA	TGGATAAACTGGTA GCCAACAATATAA	60

Tableau IV. 2 : Caractéristiques des amorces des gènes étudiés en PCR en temps réel (Taille des fragments de PCR 100-120 pb)

1.1.4.6. Courbe de fusion

Chaque produit d'ADN double brin synthétisé possède une température de fusion (T_m) spécifique, définie comme étant la température à partir de laquelle 50 % de l'ADN est sous forme double brin et 50 % sous forme simple brin. La vérification de cette T_m nous permet de vérifier la spécificité de l'amplification lors de la PCR (un pic correspond à un gène amplifié). Ainsi, après le dernier cycle de PCR, la température est rapidement élevée à 95 °C pour dénaturer l'ADN double brin, puis elle est abaissée à la température d'hybridation, provoquant ainsi la reformation d'ADN double brin. La température est ensuite élevée lentement à 95 °C et la fluorescence émise par le SYBR Green est relevée tout les 0,1 °C. Lorsque 50 % de l'ADN double brin sont dissociés, la fluorescence chute brutalement, c'est à cette température que correspond la température de fusion du produit synthétisé. La température de fusion est obtenue en traçant la dérivée première négative de la fluorescence en fonction de la température : elle correspond au maximum de la courbe

iii) Analyse des résultats

Afin de pouvoir comparer les échantillons entre eux, nous commençons systématiquement par effectuer une PCRq d'une séquence d'un gène de ménage (codant, dans notre cas, pour la protéine ribosomale RP29) dont le taux d'expression ne varie pas selon les stimuli ou traitements infligés aux cellules (*in vivo* ou *in vitro*). Cette étude permettra d'affecter un facteur de correction aux résultats obtenus pour l'analyse de l'expression des gènes d'intérêts. Enfin pour évaluer les concentrations du fragment d'ADN considéré, dans chaque échantillon à tester, nous réalisons une gamme d'étalonnage à partir de la séquence d'ADN cible préalablement amplifiée par PCRq, purifiée et diluée à différentes concentrations (10^{-3} à 10^{-7} ng/ μ l).

1.1.4.7. Analyses statistiques

L'interprétation statistique des résultats est faite avec le logiciel GraphPad®. Par ANOVA et test *a posteriori* pour échantillons non appariés, au risque $\alpha = 0,05$, pour les manipulations avec les contraintes d'agitation. Par test t pour échantillons non appariés au risque $\alpha = 0,05$, pour les manipulations avec comparaison des biomatériaux. Les résultats sont exprimés en moyenne +/- l'écart type pour chaque valeur étudiée avec $n = 3$ pour chaque série.

I.2. RESULTATS / DISCUSSION.

I.2.1. Cytocompatibilité des 7 lots de nanoparticules in vitro

L'innocuité des nanoparticules sur les cellules utilisées est testée selon les deux tests spécifiés dans la partie « Matériels et Méthodes » de ce chapitre page 144. Ces tests sont effectués pour trois temps (24, 48 et 72h) et à trois concentrations en nanoparticules (50, 75 et 100 µg/ml).

Sont présentés les graphiques des trois type cellulaires pour la concentration la plus forte (100 µg/ml de nanoparticule) et le temps de contact le plus long (72h), ces conditions ayant théoriquement l'impact le plus fort sur la cytocompatibilité.

Les 7 lots testés sont présentés Figure IV. 7.

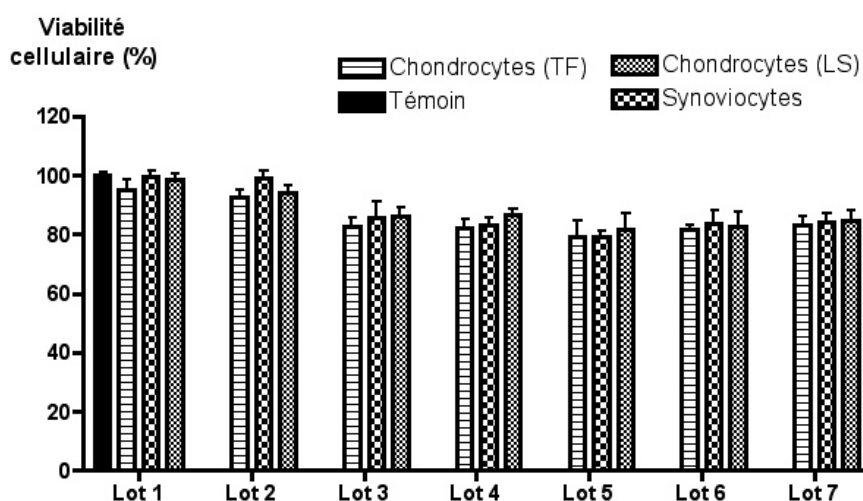


Figure IV. 7 : Evaluation des effets des nanoparticules sur la viabilité cellulaire. La cytotoxicité est déterminée par test MTT, réalisé sur les différents contingents cellulaires (synoviocytes, chondrocytes de tête fémorale et languette sternale) de rat vis à vis des sept lots de nanoparticules (temps de contact de 72h et concentration de 100 µg/ml de nanoparticules).

I.2.2. Discussion

Les tests pratiqués (MTT ou LDH) sont complémentaires afin de pouvoir apprécier la cytotoxicité des nanoparticules en monocouche. Les résultats de ces tests ont montré que non seulement les cellules étaient toujours viables (MTT). La concentration testée en monocouche de 100 µg/mL ne modifie pas significativement la viabilité des contingents cellulaires étudiés, qu'il s'agisse de chondrocytes articulaires (phénotype hyalin), de chondrocytes sternaux (phénotype fibrocartilage) et des synoviocytes.

La concentration de 100 µg/ml a été retenue car au vu des dosages physico-chimiques, elle permet en effet d'apporter environ 2 ng de PA encapsulé par ml de milieu (chaque lot de nanoparticules encapsule environ 20 µg de PA par mg de nanoparticules). Cette quantité relativement peu élevée en apparence peut s'avérer significative en cas d'encapsulation de la nanoparticule par la cellule. Les tests montrent qu'à cette concentration et pour un temps de contact de 72h, il n'y a pas eu de mortalité cellulaire significative pour les différents lots testés.

Cette étape de démonstration de l'innocuité en terme de viabilité est nécessaire mais non suffisante car les cellules du cartilage ont un comportement qui diffèrent suivant qu'elles soient cultivées en monocouche ou en système tridimensionnel.

I.2.3. Etude de la cytocompatibilité sur trois lots spécifiques :

I.2.3.1. Contexte et objectif de l'étude :

Au vu des tests préliminaires en cytotoxicité, nous nous proposons d'étudier le comportement des nanoparticules (concentrations identiques) sur les cellules articulaires, de façon plus complète (toxicité, potentialités pro-inflammatoires, localisation) à la fois dans un système de culture en monocouche mais également dans un model de culture tridimensionnel (billes d'alginate) qui nous permet d'avoir accès à d'autres paramètres, notamment la biosynthèse des constituants matriciels (plus précisément les protéoglycanes).

Pour réaliser ces études *in vitro*, trois nouveaux lots de nanoparticules ont été synthétisés. Ces lots de nanoparticules diffèrent par leurs molécules hydrosolubles encapsulées et par le type de recouvrement externe fixé sur celles-ci.

Les trois lots de nanoparticules sont présentés dans le Tableau IV. 3:

	Spécification des nanoparticules	
	En surface	Encapsulé
Lot 1	HAC6	HA natif
Lot 2	HAC6	Dextrane-FITC
Lot 3	PVA	Dextrane-FITC

Tableau IV. 3 : Détails des trois lots de nanoparticules utilisés pour les manipulations en billes d'alginate avec le type de molécules hydrosolubles encapsulées et le type de molécule fixé en surface.

Les deux lots recouverts de HA modifié chimiquement permettent de mesurer la cytocompatibilité de tels systèmes nanoparticulaires lors de temps de contact prolongés (24,

48 et 72h) avec les deux types de cellules articulaires (synoviocytes et chondrocytes). Dans cette classe de nanovecteurs, le recouvrement externe joue un rôle majeur dans les interactions entre les nanoparticules et le milieu environnant (protection du PA, mode de relargage...) [1-3]. Il peut jouer un rôle déterminant en terme d'innocuité des nanoparticules en activant ou non les voies d'activation des processus d'inflammation mais également un rôle important en ce qui concerne les interactions cellules / nanoparticules par l'intermédiaire des protéines membranaire.

Le recouvrement des nanoparticules par le PVA va lui nous permettre d'apprécier le rôle du HA en surface non seulement au niveau de la stimulation de la réponse inflammatoire mais aussi au niveau de la reconnaissance des nanoparticules par le chondrocyte via le récepteur CD44. Ces deux lots contiennent du dextrane-FITC, qui va nous permettre de suivre la distribution et la localisation des nanoparticules après incubation avec les cellules. Pour les lots possédant un même type de recouvrement, il sera possible de comparer le ou les effets biologiques de la molécule encapsulée.

1.2.3.2. Résultats :

La détermination de la cytotoxicité des nanoparticules a consisté à mettre en contact les différents lots de nanoparticules avec les synoviocytes et les chondrocytes.

Pour les synoviocytes (cellules plus sensible à l'inflammation), ces tests sont effectués en monocouche alors que pour les chondrocytes ils sont effectués en bille d'alginate.

Les tests MTT pour les chondrocytes en billes d'alginate ne diffèrent pas des tests MTT en monocouche pour les synoviocytes. On présentera alors seulement les résultats obtenus sur les synoviocytes.

Les résultats pour les synoviocytes de ces tests MTT sont montrés par les trois graphiques suivant (sur la Figure IV. 8, Figure IV. 9 et Figure IV. 10). Ces graphiques illustrent la viabilité cellulaire des synoviocytes de rat en P3 lors de mise en contact avec trois lots de nanoparticules durant trois temps (24h, 48h et 72h) et à trois concentrations (50, 75 et 100 µg/ml).

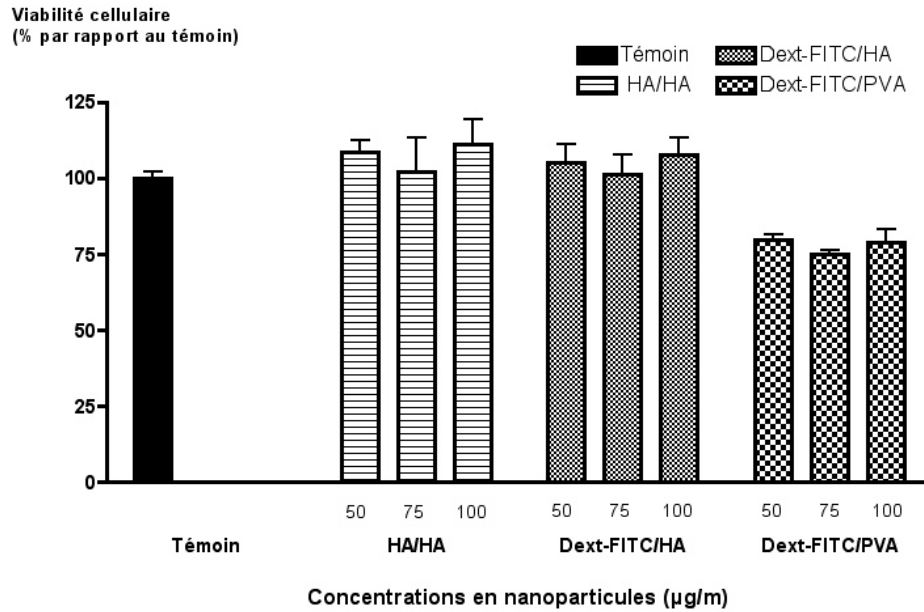


Figure IV. 8 : Viabilité cellulaire des synoviocytes en P3 de rat après un temps de contact de 24h pour trois lots de nanoparticules à trois concentrations différentes (50, 75 et 100 µg/ml).

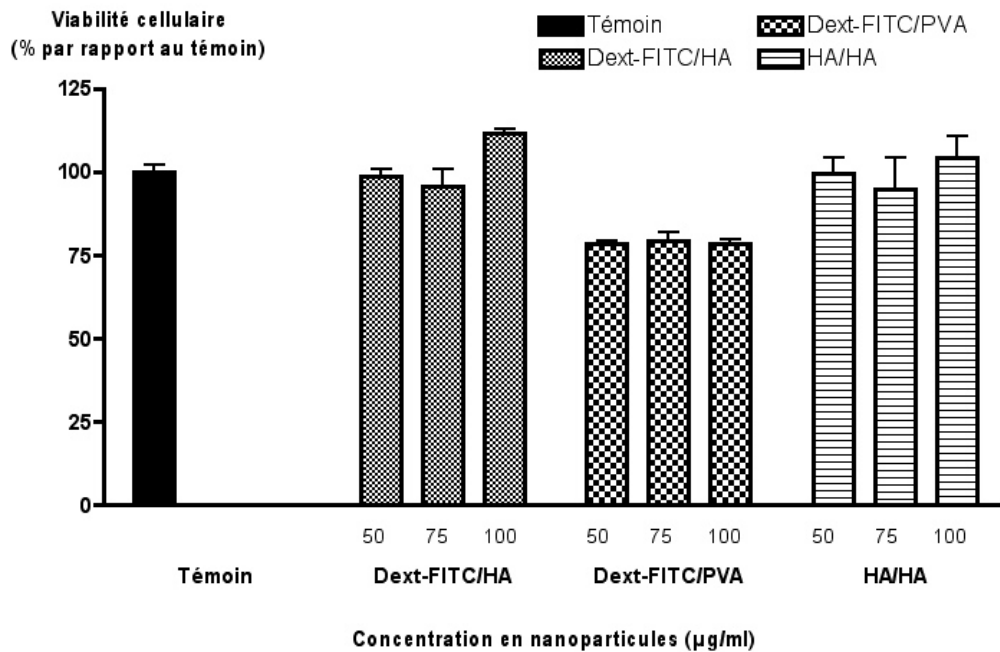


Figure IV. 9 : Viabilité cellulaire des synoviocytes en P3 de rat après un temps de contact de 48h pour trois lots de nanoparticules à trois concentrations différentes (50, 75 et 100 µg/ml).

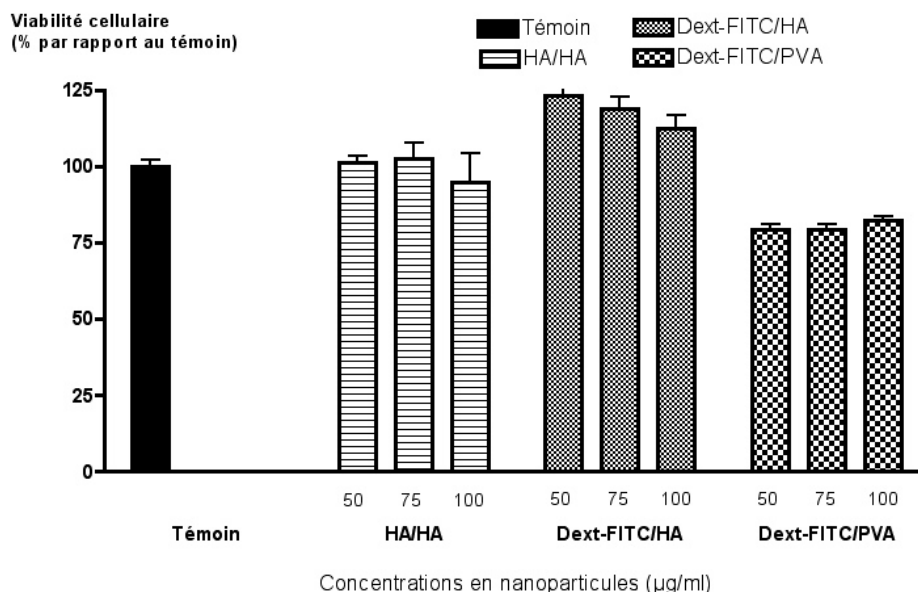


Figure IV. 10 : Viabilité cellulaire des synoviocytes en P3 de rat après un temps de contact de 72h pour trois lots de nanoparticules à trois concentrations différentes (50, 75 et 100 µg/ml).

Des trois lots de nanoparticules, les deux recouverts de HA modifié ont montré une bonne cytocompatibilité au trois temps testés. Même après 72h de contact entre les nanoparticules et les synoviocytes, les nanovecteurs n'ont pas modifiés la prolifération ni engendrés de phénomènes apoptotiques. Le dextrane marqué au FITC encapsulé ne semble pas engendrer de mortalité cellulaire ou bloquer la prolifération cellulaire au bout de 72h lorsqu'il est recouvert de HA.

Le lot recouvert de PVA lui montre une cytocompatibilité plus faible. Ceci démontre le rôle primordial du recouvrement externe des nanoparticules. Il semble nettement que le type de relargage (principalement déterminé par le recouvrement) intervienne aussi dans cette cytocompatibilité cellulaire.

L'effet cytotoxique du recouvrement en PVA ne s'accroît pas avec le temps, le décalage avec les autres lots restant quasiment identique (20-25%). Cette diminution de la prolifération semble être liée à la nature du recouvrement de la nanoparticule puisque ceci n'est pas observé avec les lots recouverts de HA. De plus, cet effet cytotoxique semble limité dans le temps puisque les résultats montrent un maintien de cet écart (témoin, HAC6-HA) sur toute la période de l'étude.

Pour expliquer cette baisse de viabilité cellulaire, notre hypothèse (rôle du recouvrement) peut être confortée en analysant la courbe de relargage (chapitre III (figure IV. 11):

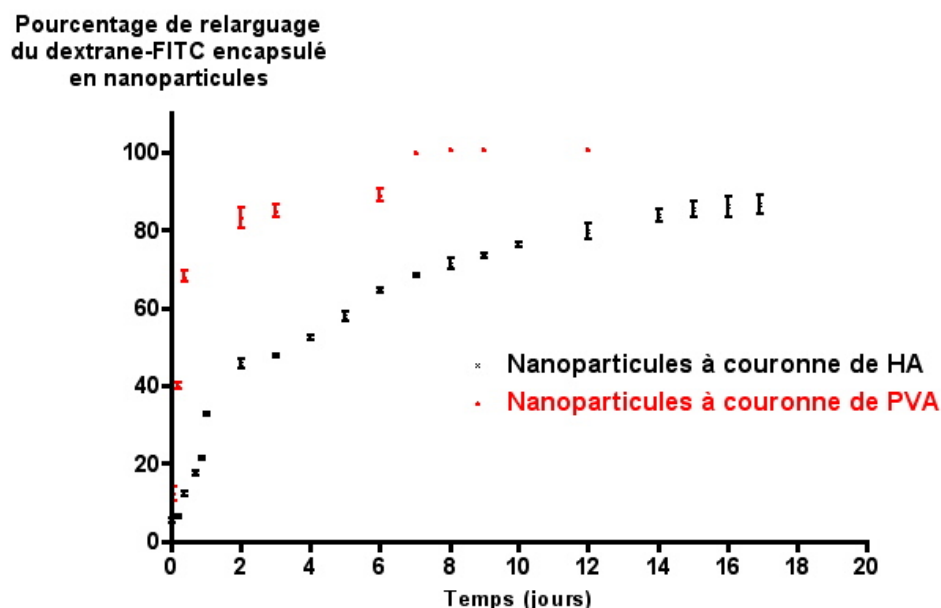


Figure IV. 11 : Cinétique de libération (courbes cumulatives en pourcentage par rapport à la masse encapsulée dans les nanoparticules) du dextrane-FITC. Voir conditions expérimentales chapitre III. (100%=22 µg/mg de nanoparticules pour le lot recouvert de HA (A) et 20,5 µg/mg de nanoparticules pour celui recouvert de PVA (B)).

Sur cette courbe de relargage et pour le lot recouvert de PVA, il apparaît très nettement que près de 70% du dextrane-FITC est relargué dans un intervalle de temps de 12h. La libération d'une telle dose de dextrane-FITC dans le milieu de culture peut s'avérer toxique/inhibitrice sur la prolifération cellulaire. Le dextrane-FITC en lui-même n'est pas toxique, mais cette quantité importante très vite libérée peut expliquer la baisse de viabilité constatée.

1.2.3.3. Conclusion :

Ces tests de viabilité ont démontré que les nanoparticules recouvertes de HA sont bien biocompatibles. Elles n'engendrent pas d'effets délétères sur la prolifération et la survie des cellules et ce jusqu'à 72h de temps de contact avec le biomatériau. Que le PA encapsulé soit du HA natif ou du dextrane marqué au FITC, il n'y a pas de différence de viabilité. Aucun « effet de concentrations » commun à ce type d'étude n'a été mis en évidence sur la plage de concentration / temps de contact utilisée.

Par contre, le recouvrement en PVA engendre une baisse de la prolifération cellulaire. Un effet significatif entre le temps d'exposition des nanoparticules recouvertes de PVA et l'importance de la baisse de viabilité est constaté. La viabilité cellulaire de ce lot (75-80% à

72h) de nanoparticules reste tout à fait compatible avec la mise en place de l'étude biologique complète en milieu tridimensionnel. En effet, ce lot recouvert de PVA sera surtout essentiel pour la microscopie confocale à fluorescence. Il nous permettra alors étudier l'internalisation des nanoparticules dans les chondrocytes ou les synoviocytes en fonction du recouvrement externe des nanoparticules. Le lot recouvert de PVA présente une baisse de la viabilité sans doute explicable par l'effet concomitant de la nature du recouvrement (PVA) et du mode de relargage (type « burst effect ») très rapide constaté pour ce lot.

I.2.4. Etude de l'inflammation sur trois lots de nanoparticules :

I.2.4.1. Pré-requis :

Après avoir étudié les effets des nanoparticules sur la viabilité cellulaire des différents contingents cellulaires, une étude par RT-PCR quantitative en temps réel a été réalisée sur les cellules articulaires, afin de vérifier l'innocuité des nanoparticules (synthèse) vis à vis de la réponse inflammatoire.

Les cellules (synoviocytes et chondrocytes) ont été exposées sur 24h, 48h et 72 heures aux nanoparticules provenant des différents lots (PVA-Dextran FITC, HAC6-Dextran FITC, HAC6-HA) et les cellules ont été récupérées aux différents temps afin d'extraire les ARN totaux. La Figure IV. 12 montre que les ARN totaux ont bien été extraits (qualitativement et quantitativement) à partir des différents groupes, étape indispensable pour pouvoir déterminer le taux d'expression des différents gènes (IL-1 β , Cox-2, TNF-alpha).

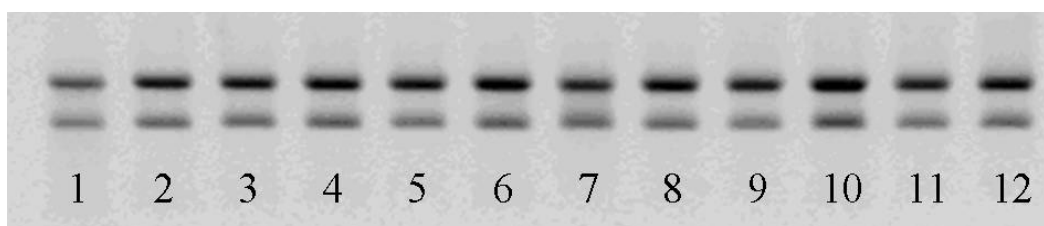


Figure IV. 12 : Electrophorèse en gel d'agarose pour visualiser la qualité des ARN totaux extraits à partir des cellules, exposées aux différents lots de nanoparticules (100 μ g/ml).

Piste 1, cellules témoin 24 heures; **Piste 2**, cellules témoin 48 heures; **Piste 3**, cellules témoin 72 heures; **Piste 4**, cellules + PVA-dextrane FITC 24 heures; **Piste 5**, cellules + PVA-dextrane FITC 48 heures; **Piste 6**, cellules + PVA-dextrane FITC 72 heures; **Piste 7**, cellules + HAC6-dextrane FITC 24 heures; **Piste 8**, cellules + HAC6-dextrane FITC 48 heures; **Piste 9**, cellules + HAC6-dextrane FITC 72 heures; **Piste 10**, cellules + HAC6-HA 24 heures; **Piste 11**, cellules + HAC6-HA 48 heures; **Piste 12**, cellules + HAC6-HA 72 heures.

Puis, pour pouvoir mesurer l'expression des gènes par RT-PCR quantitative en temps réel, nous avons dessiné plusieurs couples d'amorces spécifiques de chaque gène. Une première

partie de ce travail a consisté à vérifier la spécificité des amorces et déterminer les conditions d'amplification.

Comme cela est présenté sur la Figure IV. 13, il nous a fallu vérifier que nos conditions expérimentales d'amplification étaient robustes, c'est à dire que quelle que soit la quantité de matériel de départ, nos conditions expérimentales nous permettaient d'amplifier avec la même efficacité l'amplicon correspondant au gène suivi. Sur cette figure, il apparaît un seul pic d'amplification, ce qui atteste de la spécificité des amorces utilisées pour amplifier l'ADNc correspondant au messager du TNF alpha. En effet, un manque de spécificité des amorces se serait traduit soit par la présence de plusieurs pics (correspondant à plusieurs produits d'amplification) soit par la présence d'un épaulement (dimérisation des amorces) qui modifierait l'efficacité de l'enzyme.

Lorsque des dilutions d'un facteur 10 sont utilisées (10^{-3} à 10^{-7}), nous obtenons une droite de régression (coefficient de corrélation $r = -1$) avec une pente de -3,381. Ces expériences préliminaires nous permettent de montrer que notre méthode d'amplification possède bien la même efficacité, quelle que soit la quantité de matériel nucléaire à notre disposition.

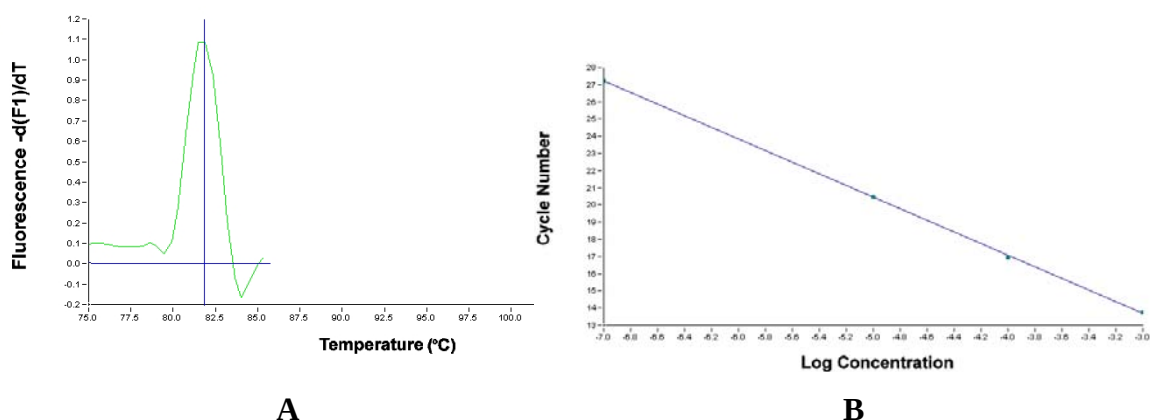


Figure IV. 13 : Caractéristiques de l'amplification du produit de PCR, avec les amorces TNF α .

A : Droite étalon réalisée par une série de dilutions d'un standard externe (produit de PCR purifié), permettant la quantification (relative et absolue) de chaque échantillon analysé.

B : Courbe de fusion observée après les cycles d'amplification, permettant de démontrer la spécificité d'amplification avec le couple d'amorces utilisées.

Cette mise au point a été réalisée pour chacun des gènes étudiés (données non présentées pour RP29, Il-1 β , Cox-2), afin de s'assurer de l'efficacité de notre méthode d'analyse. De plus, nous avons pu développer une méthode de travail reproductible (inter-essais, inter-expérimentateurs) et ceci grâce à l'utilisation d'une gamme étalon. En effet, cette dernière est

réalisée à chaque série d'amplification et de fait nous permet de pouvoir comparer « les points de sorties » des différentes concentrations au cours du temps. Il est donc ainsi possible de surveiller la qualité et la reproductibilité des résultats obtenus au cours de nos expériences.

Après avoir validé les différents couples d'amorces et les conditions d'amplifications, nous avons pu analyser les taux d'expression de certains médiateurs précoces de la réponse inflammatoire (Cox-2, IL-1 β , TNF-alpha) dans les cellules articulaires, exposées aux différents lots de nanoparticules synthétisées. L'objectif de ces expériences est de montrer si l'exposition aux diverses formulations pouvait induire une réponse inflammatoire et pour ce faire, nous avons choisis de travailler avec les synoviocytes, leur capacité à répondre aux stimuli pro-inflammatoires étant plus grande. Ceci se justifie aussi par le fait que dans l'organisme, les synoviocytes sont parmi les premières cellules à synthétiser des cytokines pro-inflammatoires en réponse à un stress cellulaire ou une agression.

1.2.4.2. Résultats:

Les graphiques suivant montrent l'évolution de l'expression en ARNm des différents gènes étudiés suite au contact entre les cellules et les nanoparticules.

Tous ces taux d'expression sont normalisés par rapport à un gène de ménage (« house keeping gene ») dont l'expression ne varie pas lors de nos conditions expérimentales, ici le suivi d'un processus inflammatoire. En effet, des expériences préliminaires (données non présentées) avaient démontré que le gène de ménage RP29 (protéine ribosomiale) ne voyait pas son expression varié lorsque les cellules étaient soumises à un stimulus pro-inflammatoire (IL-1 β recombinante, LPS,...). Les résultats exposés représentent les valeurs observées lors de deux expériences indépendantes, avec n = 3 échantillons par conditions.

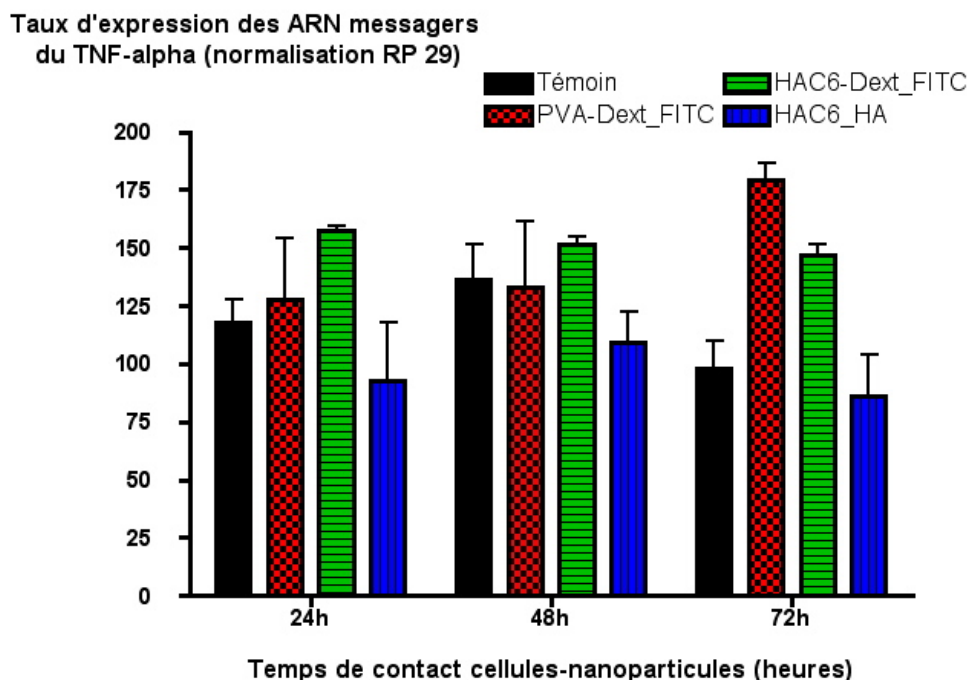


Figure IV. 14 : Analyse de l'expression des ARN messagers du TNF-alpha par les synoviocytes.

Les cellules sont cultivées en présence des nanoparticules sur une période allant de 24 à 72 heures, puis ces dernières sont récupérées afin d'extraire les ARN totaux et de réaliser l'analyse par RT-PCR quantitative en temps réel. Les ARN totaux sont extraits, rétrotranscrits puis amplifiés avec les deux jeux d'amorces séparément. Les résultats présentés sur le graphique représentent l'expression en ARN messagers du TNF-alpha exprimé par les synoviocytes en culture, exposés aux différents lots de nanoparticules et normalisé par rapport à RP29.

Sur la Figure IV. 14, l'expression du TNF-alpha est stimulée pour les deux groupes de nanoparticules contenant du Dextran-FITC et ceci dès 24 heures de contact entre les cellules et les nanoparticules. Cette induction persiste jusqu'à 72 heures après la mise en contact avec les cellules. Toutefois, l'induction en termes de messagers semble plus prononcée lorsque les nanoparticules à base de PVA sont incubées avec les cellules synovioyctaires. Pour les nanoparticules contenant de l'acide hyaluronique (HA) à l'intérieur, il ne semble pas y avoir d'augmentation du taux d'expression du TNF alpha dans les synoviocytes et ceci quel que soit le temps de contact étudié. Le même type de profil est observé avec l'IL-1 β (Figure IV. 15), c'est-à-dire une augmentation de l'expression des messagers de cette cytokine pro-inflammatoire lorsque les cellules sont incubées avec des nanoparticules, cette induction étant plus marquée avec les nanoparticules à base de PVA.

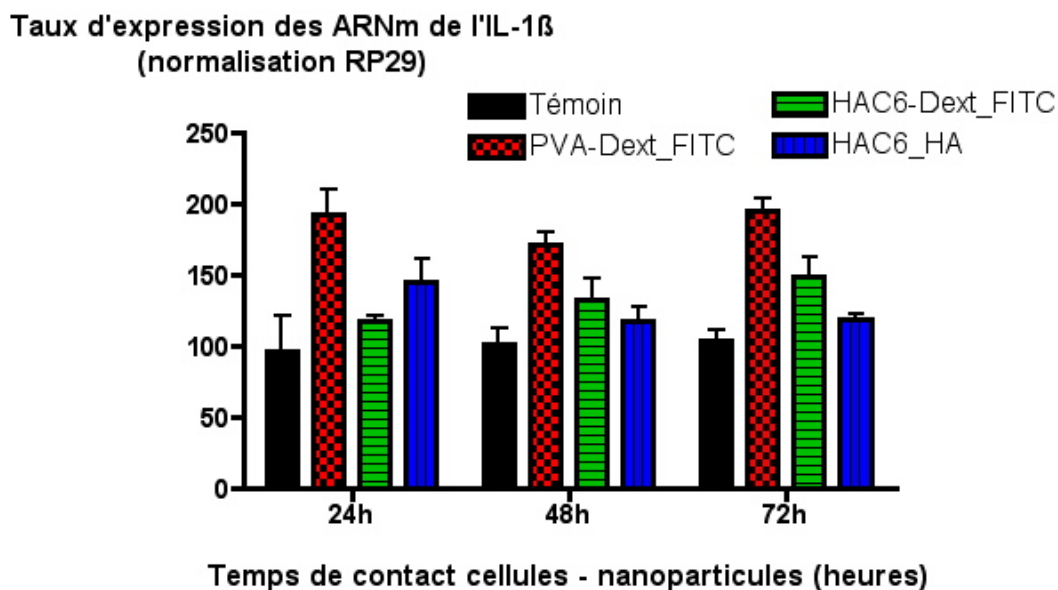


Figure IV. 15 : Analyse de l'expression des ARN messagers de l'IL-1 β par les synoviocytes de rat.

Les cellules sont cultivées en présence des nanoparticules sur une période allant de 24 à 72 heures, puis ces dernières sont récupérées afin d'extraire les ARN totaux et de réaliser l'analyse par RT-PCR quantitative en temps réel. Les ARN totaux sont extraits, rétrotranscrits puis amplifiés avec les deux jeux d'amorces séparément. Les résultats présentés sur le graphique représentent l'expression en ARN messagers de l'IL-1 β exprimé par les synoviocytes en culture, exposés aux différents lots de nanoparticules et normalisé par rapport à RP29.

Un profil légèrement différent est obtenu lors du suivi de l'expression du gène Cox-2 (cyclooxygénase inducible) (Figure IV. 16) où une augmentation significative de l'expression est nettement observée lorsque les synoviocytes sont cultivés en présence de nanoparticules de PVA / Dextran-FITC. Une légère augmentation est observée avec les deux autres lots de nanoparticules mais de moindre amplitude avec un retour au taux basal à 72 heures.

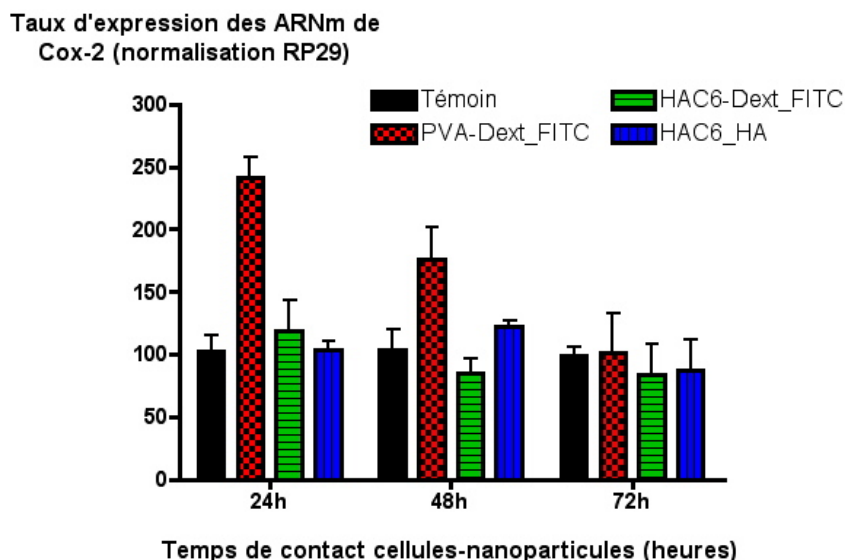


Figure IV. 16 : Analyse de l'expression des ARN messagers du TNF-alpha par les synoviocytes de rat.

Les cellules sont cultivées en présence des nanoparticules sur une période allant de 24 à 72 heures, puis ces dernières sont récupérées afin d'extraire les ARN totaux et de réaliser l'analyse par RT-PCR quantitative en temps réel. Les ARN totaux sont extraits, rétrotranscrits puis amplifiés avec les deux jeux d'amorces séparément. Les résultats présentés sur le graphique représentent l'expression de Cox-2, exprimée par les synoviocytes en culture, exposés aux différents lots de nanoparticules.

L'analyse des taux d'expression de certains médiateurs précoces de la réponse inflammatoire semble confirmer les résultats obtenus lors de l'analyse de la cytotoxicité des différents lots de nanoparticules. Le lot recouvert de PVA montre une activation marquée de l'expression pour les trois gènes étudiés. Cet effet pro-inflammatoire du lot recouvert de PVA semble tendre à diminuer pour toutes les cytokines au bout de trois jours.

De plus, si ces résultats sont comparés à ceux obtenus avec des stimuli mimant les conditions inflammatoires (IL-1bêta, LPS) (données non présentées), les écarts entre témoins et cellules stimulées à la cytokine IL1 β sont bien plus élevés que dans notre étude. Ainsi, le taux d'expression en IL-1bêta est de l'ordre de 100 à 1000 fois supérieur que dans nos conditions expérimentales. Il faut également garder à l'esprit que les trois gènes étudiés sont aussi des gènes mis en jeu lorsque les cellules sont soumises à un stress cellulaire tel que peut l'être l'exposition de cellules à des complexes même nanoparticulaires. En effet, des résultats similaires ont été observés au laboratoire lorsque des cellules de la membrane synoviale sont exposées à des agents de transfection (Polyéthylèneimine PEI, phosphate de calcium), avec pour conséquence directe une réponse cellulaire qui se caractérise par une augmentation de certaines protéines sentinelles (TNF-alpha, Heat Shock Protein,...).

Cette étude permet de montrer que les nanoparticules ne provoquent pas une mortalité cellulaire ainsi qu'elles n'engendrent pas d'effets pro-inflammatoires majeurs au cours du temps, même lors de temps de contact prolongés comme 72h.

1.2.4.3. Conclusion de l'étude inflammatoire :

Les expériences *in vitro* réalisées sur les différents contingents cellulaires ont permis de montrer que les différents lots de nanoparticules testés, avec du HA en surface ou du PVA et contenant du dextrane marqué au FITC, n'induisent pas d'effets cytotoxiques sur les cellules, ce qui signifie que les procédés de formulation utilisés pour synthétiser les nanoparticules permettent d'obtenir des suspensions de nanoparticules dépourvues des produits chimiques (solvant) impliqués dans la préparation. De plus, il semble que ces nanoparticules ne stimulent pas outre mesure l'expression de médiateurs pro inflammatoire (IL-1 β , TNF-alpha) même si l'expression de ces derniers se trouve augmenté d'un facteur 2, avec le lot le plus

défavorable. Les résultats observés tant sur le plan de la cytotoxicité que de l'expression des médiateurs sont très certainement à rapprocher des résultats de relargage, puisque dans le cas des nanoparticules à base de PVA, une libération rapide est observée (quelques heures) et la toxicité observée sur les cellules pourrait être liée à une libération rapide du Dextrane-FITC dans le milieu extracellulaire. Cette hypothèse semble être confortée par le fait qu'un profil similaire est observé avec les nanoparticules recouvertes de HA et contenant du Dextrane-FITC alors que les nanoparticules recouvertes de HA mais encapsulant du HA ne présentent ni d'effets cytotoxiques ni de stimulation majeure de l'expression des médiateurs de la réponse inflammatoire. Les effets cytotoxiques observés seraient plus à imputer à la libération massive du contenu, en tout cas pour les nanoparticules à base de PVA. Des expériences complémentaires devront être réalisées afin de déterminer si les effets cytotoxiques sont dus au dextrane-FITC ou aux produits de dégradation des systèmes nanoparticulaires. Pour cela, de nouvelles nanoparticules devront être synthétisées et qui devront encapsuler un autre type de sonde fluorescente ou une autre molécule traceur.

Cette série de tests permet de démontrer qu'il est possible d'envisager cette voie de vectorisation pour une utilisation ostéo-articulaire puisqu'elle présente une faible toxicité vis-à-vis des cellules du cartilage (synoviocytes et chondrocytes).

1.2.5. Effets des nanoparticules sur la biosynthèse matricielle en système tridimensionnel.

1.2.5.1. Contexte et objectifs de l'étude :

Après avoir démontré la possibilité de cultiver les cellules articulaires en présence de nanoparticules en monocouche, sans que cela soit toxique pour les cellules, il nous a fallu nous assurer que les cellules, principalement les chondrocytes, n'avaient pas modifié leurs caractéristiques phénotypiques, c'est à dire leur capacité à synthétiser des constituants de la matrice extracellulaire.

1.2.5.2. Résultats de l'étude de biosynthèse matricielle :

Les chondrocytes de rat ont donc été cultivés en monocouche, puis exposés à la plus forte concentration en nanoparticules (100 µg/ml) pendant 48 heures. Puis les cellules sont

récupérées et cultivées en système tridimensionnel en billes d'alginate. Une fois en billes, les cellules sont cultivées sur une période de 20 jours, des cellules étant prélevées à J1, J6, J10, J15 et J20 pour réaliser différents tests (viabilité cellulaire MTT, Dosage DNA, incorporation ^{35}S). Les résultats pour chacun des tests sont présentés dans la Figure IV. 17, Figure IV. 18 et Figure IV. 19. Les témoins étant représentés par des cellules cultivées sans nanoparticule.

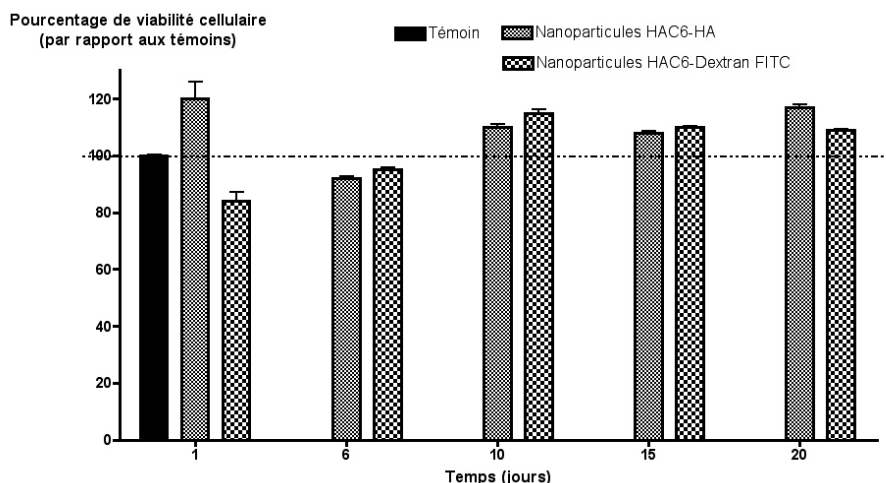


Figure IV. 17 : Analyse de la viabilité cellulaire des chondrocytes en billes d'alginate. Les cellules sont cultivées en présence de nanoparticules recouvertes de HA mais contenant soit de l'acide hyaluronique (HA) soit du dextrane-FITC. Les cellules sont ensuite placées en environnement tridimensionnel, et les tests de viabilité cellulaire sont réalisés à différents intervalles de temps, par la mesure de la réduction d'un sel de tétrazolum (MTT). Les DO obtenues sont lues à 580 nm.

Sur cette figure, il apparaît que les chondrocytes à J1 ne semblent pas avoir souffert de l'exposition aux nanoparticules, exception faite du groupe de nanoparticules contenant du Dextran-FITC (résultats concordant avec les études faites en monocouche) qui présente une diminution de 15% environ. Dès J6, tous les groupes de chondrocytes présentent la même activité mitochondriale, ce qui traduit une absence de toxicité, suite aux incubations réalisées avec les divers lots de nanoparticules. Ces résultats montrent que même si le Dextrane-FITC contenu dans les nanoparticules perturbe l'activité mitochondriale, les cellules une fois en billes retrouvent une activité mitochondriale (source d'énergie des chondrocytes en 3D) similaire à celle observée aussi bien avec les cellules témoin qu'avec les cellules exposées aux nanoparticules contenant du HA. Cette perturbation de l'activité des mitochondries ne semble pas se concrétiser par une mort des cellules, comme l'atteste la Figure IV. 18, où il apparaît que le nombre de cellules présent dans les billes est pratiquement identique dans les différents groupes, les différences observées au départ (J1 et J6) étant comblées dès J10. Ces deux résultats indiquent que les cellules ne semblent pas affectées par une exposition aux nanoparticules et que les perturbations des activités mitochondriales ne sont pas suffisantes pour entraîner une mort cellulaire. Les cellules exposées aux différents lots de nanoparticules

reprennent rapidement le même comportement en milieu tridimensionnel que les cellules non exposées.

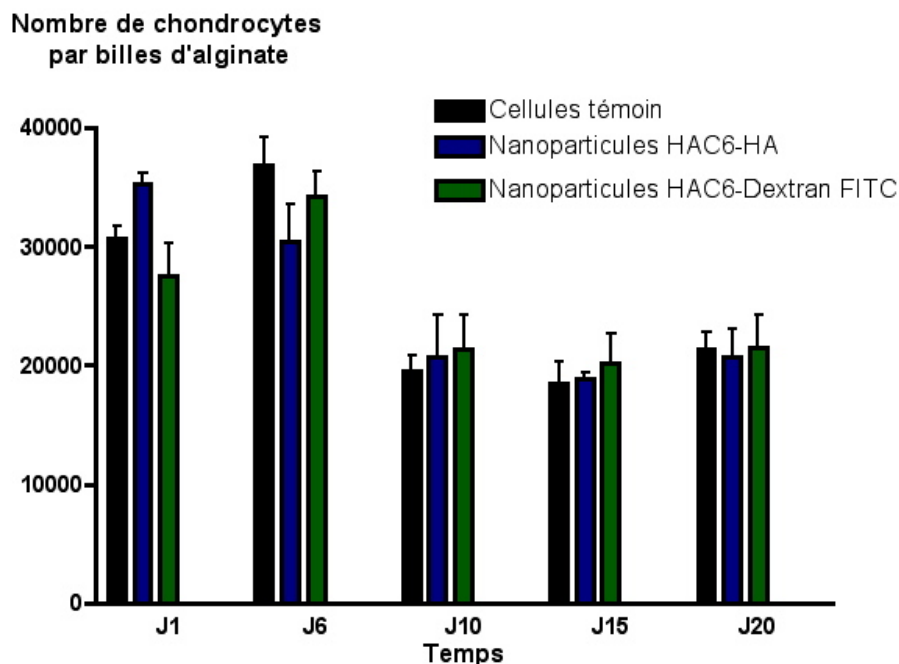


Figure IV. 18 : Evaluation de la densité des chondrocytes par bille d'alginate. Les cellules sont au préalable incubées avec les divers lots de nanoparticules puis cultivées en système tridimensionnel en billes d'alginate. Aux différents temps, des billes sont prélevées dans les différents groupes et des mesures de dosage d'ADN (Hoescht) sont réalisées. Les résultats sont exprimés en dpm / 1000 cellules et les résultats obtenus sont analysés par rapport au groupe témoin.

Les perturbations de l'activité mitochondriale observées à J1 ne semblent pas se traduire au niveau du métabolisme lorsque des mesures de l'activité de biosynthèse sont réalisées (incorporation de ^{35}S lors de l'élongation des chaînes de protéoglycanes) puisque les résultats d'incorporation (Figure IV. 19) ne montrent qu'une légère diminution dans les deux groupes de cellules encapsulées en billes et exposées aux nanoparticules à J1, par rapport aux cellules témoin et que ce retard semble se combler dès J6-J10.

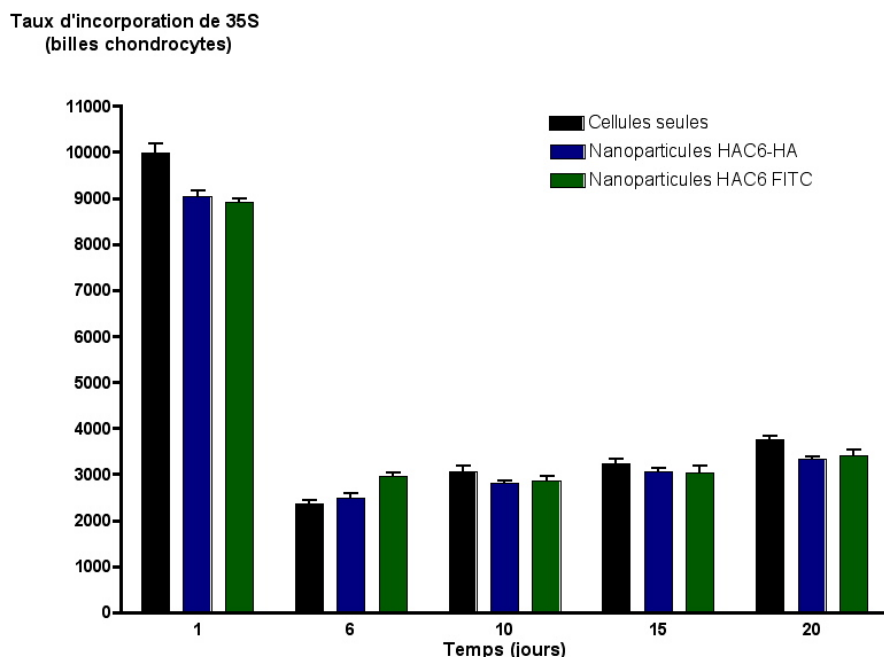


Figure IV. 19 : Cinétique d'incorporation de ^{35}S par les chondrocytes en milieu tridimensionnel.

Les cellules sont au préalable incubées avec les divers lots de nanoparticules puis cultivées en système tridimensionnel en billes d'alginate. Aux différents temps, des billes sont prélevées dans les différents groupes et des mesures d'incorporation de ^{35}S sont réalisées. Les résultats sont exprimés en dpm / 1000 cellules et les résultats obtenus sont analysés par rapport au groupe témoin.

Toutefois, il est difficile de déterminer la nature des constituants matriciels synthétisés par les cellules exposées aux différents groupes de nanoparticules, même si une étude préliminaire réalisée pour mesurer l'expression des constituants matriciels n'a pas montré de modification du type de protéines matricielles synthétisées. Des études complémentaires devront être effectuées afin de caractériser la nature des constituants de la matrice extracellulaire synthétisée par les différents groupes de chondrocytes, mais en utilisant des techniques permettant d'identifier les protéines. En effet la RT-PCR quantitative ne donne qu'un cliché à un instant précis et ne permet pas d'attester quantitativement de la présence d'une protéine (même si les expériences réalisées au laboratoire montrent une bonne corrélation entre des variations d'expression en ARN messagers et le taux de protéines présents). Il faut cependant garder à l'esprit que ces expériences avaient pour but de démontrer qu'une exposition des chondrocytes aux systèmes nanoparticulaires n'entraînait (1) pas de modifications dans leur capacité à synthétiser les constituants de la matrice extracellulaire et (2) une modification de leur aptitude à évoluer dans un milieu tridimensionnel.

I.3. ETUDE DE L'INTERACTION ET DU DEVENIR DES NANOPARTICULES
PAR MICROSCOPIE :

I.3.1. Objectifs :

Après avoir démontré que l'exposition des cellules articulaires à des systèmes nanoparticulaires obtenus par double émulsion ne provoquait pas de toxicité prononcée pour les cellules, que ces nanoparticules ne stimulaient pas la production par les cellules articulaires de médiateurs précoces de la réponse inflammatoire et qu'enfin, les chondrocytes ne voyaient pas leur capacités de biosynthèse des constituants matriciels altérées, nous nous sommes intéressés à démontrer l'intérêt du recouvrement des nanoparticules par l'acide hyaluronique (HA), afin de favoriser les interactions avec les cellules chondrocytaires. En effet, les données de la littérature ont montré que lors des pathologies articulaires, le cartilage exprimait un grand nombre de molécules CD44, partenaire privilégié de l'acide Hyaluronique. Des études préliminaires (données non présentées) ont montré que les différents types cellulaires (chondrocytes, synoviocytes) exprimaient des ARN messagers du CD44, expression confirmée par une immunolocalisation avec un anticorps anti-CD44 en microscopie de fluorescence. L'objectif de ces expériences est de confirmer l'hypothèse de travail, qui permettrait de favoriser les interactions nanoparticules-chondrocytes en recouvrant la surface de ces dernières avec du HA. Pour cela, deux approches complémentaires ont été utilisées, la microscopie confocale de fluorescence (suivi du traceur FITC présent sur le dextrane) et la microscopie électronique à balayage afin de visualiser la localisation des systèmes nanoparticulaires.

I.3.1.1. Microscopie confocale et nanoparticules Dextran-FITC

Les observations ont été effectuées selon plusieurs modalités afin d'apprécier l'affinité entre un type de nanoparticules et un contingent cellulaire défini (synoviocytes, chondrocytes).

Les modalités de manipulation retenues :

- Les cellules sont soit des chondrocytes (P2) soit des synoviocytes (P3).
- Les cellules sont pré-incubées avec un anti-CD44 afin de pouvoir apprécier l'implication de ces récepteurs dans une internalisation des nanoparticules.
- Deux lots de nanoparticules sont testés (contenant du dextrane-FITC). L'un est recouvert par du HAC6 (Dextrane-FITC/HAC6) et le second par de l'alcool polyvinylique (PVA) (dextrane-FITC/PVA).

- Les temps différents de contact entre les nanoparticules et les cellules sont étudiés soit : 6h, 12h et 24h.

Ces lots par comparaison croisée nous permettront de comparer l'effet du recouvrement, le dextrane-FITC permettant de suivre le devenir des nanoparticules après mise en contact de celles-ci avec les cellules articulaires.

Les différentes expériences sont réalisées avec une concentration en nanoparticules de 100 µg/ml.

Les observations réalisées en microscopie confocale de fluorescence sont complétées par des images prises en contraste de phase, ce qui permet de superposer les signaux de fluorescence avec les cellules.

Sur la Figure IV. 20, les chondrocytes et les synoviocytes sont incubés avec les nanoparticules recouvertes de HA et les images sont réalisées après différents temps de contact entre les cellules et les nanoparticules HAC6-Dextrane FITC (6h, 12h et 24h). Les images montrent une accumulation progressive de la fluorescence dès 6 heures de temps de contact, le maximum de fluorescence étant atteint à 24 heures (appréciation visuelle car en raison de l'autofluorescence des chondrocytes, l'analyse quantitative est rendue difficile/hasardeuse). Les signaux de fluorescence observés apparaissent sous forme de « spots de fluorescence » qui sont localisés sur ou à l'intérieur des cellules (confirmation par la superposition des images en microscopie de phase). Cependant, il est assez difficile d'affirmer la localisation intracellulaire des signaux de fluorescence même si, sur les images, ces derniers semblent localisés dans le cytoplasme des cellules, le noyau restant clairement visible. Des résultats similaires sont observés avec les synoviocytes (figure CDE), une différence d'intensité de la fluorescence et du nombre de cellules marquées étant observées. Ces résultats traduisent donc une interaction (internalisation ?) des nanoparticules recouvertes de HA avec les différents contingents cellulaires, une plus forte interaction semblant être obtenue avec les chondrocytes. Du fait de la diffusion du signal de fluorescence, il est à ce stade impossible de certifier que les nanoparticules sont internalisées mais il y a bien interaction entre les chondrocytes et les nanoparticules recouvertes de HA. Par contre, lorsque les cellules sont incubées avec des nanoparticules à base de PVA, seulement très peu de cellules présentent des spots de fluorescence, aussi bien lorsque les cellules sont des chondrocytes que des synoviocytes. Le marquage est toutefois un peu plus fort avec les synoviocytes mais n'est pas comparable avec les signaux observés avec les nanoparticules recouvertes de HA. Ce résultat peut s'expliquer (1) par le fait de la dégradation rapide des nanoparticules PVA (cf. cinétique

de relargage ou (2) par l'absence d'interaction entre la surface des nanoparticules et les cellules.

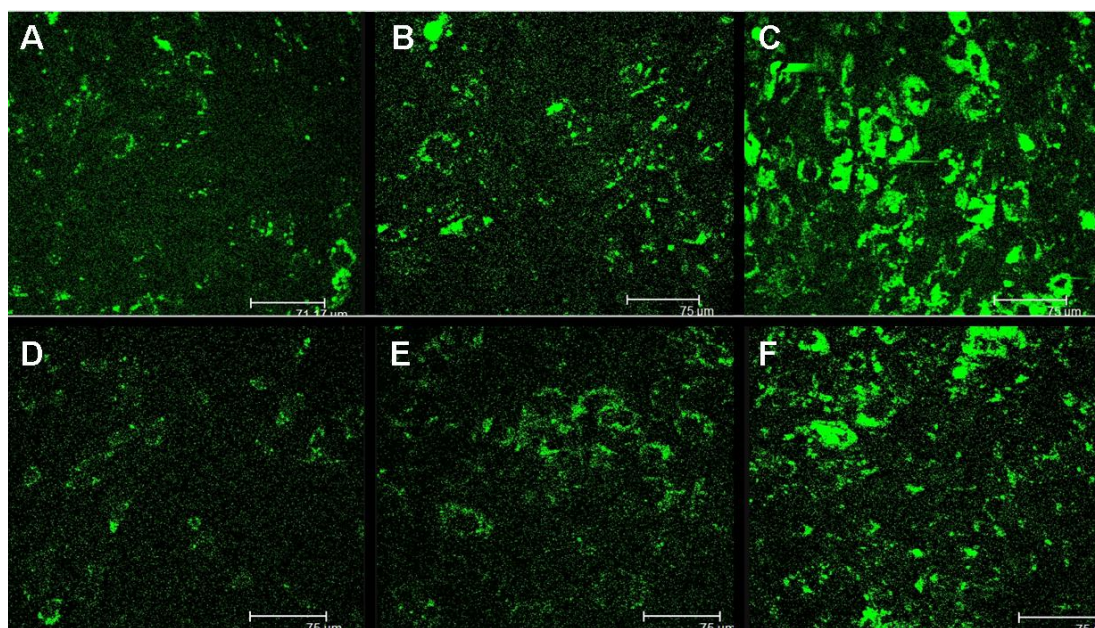


Figure IV. 20 : Photos au microscope confocale à fluorescence de chondrocytes de rat après contact avec les nanoparticules recouvertes de HA et encapsulant du dextrane-FITC.

Afin de pouvoir mettre le type d'interaction ou les partenaires impliqués lors de la mise en contact des nanoparticules recouvertes de HA (contenant du FITC) et chondrocytes, des expériences sont réalisées en ayant au préalable saturé les récepteurs CD44 à l'aide d'une d'anticorps anti-CD44 (5µg/ml). Puis les cellules sont récupérées afin d'être observées en microscopie confocale. Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure IV. 21 et il apparaît que les signaux de fluorescence sont moins importants (en nombre et en intensité) lorsque les cellules sont pré-incubées avec l'anticorps anti-CD44. Il faut aussi noter qu'il existe de nombreuses isoformes du CD44 et que l'anticorps ne possède pas la capacité de bloquer les différentes isoformes, ce qui pourrait expliquer d'éventuelles interactions.

Toutefois, il faut noter que le blocage n'est pas complet soit parce que la quantité et la durée d'incubation avec les cellules n'étaient pas suffisantes (expériences complémentaires en cours) soit parce que les cellules ont pu malgré tout internaliser des nanoparticules. Il semble donc que l'interaction entre les nanoparticules recouvertes de HA et les chondrocytes fasse en partie intervenir le récepteur CD44, présent à la surface des cellules. Cependant, la faible internalisation détectée avec le lot recouvert de PVA tendrait à montrer que ce mécanisme requiert la présence du récepteur CD44, mais que d'autres voies d'internalisation ne nécessitant pas la présence de cette protéine.

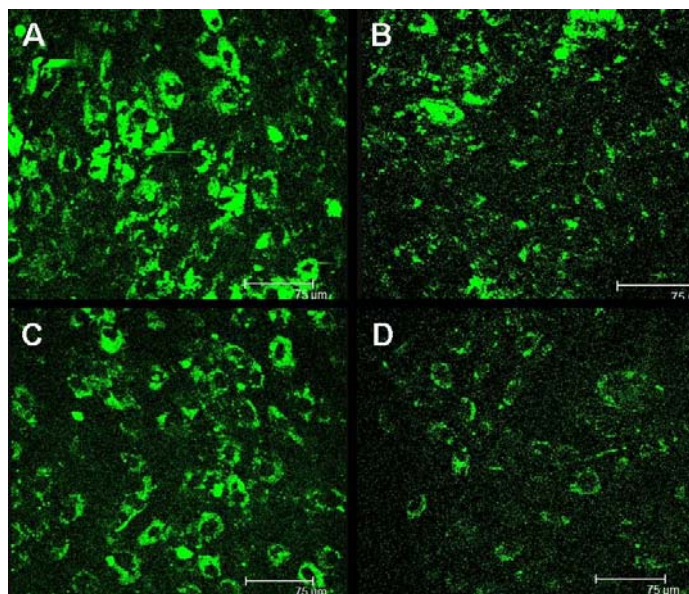


Figure IV. 21 : Photos au microscope confocal à fluorescence de chondrocytes de rat après blocage des CD44 par son anti corps spécifique et après contact avec les nanoparticules recouvertes de HA et encapsulant du dextrane-FITC.

1.3.1.2. Localisation des nanoparticules par microscopie électronique à balayage MEB.

Les images obtenues en microscopie confocale (confirmées par la microscopie à contraste de phase) ont clairement montrées une localisation des nanoparticules à proximité ou en position intra-cytoplasmique mais il n'a pas été clairement possible d'établir l'internalisation de ces dernières. Afin de confirmer cette localisation dans le cytoplasme, des observations sont réalisées en microscopie électronique à balayage, afin de déterminer la position des nanoparticules (surface ou cytoplasme). Les images obtenues avec des chondrocytes cultivés en présences des nanoparticules HAC6-dextrane FITC sont présentées sur la Figure IV. 22. Sur ces images, il apparaît nettement que les signaux observés en microscopie confocale sont en fait des vésicules intracytoplasmiques et que leur localisation est située en périphérie du noyau des cellules. Sur ces clichés en MEB, l'internalisation dans le cytosol de la cellule est clair et à l'utilisation d'un fort grossissement permet de montrer les repliements de la membrane plasmique sur les nanoparticules démontrant de façon certaine leur internalisation. En comparant les images obtenues en microscopie confocale et celles obtenues en microscopie électronique à balayage, il est clair que les signaux (spots) détectés en fluorescence correspondent à des vésicules d'internalisation des nanoparticules contenant le Dextrane-FITC, ceci étant confirmés par les observations réalisées en MEB.

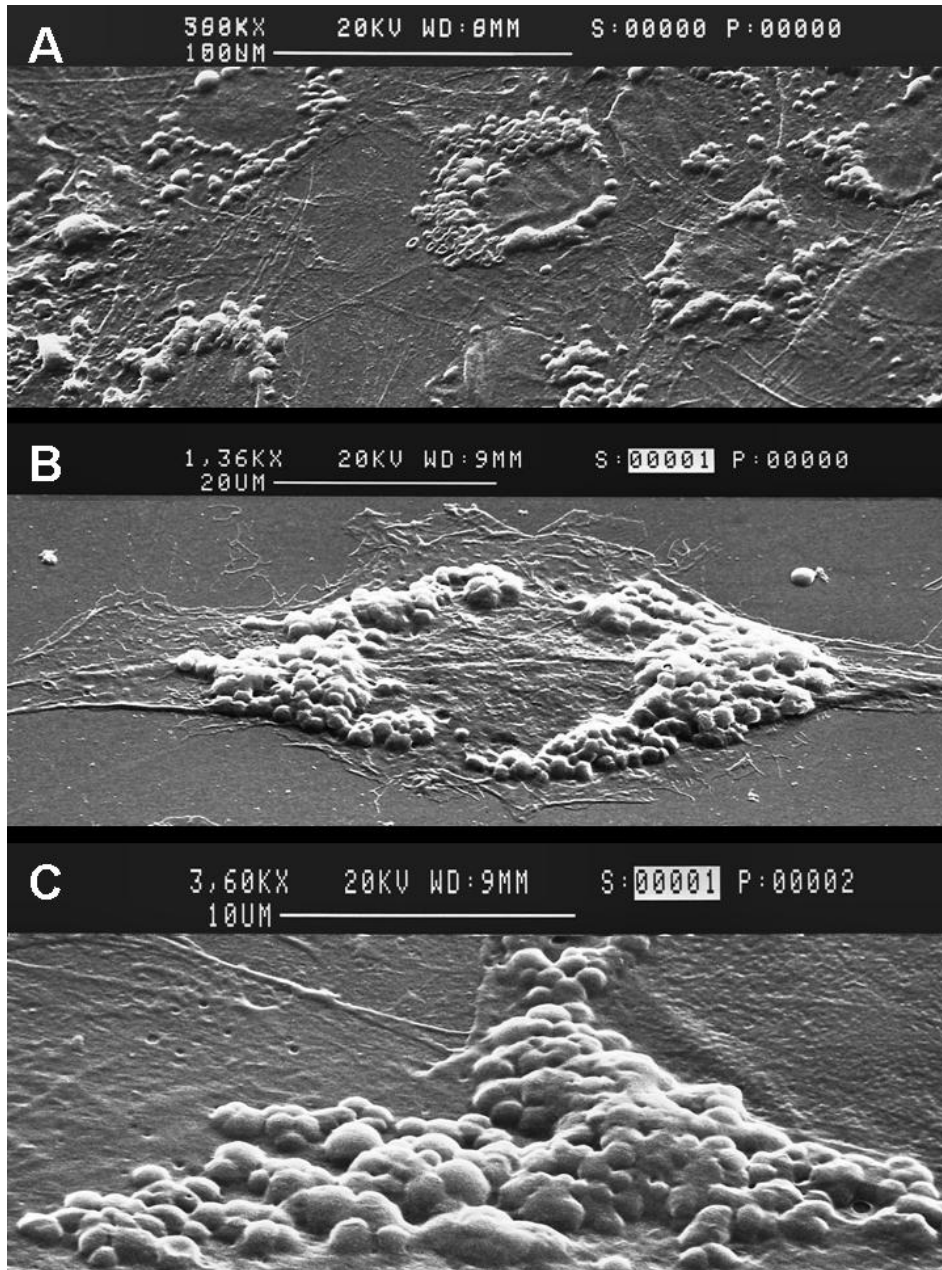


Figure IV. 22 : Images des chondrocytes incubés en présence de nanoparticules HAC6-Dextrane FITC

Cette interaction est cependant uniquement observée avec les lots de nanoparticules recouverts de HA, contenant ou non une molécule traceur. Des essais réalisés (données non présentées) avec des nanoparticules recouvertes de HAC6 mais contenant du HA ont montré la présence de vésicules en périphérie du noyau. Des résultats similaires ont été obtenus en incubant des synoviocytes avec des nanoparticules recouvertes de HAC6-dextrane FITC, mettant en évidence une internalisation des nanoparticules dans différents types cellulaires.

II. Evaluation des effets biologiques des nanoparticules in vivo.

II.1. MATERIELS ET METHODES

II.1.1. Animaux

Toutes les études ont été réalisées chez les rats (Wistar, Charles River, Saint-Germain sur l'Arbresle, France) mâles (150 à 175 g). Ils sont installés dans une animalerie thermorégulée ($24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), dont l'air est renouvelé, et dans laquelle des cycles diurnes (6 h à 18 h) et nocturnes (18 h à 6 h) alternent régulièrement. Les rats sont placés par trois à cinq dans des cages en plastique, avec accès à une nourriture standardisée et de l'eau *ad libitum*. Les expérimentations débutent après une période d'acclimatation des animaux d'une durée de deux à sept jours.

Une quantité de 40 μl d'une suspension, contenant les nanoparticules, reconstituée dans du NaCl 0,9 % est injectée dans le genou du rat sous anesthésie (Isoflurane 1.5% Oxygène) par voie intraarticulaire infrapatellaire. Les animaux sont suivis régulièrement après leur réveil afin de s'assurer de l'absence d'effets secondaires dus à l'injection et/ou à l'anesthésie.

II.1.1.1. Protocole expérimental

Sacrifice :

Après anesthésie par injection intra-péritonéale d'un mélange d'hydrochlorure de kétamine (37,6 mg/kg) / (Imalgene 500, Merial, Saint-Priest, France) et d'acépromazine (1,25 mg/kg) / (Vetranquil, Ceva Santé Animale, Libourne, France), les animaux sont sacrifiés par dislocation cervicale, puis disséqués.

Histologie :

i) Préparation des échantillons

L'articulation du genou est prélevée, puis les tissus sont fixés dans du paraformaldéhyde 4 % (v/v) (Sigma, Saint-Quentin Fallavier) dans du PBS (pH 7,4), pendant 8 heures, décalcifiés (Rapide Décalcifiant Osseux, Eurobio) et déshydratés dans des bains d'alcool de concentrations croissantes. Les prélèvements sont ensuite inclus dans la paraffine, et des

coupes histologiques parallèles à la surface du cartilage de 5 µm sont réalisées à l'aide d'un microtome (LEICA RM 2135).

ii) Les différentes colorations utilisées

Après déparaffinage et réhydratation, les coupes sont colorées de 3 façons différentes.

* Hématoxyline – Eosine - Safran

L'HES est une coloration standard, qui permet de visualiser les cellules ainsi que les constituants matriciels. L'hématoxyline (0.5 %, 5 minutes) colore les noyaux en bleu foncé, l'éosine (1 %, 5 minutes) se fixe sur les éléments acidophiles et leur confère une coloration rose (cytoplasme, fibres nerveuses, fibres élastiques et musculaires) et le safran (1%, 5 minutes) se lie aux collagènes et à certaines protéines, telles que la chondrine (coloration jaune). Les lames sont ensuite déshydratées et montées avec une résine synthétique (Vogel, Bayer diagnostic, France).

*Bleu de toluidine

Le bleu de toluidine est une coloration métachromatique permettant la mise en évidence de glycosaminoglycanes carboxylés, sulfatés ou phosphatés. La coloration au bleu de toluidine nécessite une incubation de cinq minutes, dans une solution à 1 %. Les lames sont plongées dans l'acétone, dans l'alcool absolu, puis déshydratées. Le montage des lames est réalisé avec une résine synthétique (Vogel).

Rouge Sirius

Le rouge Sirius est un colorant anionique du collagène. La réaction se produit entre les groupements sulfoniques du colorant et les groupements basiques présents sur les molécules de collagène [Constantine, 1968]. La coloration au rouge Sirius est réalisée avec une solution saturée en acide chlorhydrique 0,01 N pendant 2 minutes, puis avec une solution d'alcool à 95°, et enfin, un bain d'alcool absolu pendant 2 minutes. Les lames sont ensuite déshydratées et montées avec une résine synthétique (Vogel). Les sections colorées au rouge Sirius sont dans un premier temps observées en lumière classique, puis en lumière polarisée en disposant les lames à 45° sous un microscope équipé de deux filtres spécifiques. La lumière polarisée permet de visualiser l'architecture du réseau collagénique.

II.1.1.2. Mesure de la biosynthèse des protéoglycanes

Les protéoglycanes sont des constituants majeurs du cartilage hyalin. L'agrécan, présent en quantité équimolaire avec les petits PGs, biglycane, décorine et fibromoduline, est constitué de 150 chaînes de GAG sulfatés environ, qui représentent près de 90 % de sa masse

moléculaire. L'incorporation de $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ dans le cartilage patellaire constitue ainsi un reflet de la synthèse des PGs.

Nous avons adapté, chez le rat, une méthode développée par [4-7] pour apprécier la synthèse des PGs dans le cartilage patellaire. Elle consiste à mettre en culture les explants dans un milieu (RPMI 1640 HEPES- HCO_3 , Invitrogen ; trois heures, 37 °C, 5 % CO_2) supplémenté en L-glutamine (2 mM), en antibiotiques et en $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ (0,7 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$; Dupont-Nemours, France). Plusieurs lavages (sérum physiologique) permettent d'éliminer le $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ non incorporé. Les rotules sont ensuite décalcifiées (acide formique 5 % (v/v)) et une biopsie centropatellaire est réalisée (2 mm de diamètre, Stiefel). Les échantillons sont solubilisés (Soluène-350, Packard, Rungis, France ; 0,5 ml) et la quantité de ^{35}S incorporé est déterminée par un compteur de radioactivité après l'ajout d'un liquide scintillant (Hionic-Fluor, Packard ; 4,5 ml).

II.1.2. Biologie Moléculaire

II.1.2.1. Membranes synoviales

Les membranes synoviales de rat sont conservées congelées à -80 °C. La membrane est broyée à l'aide d'un piston préalablement autoclavé. Le broyat est mis en suspension dans une solution de RLT supplémentée de β -mercaptoéthanol. Après dix minutes d'incubation, le mélange est déposé sur colonne Qiashredder (Qiagen) afin d'ôter les débris tissulaires. Après centrifugation, la solution purifiée est supplémentée avec 600 μl d'éthanol 70°, et passée sur colonne RNeasy, la suite de l'extraction s'effectue de la même manière que pour l'extraction d'ARN à partir de cellules en culture.

II.1.2.2. Vérification de l'intégrité des ARN totaux

i) Dosage spectrophotométrique :

Ce dosage permettra d'effectuer l'étape de transcription inverse à partir de la même quantité d'ARN totaux dans tous les échantillons. La quantité d'ARN est mesurée par spectrophotométrie à 260 nm. La concentration en ARN est donnée par la formule suivante : $[\text{ARN}] = A_{260} \times 1/D \times 40 \mu\text{g}/\text{ml}$, où D = facteur de dilution de l'échantillon.

Parallèlement, le rapport A_{260}/A_{280} doit être compris entre 1,8 et 2, pour témoigner de la pureté de nos extraits d'ARN vis-à-vis des protéines.

ii) Migration sur gel d'agarose :

Afin de vérifier que les ARN récupérés ne sont pas dégradés, on effectue une migration sur gel d'agarose 1 %. Les dépôts sont composés de 2 µl d'extrait d'ARN additionnés de 5 µl de bleu de charge. Un agent intercalant des acides nucléiques, le BEt (Bromure d'Ethidium, Eurobio) est ajouté au gel d'agarose. Il permet de révéler les bandes sous UV. Les extraits d'ARN dégradés donnent sur gel une traînée diffuse, alors que s'ils ne le sont pas, nous pouvons observer deux bandes distinctes qui correspondent aux ARN majoritaires, 18S et 28S.

iii) Transcription inverse (iScript™) :

Cette enzyme est obtenue par une modification de la transcriptase inverse dérivée du M-MLV qui lui confère une plus grande sensibilité. Ainsi, son utilisation s'avérera nécessaire pour transcrire des échantillons d'ARNm tels ceux issus du cartilage rotulien de rat. En effet, les ARN totaux extraits sont très faiblement concentrés. Ces ARN sont mis au contact de 4 µl de solution 5X iScript Reaction Mix, et de 1 µl d'enzyme (iScript Reverse transcriptase), les réactifs proviennent du « iScript cDNA Synthesis Kit » (Bio-rad, Marnes-la-coquette, France). Le volume final étant de 20 µl nous avons choisi, de travailler systématiquement avec 15 µl d'ARN totaux. De ce fait, les études de PCR qui suivront, devront impérativement comprendre l'étude de l'expression d'un gène de ménage afin de normaliser les résultats. La réaction de transcription inverse comprend deux étapes d'incubation, 5 minutes à 25 °C suivies de 30 minutes à 42 °C. Enfin, les ARN restants sont dénaturés par la chaleur durant 5 minutes à 85 °C. Les échantillons d'ADNc seront conservés à -20 °C jusqu'à leur utilisation.

II.2. RESULTATS / DISCUSSION.

Afin de vérifier l'innocuité des différents lots de nanoparticules, des expériences chez le rat sain ont été réalisées. Les animaux ont reçus une injection bilatérale de 40 µl de suspension, contenant les nanoparticules (PVA/dextrane FITC, HA/dextrane FITC, 50 µg/ml) sous anesthésie, puis les rats ont subis un examen clinique quotidien afin d'observer une réponse physiologique suite à l'injection. Les animaux du groupe témoin ont reçu une injection de sérum physiologique d'un même volume. Aucun signe local d'inflammation (absence

d'œdème) n'a été observé chez les animaux ayant reçu soit les nanoparticules à base PVA soit les nanoparticules recouvertes d'acide hyaluronique.

II.2.1. Analyse histologique des tissus articulaires :

II.2.1.1. Contexte et objectifs :

Les animaux ont été sacrifiés au 5^{ème} jour après l'injection (au vu des résultats obtenus lors des cinétiques de relargage), une partie des tissus articulaires étant préparée pour des études en biologie moléculaire, l'autre partie étant dédiée à des analyses plus classiques (histologie, biosynthèse des PGs). Il faut noter que lors du prélèvement des tissus articulaires (membrane synoviale, cartilage rotulien, plateaux fémoraux-tibiaux), il n'a pas été observé de d'altérations caractéristiques de la présence d'une réaction inflammatoire (liquide synovial peu abondant, membrane synoviale peu vascularisée et non invasive, c'est à dire ne recouvrant pas la surface articulaire rotulienne).

II.2.1.2. Résultats histologiques :

Après préparation des échantillons (membrane synoviale, cartilage), les tissus articulaires ont été analysés par histologie classique (HES, BT, RS LP) afin d'observer la présence de modifications liées au processus inflammatoire. Les images obtenues avec les différentes colorations sont présentées dans la Figure IV. 23 et Figure IV. 24.

La membrane des animaux des différents groupes présente quelques feuillets de cellules synoviocytaires, indiquant une réponse de la membrane synoviale à l'injection (sérum physiologique et nanoparticules). Par contre, il n'y a pas d'altérations plus prononcées chez les animaux ayant reçus des nanoparticules (pas de néovascularisation, faible fibrose au niveau de l'assise) ou de différence entre les deux groupes, ce qui implique que les systèmes nanoparticulaires (PVA et/ou HA, dextrane FITC) n'entraîne pas la mise en place d'un processus inflammatoire au niveau de l'articulation suite à l'injection. Des résultats similaires (non présentés) ont été obtenus sur des animaux plus âgés (6 semaines de plus), indiquant qu'il n'y avait pas de modifications de la réponse inflammatoire aux nanoparticules en fonction de l'âge des animaux.

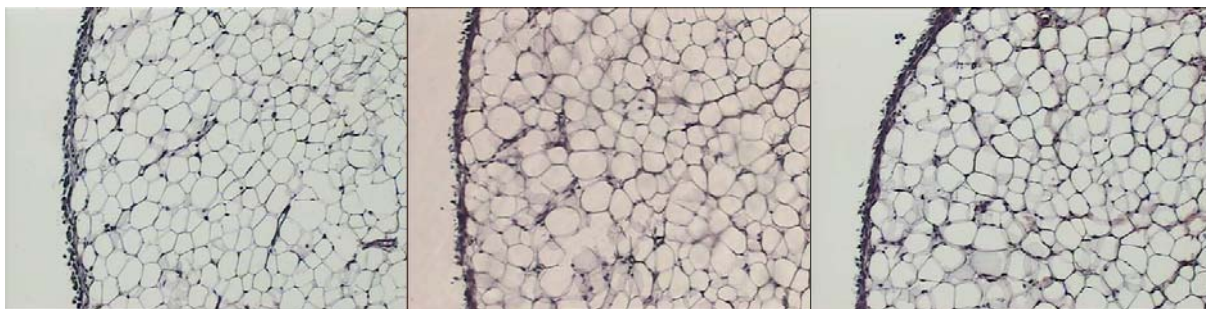


Figure IV. 23 : Analyse histologique (H&S) de la membrane synoviale des animaux, exposés à une injection des nanoparticules.

A : membrane synoviale des animaux du groupe témoin (injection de sérum physiologique, 40 μ l ia)

B : membrane synoviale des animaux du groupe Dextrane-FITC/PVA (injection bilatérale, 40 μ l ia)

C : membrane synoviale des animaux du groupe Dextrane-FITC/HAC6 (injection bilatérale, 40 μ l ia)

Les coupes réalisées à partir du cartilage articulaire rotulien ont été analysées avec différentes colorations et les images sont présentées dans la Figure IV. 23. La coloration H&S (hématoxyline, Safran) permet d'apprécier la cellularité dans le cartilage rotulien et pour les 3 groupes étudiés, il n'y a pas de modification de cette cellularité. Comme le montrent les images (A, B et C sur la Figure IV. 24), les 3 coupes de tissu présentent une densité cellulaire similaire, avec la présence de nombreux chondrocytes hypertrophiques à la limite de l'os sous-chondral. La surface du cartilage est régulière et il n'y a pas d'envahissement/recouvrement du cartilage par la membrane synoviale.

L'observation des coupes histologiques colorées au bleu de Toluidine, qui permet d'apprécier le contenu en protéoglycanes, n'a pas révélé de différences quantitatives entre les animaux des différents groupes. Cette analyse n'a pas montré de variation d'intensité de la coloration qui aurait pu traduire une modification quantitative du contenu en protéoglycanes du cartilage et donc une altération des propriétés mécaniques du tissu.

La visualisation du réseau collagénique au rouge Sirius n'a pas permis de mettre en évidence des différences entre les groupes étudiés, que ce soit en lumière directe ou en lumière polarisée (modification de l'organisation du réseau des fibres de collagènes).

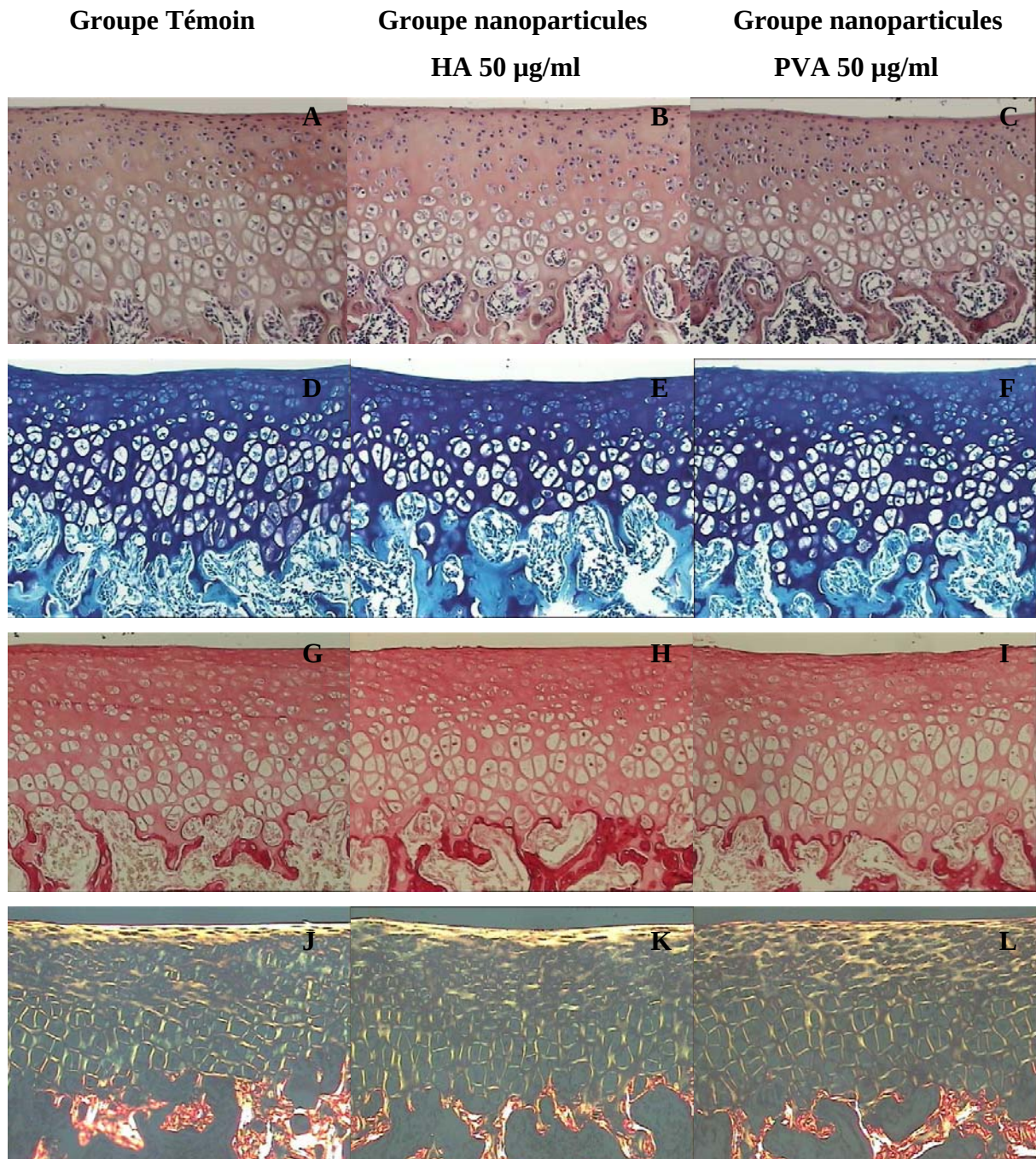


Figure IV. 24 : Analyse histologique du cartilage articulaire rotulien après injection des nanoparticules par voie intra-articulaire. Les rotules sont prélevées sur les animaux lors d u sacrifice puis fixées dans du PAF 4%. Après déshydratation, les prélèvements sont inclus en paraffine et des coupes de 5 µm sont réalisées. Les différentes colorations sont réalisées sur des coupes adjacentes de cartilage et observées en microscopie optique (grossissement : 10 x 4).

A, B, C : coloration Hématoxyline-Eosine-Safran: groupe témoin / groupe Dextrane-FITC / PVA, groupe Dextrane-FITC / HAC6

D, E, F : coloration bleu de toluidine: groupe témoin / groupe Dextrane-FITC / PVA, groupe Dextrane-FITC / HAC6

G, H, I : coloration rouge Sirius: groupe témoin / groupe Dextrane-FITC / PVA, groupe Dextrane-FITC / HAC6

J, K, L : coloration rouge Sirius en lumière polarisée: groupe témoin / groupe Dextrane-FITC / PVA, groupe Dextrane-FITC / HAC6

L'analyse histologique des tissus articulaires (membrane synoviale, cartilage) n'a pas mis en évidence de modifications de la structure des tissus, ce qui semble indiquer une absence d'effets délétères des nanoparticules, quelque soit le recouvrement de ces dernières (PVA ou HA). Ces résultats ont été également confirmés sur des animaux plus âgés, traduisant une innocuité des systèmes nanoparticules sur les tissus articulaires indépendamment de l'âge des animaux.

II.2.2. Etude de la biosynthèse des protéoglycanes du cartilage patellaire.

II.2.2.1. Objectifs :

Afin de confirmer les résultats obtenus lors de l'analyse histologique des différents compartiments articulaires, notamment lors de la coloration au Bleu de Toluidine, une analyse de l'activité de biosynthèse des protéoglycanes a été réalisée par incorporation de Soufre radiomarké ($\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$) au niveau du cartilage patellaire (centre et périphérie). Ces expériences ont été effectuées aussi bien chez le rat immature que chez le rat mature.

II.2.2.2. Résultats de l'étude de biosynthèse :

Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure IV. 25 et Figure IV. 26.

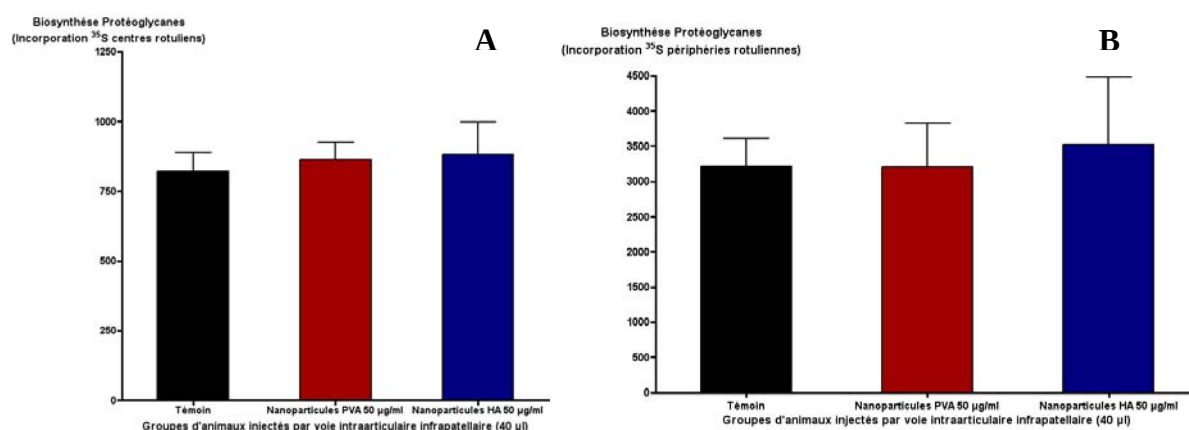


Figure IV. 25 : Effet d'une injection intra-articulaire (ia) de nanoparticules sur l'activité de biosynthèse des protéoglycanes du cartilage rotulien. La synthèse des protéoglycanes a été évaluée par la mesure de l'incorporation de $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ 5 jours après l'injection ia des nanoparticules (50 µg/ml).

A : incorporation de $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ au centre de la rotule (noir : témoin ; rouge nanoparticules PVA ; bleu nanoparticules HA)

B : incorporation de $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ en périphérie de la rotule $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$, (noir : témoin ; rouge nanoparticules PVA ; bleu nanoparticules HA)

Cinq jours après l'injection des nanoparticules (PVA- et HA-dextrane FITC), l'incorporation de soufre radiomarqué dans le centre de la rotule n'est pas modifiée par rapport au groupe témoin, et ceci quelle que soit la nature des nanoparticules utilisées. Il en est de même avec le taux d'incorporation observé avec les périphéries des rotules.

Des résultats similaires sont obtenus lorsque les nanoparticules sont injectées dans l'articulation d'animaux plus âgés (Figure IV. 26).

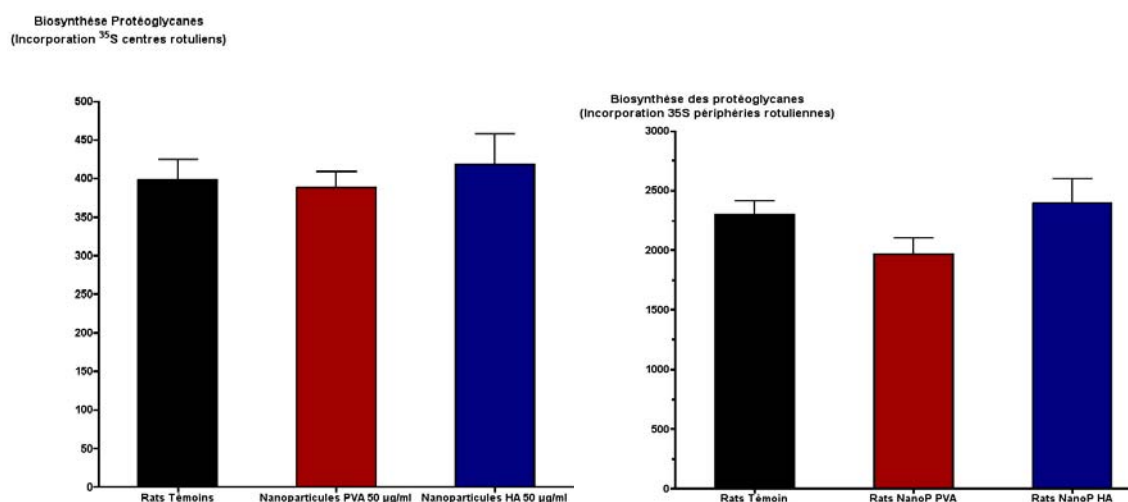


Figure IV. 26 : Effet d'une injection intra-articulaire (ia) de nanoparticules sur l'activité de biosynthèse des protéoglycanes du cartilage rotulien. La synthèse des protéoglycanes a été évaluée par la mesure de l'incorporation de $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$, 5 jours après l'injection ia des nanoparticules (50 $\mu\text{g/ml}$).

A : incorporation de $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ au centre de la rotule (noir : témoin ; rouge nanoparticules PVA ; bleu nanoparticules HA)

B : incorporation de $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ en périphérie de la rotule $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$, (noir : témoin ; rouge nanoparticules PVA ; bleu nanoparticules HA)

Cette absence de modification du taux d'incorporation de soufre radio marqué dans le centre de la rotule indique un maintien de l'homéostasie du cartilage, puisque un effet délétère des nanoparticules se serait traduit par une diminution de l'activité de biosynthèse au centre et une augmentation de la biosynthèse en périphérie, cette augmentation se confirmant par l'apparition d'ostéophytes (formation de clusters non observée en histologie).

II.2.3. Analyse de l'expression des médiateurs de la réponse inflammatoire

Une confirmation de l'absence d'effets pro-inflammatoires suite à l'injection intra-articulaire des biomatériaux nanostructurés a été réalisée en étudiant l'expression des ARN messagers de certains médiateurs précoces de la réponse inflammatoires, l'interleukine-1 β et le TNF alpha. Les membranes synoviales des animaux ont été prélevées cinq jours après l'injection et les ARNm extraits analysés par RT-PCR quantitative en temps réel. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure IV. 27 et Figure IV. 28 et montrent que les taux d'expression des deux cytokines est similaire dans les groupes d'animaux injectés avec les différentes formulations de nanoparticules au taux d'expression de ces deux médiateurs dans le groupe témoin, ayant uniquement subi une injection de sérum physiologique.

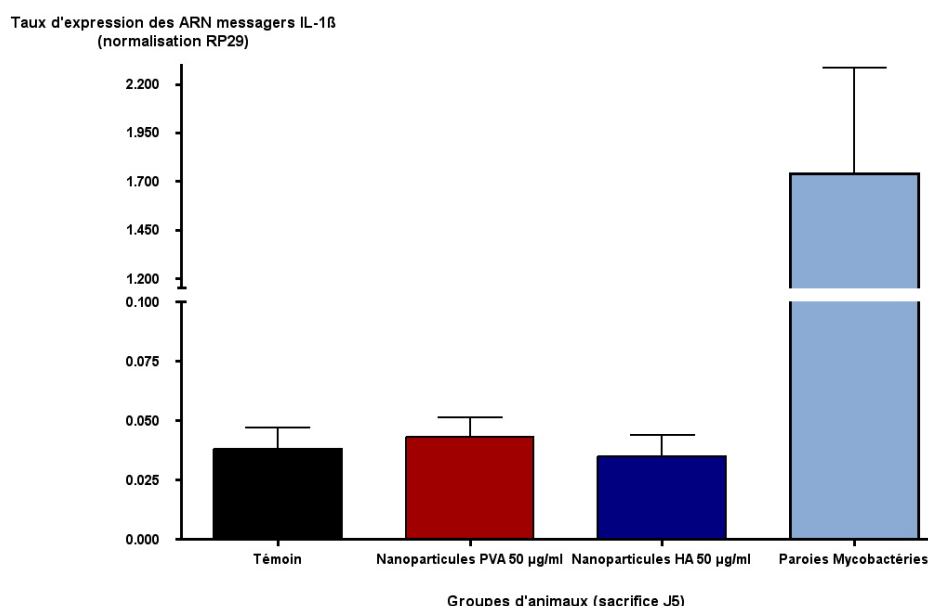


Figure IV. 27 : Analyse de l'expression des ARN messagers de l'IL-1 β par les membranes synoviales de rat. Les membranes synoviales sont récupérées lors du sacrifice puis les ARN totaux sont extraits, rétrotranscrits puis amplifiés. Les résultats présentés sur le graphique représentent l'expression d'IL-1 β , exprimée par les cellules de la membrane synoviale des rats exposés aux différents lots de nanoparticules pendant 5 jours.

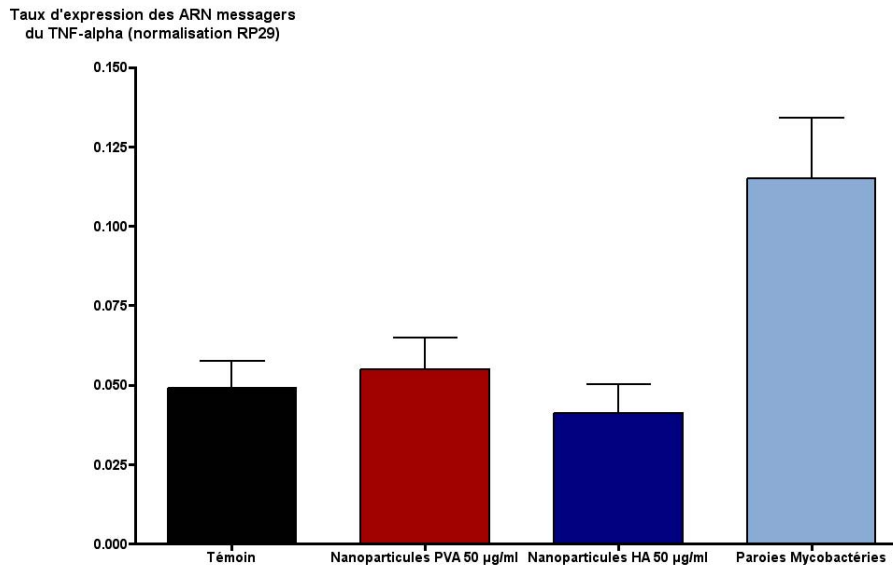


Figure IV. 28 : Analyse de l'expression des ARN messagers du TNF-alpha par les membranes synoviales de rat. Les membranes synoviales sont récupérées lors du sacrifice puis les ARN totaux sont extraits, rétrotranscrits puis amplifiés. Les résultats présentés sur le graphique représentent l'expression du TNF-alpha, exprimée par les cellules de la membrane synoviale des rats exposés aux différents lots de nanoparticules pendant 5 jours.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus lors de l'analyse histologique, c'est à dire que les injections des nanoparticules ne semblent pas stimuler une réaction inflammatoire locale et que les produits de dégradations provenant des nanoparticules ne provoquent pas de réaction inflammatoire secondaire.

Bibliographie

1. Vila A., Sanchez A., Evora C., Soriano I., Vila Jato J.L. and Alonso M.J., *PEG-PLA nanoparticles as carriers for nasal vaccine delivery*, J Aerosol Med, 2004, **17**: p. 174-185.
2. Tobio M., Sanchez A., Vila A., Soriano I.I., Evora C., Vila-Jato J.L. and Alonso M.J., *The role of PEG on the stability in digestive fluids and in vivo fate of PEG-PLA nanoparticles following oral administration*, Colloids Surf B Biointerfaces, 2000, **18**: p. 315-323.
3. Sun W., Xie C., Wang H. and Hu Y., *Specific role of polysorbate 80 coating on the targeting of nanoparticles to the brain*, Biomaterials, 2004, **25**: p. 3065-3071.
4. Van Den Berg W.B., Kruysen M.W.M. and Van De Putte L.B.A., *The mouse patella assay. An easy method of quantitating articular cartilage chondrocyte function in vivo and in vitro.*, Rheumatol Int, 1982, **1**: p. 165–169.
5. Gegout P., Gillet P., Chevrier D., Guingamp C., Terlain B. and Netter P., *Characterization of zymosan-induced arthritis in the rat: effects on joint inflammation and cartilage metabolism*, Life Sci, 1994, **55**: p. 321-326.
6. Guingamp C., Gegout-Pottie P., Philippe L., Terlain B., Netter P. and Gillet P., *Mono-iodoacetate-induced experimental osteoarthritis: a dose-response study of loss of mobility, morphology, and biochemistry*, Arthritis Rheum, 1997, **40**: p. 1670-1679.
7. Grossin L., Cournil-Henrionnet C., Mir L.M., Liagre B., Dumas D., Etienne S., Guingamp C., Netter P. and Gillet P., *Direct gene transfer into rat articular cartilage by in vivo electroporation*, Faseb J, 2003, **17**: p. 829-835.

CONCLUSION

CONCLUSION

La vectorisation de molécules d'intérêt thérapeutiques par utilisation de nanoparticules polymères est un projet ambitieux et compliqué mais dont les applications potentielles sont réelles. Il est possible de transporter *in vivo* des molécules bioactives en les protégeant contre les différents types d'agression, de prolonger leur durée de vie assurant ainsi leur libération progressive. Le concept de ciblage permet d'orienter la libération dans un site précis. Parmi les différents types d'adressage, le ciblage actif utilise la reconnaissance spécifique entre la surface des nanoparticules et, par exemple, un récepteur membranaire des cellules cibles.

Ce domaine pharmacologique peut s'appliquer aux propriétés et aux spécificités du cartilage et de ses différents constituants. Les différentes pathologies de ce tissu ont été évoquées dans ce travail ainsi que les divers moyens de les traiter, notamment les traitements pharmacologiques qui utilisent des anti-inflammatoires non stéroïdiens ou des «anti-arthrosiques» d'action lente (AAL). Ainsi on sait que les cellules qui le composent, les chondrocytes et les synoviocytes, présentent en surface un récepteur spécifique de l'acide hyaluronique, le CD44.

L'un des objectifs de cette thèse était de préparer des nanoparticules polymères (bio)dégradables pour vectoriser des AAL et, pour permettre leur libération à proximité ou à l'intérieur des chondrocytes. Nous avons envisagé de disposer à la surface des nanosphères, des chaînes d'acide hyaluronique afin de promouvoir leur reconnaissance par les chondrocytes ou les synoviocytes.

Pour se faire, la synthèse et la caractérisation de 3 dérivés amphiphiles de HA destinés à stabiliser l'émulsion secondaire du procédé d'émulsion/évaporation de solvant et à produire des nanoparticules à cœur de PLA et couronne de HA ont été effectués.

Les conditions des synthèses ont été prévues de façon à obtenir des HA modifiés hydrosolubles et au caractère hydrophobe peu marqué pour éviter de trop fortes propriétés associatives en milieu aqueux. Afin de faciliter l'émulsification, il nous a semblé utile d'avoir des solutions de HA amphiphiles peu visqueuses et des polymères susceptibles de diffuser rapidement vers les interfaces liquide/liquide.

C'est pourquoi nous avons fixé sur le HA des chaînes alkyles peu hydrophobes (à 6 ou 12 atomes de carbone) ou des groupements -CH₂-CH₂-Phe de faibles taux de substitution. Les taux obtenus ont été les suivants :

- HAC₆-14%
- HAC₁₂-5,5%
- HAPhe-10%

Conclusion générale

Nous avons ensuite caractérisé les propriétés physico-chimiques de ces 3 dérivés. Cependant le HAPhe-10% s'étant révélé très peu soluble dans l'eau (présence de nanoagrégats de l'ordre de 50 nm à 1 g/L), nous l'avons abandonné dans la suite au profit des HA alkylés.

Nous avons montré que ces HAC_n avaient une viscosité intrinsèque plus faible que celle du HA non modifié, preuve que des interactions hydrophobes intramoléculaires s'établissent en milieu aqueux. Enfin contrairement au HA natif sans réel potentiel tensioactif en solution aqueuse, le greffage des chaînes alkyle C6 ou C12 sur le HA natif a permis dans les deux cas d'abaisser la tension interfaciale air/eau.

Ainsi, nous avons pu répéter les réactions de synthèse pour préparer des nanoparticules en quantité suffisante en vue d'effectuer les expériences d'évaluation biologique.

Ces nanoparticules ont été élaborées principalement à partir des deux HAC_n et nous avons fait varier les paramètres de préparation afin de pouvoir établir des relations entre ces paramètres et les caractéristiques des nanosphères obtenues. Cette dernière partie du travail de physico-chimie a concerné donc la mise au point d'un protocole permettant une synthèse reproductible de nanoparticules répondant à notre cahier des charges en termes de taille, de recouvrement surfacique et de taux d'encapsulation. Nous avons montré qu'il est possible de préparer des nanoparticules de PLA recouvertes de HA en utilisant un procédé de double émulsion/évaporation de solvant avec un HA amphiphile comme stabilisant de l'émulsion secondaire (HAC₆, HAC₁₂ et HAPhe). Nous avons également montré que des principes actifs polysaccharidiques (HA, chondroïtine sulfate et héparine) pouvaient être encapsulés en les dissolvant initialement dans la phase aqueuse de l'émulsion primaire.

Nous avons constaté que la synthèse de nanoparticules était reproductible en termes :

- de taille finale : les nanoparticules sont alors conservées sous forme d'une poudre redispersable dans du NaCl 0,15 M (molarité physiologique) et dans des milieux de cultures cellulaires.
- de taux d'encapsulation : les PA ont un taux d'encapsulation assez proche pour le HA, le dextrane-FITC et la CS (respectivement de 13, 22 et 26 µg/mg de nanoparticules). Il existe une bonne reproductibilité d'une synthèse à l'autre (écart type relativement faible). Le taux d'encapsulation de l'héparine est cependant légèrement plus faible car de l'ordre de 9 µg/mg de nanoparticules.
- de taux de recouvrement : le taux de recouvrement est sensiblement constant d'un lot à l'autre. Ni la nature du PA ni le type de modification des HA (C₆ ou C₁₂) ne modifient le taux de recouvrement en HA qui reste proche de 20-25 µg de HA/mg de nanoparticules.

Conclusion générale

Pour les nanoparticules recouvertes de HA, l'étude de la libération d'un polysaccharide modèle fluorescent, le dextrane-FITC a montré que le relargage était progressif dans le temps avec des doses de dextrane-FITC régulièrement délivrées pendant une période relativement longue de 16 jours au moins.

Le fait d'avoir atteint ces objectifs nous permet d'envisager de nouveaux projets à plus ou moins long terme. Ainsi, il est raisonnablement envisageable de s'intéresser à différents points qui peuvent encore être améliorés :

- le taux de recouvrement en HA et d'encapsulation en PA
- la nature du cœur des nanoparticules
- le process de synthèse des nanoparticules

Dans notre étude, le taux d'encapsulation est satisfaisant (environ 20 µg/mg de nanoparticule) ce taux peut être sans doute être amélioré en augmentant la concentration de PA dans la phase aqueuse interne tout en abaissant celle de la BSA pour ne pas modifier la viscosité de cette phase aqueuse.

Le cœur de PLA peut très bien faire l'objet d'un changement de la nature du polymère biodégradable utilisé. Des propriétés différentes dues à un cœur polymère différent engendreront nécessairement une modification des conditions expérimentales afin de s'approcher des propriétés physico-chimique des nanoparticules utilisées dans cette étude.

Enfin, le principe de double émulsion lui-même peut être assujetti à modifications (miniémulsion et autres techniques d'émulsion).

Tous ces changements s'accompagneront nécessairement d'une longue étape de mise au point afin de caractériser de façon exacte tous les nouveaux nanovecteurs obtenus : taille, taux d'encapsulation en PA et de recouvrement en HA, stabilité et mode de relargage...

L'évaluation biologique a ensuite été réalisée *in vitro* sur des cellules cartilagineuses. Dans un premier temps, les différentes nanoparticules qui ont ainsi été étudiées, ont été préparées en utilisant du HAC₆ comme stabilisant de l'émulsion secondaire du procédé de préparation et de la BSA dans la phase aqueuse interne.

Nous avons donc entrepris des tests biologiques usuels visant à évaluer l'impact du biomatériau sur les cellules articulaires. Ces tests nous ont permis de mesurer :

- La cytocompatibilité du biomatériau
- Les effets du biomatériau sur les gènes pro inflammatoires (sur les synoviocytes en monocouche) et sur les gènes impliqués dans la biosynthèse matricielle (chondrocyte en bille d'alginate).

Conclusion générale

Les tests biologiques effectués ont concerné principalement trois lots de nanoparticules après avoir montré leur faisabilité sur une première série de sept lots de nanoparticules. Ces trois lots ont les caractéristiques suivantes (Tableau 1) :

	Spécification des nanoparticules	
	En surface	Encapsulé
Lot 1	HAC6	HA natif
Lot 2	HAC6	Dextrane-FITC
Lot 3	PVA	Dextrane-FITC

Tableau 1 : Caractéristiques des lots de nanoparticules, utilisés lors des expériences *in vitro* et *in vivo*.

Ces trois lots présentaient une cytotoxicité nulle, ce qui est particulièrement appréciable pour la concentration de 100µg/ml représentant la plus grande concentration testée. Seul le lot recouvert de PVA engendrait une légère baisse de viabilité cellulaire. L'étude du mode de relargage a montré par la suite que cette baisse pouvait être corrélée par un très fort et rapide relargage de dextrane-FITC dans les premières heures de contact entre les cellules articulaires et le lot de nanoparticules recouvert de PVA.

Ensuite, l'impact de ces trois lots a été testé sur des cultures de cellules articulaires :

- Au niveau de gènes pro inflammatoires (monocouche de synoviocytes).
- Au niveau de gènes de la biosynthèse matricielle (en système tridimensionnel, bille d'alginate pour les chondrocytes).

Dans les deux cas étudiés, nous n'avons constaté aucun effet, ni pro-inflammatoire pour les synoviocytes, ni de baisse de biosynthèse matricielle pour les chondrocytes.

Enfin, afin de visualiser la vectorisation des nanovecteurs, des études en microscopie ont été effectuées.

Des cinétiques de contact entre les cellules du cartilage et les nanoparticules ont été menées dans le but de suivre le devenir des nanoparticules.

Nous avons montré que les spots de fluorescence constatés en microscopie confocale à fluorescence (sur les synoviocytes et les chondrocytes) étaient ponctuels et localisés au niveau de vésicules d'internalisation. Nous pouvons supposer que cette internalisation est préférentiellement médiée par le CD44 car après blocage des récepteurs par un anticorps spécifique, on constate une baisse notable du phénomène d'internalisation des nanoparticules. La co-localisation parfaite entre les spots fluorescents et les vésicules observées en microscopie à contraste de phase constituait une preuve nécessaire mais non suffisante pour conclure définitivement sur la localisation intracellulaire des nanoparticules. Ainsi, une étude complémentaire au MEB nous a permis de confirmer l'internalisation des nanoparticules. Une

Conclusion générale

série de clichés au MEB ont montré de façon précise et sans équivoque le repliement de la membrane plasmique sur les vésicules d'internalisation contenant les nanoparticules.

Cette étude *in vitro* a été complétée par les premiers tests *in vivo* chez le rat. Les premiers résultats *in vivo* semblent confirmer l'innocuité des nanoparticules au niveau articulaire. L'étude *in vivo* a consisté à reprendre les mêmes paramètres que l'étude *in vitro*. Les tests n'ont montré ainsi ni d'inflammation dans les membranes synoviales, ni de modifications concernant la biosynthèse matricielle des chondrocytes localisés au centre ou en périphérie de la rotule.

L'éventail de molécules modèles hydrosolubles et potentiellement candidates à l'encapsulation est large. Ainsi, il semblerait très intéressant d'encapsuler par exemple des gènes (fragment d'ADN) type GFP (codant pour une protéine fluorescente) afin de savoir si le contenu de la nanoparticule peut non seulement être intégré mais aussi utilisé par la cellule.

Grace à la complémentarité entre chimistes et biologistes, il serait intéressant d'imbriquer le process et les conditions de synthèse des nanoparticules avec les applications biologiques. Ainsi, on pourrait relier le taux de recouvrement de HA ou d'encapsulation en PA au type de maladie concernée avec un profil de relargage du PA adéquat (par exemple rapide en cas d'une douleur vive ou plus lente et continue en cas d'un mal chronique).

Ce travail sera suivi car il fait l'objet d'une nouvelle thèse ainsi que d'un projet ANR. De plus, les conditions du procédé de synthèse des nanoparticules à cœur de PLA et recouvertes de HA font l'objet d'un brevet français déposé le 25-07-02 par le CNRS. Des demandes d'extensions internationales ont été déposées par le CNRS le 25-07-03 [WO2004014347] et un projet d'achat de licence est en cours de négociation avec Bioibérica S.A. (Barcelone).

Liste des abréviations et symboles

Liste des abréviations et symboles

Partie physico-chimie :

CPG : Chromatographie en phase gazeuse

CS : Chondroïtine sulfate

dn/dC : Incrément d'indice de réfraction

DO : Densité optique

ECZ : Electrophorèse capillaire

ECZ-AI : Electrophorèse capillaire par association ionique

HA : Hyaluronate

Hép : Héparine

I : Indice de polydispersité ($= \overline{M}_w / \overline{M}_n$)

k_B : Constante de Boltzmann ($1,3805 \cdot 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$)

MEB : Microscopie électronique à balayage

$\overline{M}_n$: Masse molaire moyenne en nombre (g/mol)

$\overline{M}_w$: Masse molaire moyenne en masse (g/mol)

o/w : Emulsion huile/ eau

PA : Principe actif

PAA : Poly(acide acrylique)

PCS : Spectroscopie à corrélation de photons

PGA : Poly(glycolide)

PLA : Poly(D,L-lactide)

POE : Poly(oxide d'éthylène)

PVA : Poly(alcool vinylique)

RMN ^1H : Résonance magnétique nucléaire du proton

SEC : Chromatographie d'exclusion stérique

SEC-MALLS : Chromatographie d'exclusion stérique couplée à un diffusiomètre laser multiangle

w/o/w : Emulsion eau/huile/eau

ϵ_{max} : Coefficient d'extinction molaire à la longueur d'onde λ_{max} ($\text{l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)

λ_{max} : Longueur d'onde maximale d'absorption (nm)

Liste des abréviations et symboles

Partie biologie:

AAL : Anti-arthrosique à action lente

ADN (DNA) : Acide désoxyribonucléique

AINS : Anti-inflammatoire non stéroïdiens

ARN (RNA) : Acide ribonucléique

BSA : Albumine de sérum bovin

Col : Collagène

Dext-FITC : Dextrane marqué à la fluorescéine isothiocyanate

EPR : « Enhance Permeability and Retention »

GAG : Glycosaminoglycane

GFP : “Green fluorescent protein”

GTPase : Guanosine triphosphate hydrolase

iCox 2 : Inductible cyclo-oxygénase de type 2

IL1 β : Interleukine 1 bêta

IRM : Imagerie par résonance magnétique

MEC : Matrice extra cellulaire

MMP : « Matrix metalloprotease »

PG : Protéoglycane

PGE2 : Prostaglandine de type E2

RP29 : “Ribosomal protein 29”

RW1 et RPE : Solutions d’élution pour l’extraction d’ARNm du kit RNeasy

SDS : dodécyl sulfate de sodium

SPM : Système des phagocytes mononucléés

SVF : Sérum de veau fœtal

TNF α : “Tumor necrosis factor alpha”

Hyaluronate-Covered Nanoparticles for the Therapeutic Targeting of Cartilage

Hamed Laroui,^{†,‡} Laurent Grossin,[‡] Michèle Léonard,[†] Jean-François Stoltz,[§] Pierre Gillet,[‡] Patrick Netter,[‡] and Edith Dellacherie^{*,†}

Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire, UMR CNRS-INPL 7568, BP 20451, 54001 Nancy Cedex, France Laboratoire de Physiopathologie et Pharmacologie Articulaires, UMR CNRS-UHP 7561, BP 184, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France Equipe de Mécanique et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire, LEMTA, UMR CNRS-INPL-UHP 7563, BP 184, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France

Received July 30, 2007; Revised Manuscript Received October 3, 2007

Hyaluronic acid (HA) has a high affinity for the CD44 receptor present at the surface of articular cells, particularly of chondrocytes. HA-covered polylactide nanoparticles containing bioactive compounds such as HA and chondroitin sulfate (CS) were thus prepared in order to achieve a controlled delivery targeted to cartilage cells after injection near articular alterations/erosions. Such nanoparticles (diameter = 700 nm) were prepared by double emulsion/solvent evaporation, using amphiphilic derivatives of HA, as stabilizer of the secondary emulsion. These nanoparticles were incubated with articular cells, and several tests were carried out. First, they proved that the nanospheres provoked no decrease in cell viability, even after 72 h of contact. Second, a confocal microscopy analysis on fluorescent HA-covered particles showed that they were captured by articular cells, while with those covered with poly(vinyl alcohol), the uptake was far lower. Third, a scattering electron microscopy analysis proved that the HA-coated nanoparticles were localized in the cell intracytoplasmic area.

Introduction

The concept of targeted drugs is not new but dates back to 1906 when Ehrlich¹ first postulated the “magic bullet”. The challenge was (i) to find a drug capable of treating a particular disease, (ii) to find a means of carrying the drug *in vivo* in a stable biocompatible form, and (iii) to find the proper target for the concerned disease and then to define components able to establish selective interactions with specific receptor sites of the target organ.

Among the various carriers proposed for drug delivery, polymeric nanoparticles have been studied for several decades. The most widely used polymers to engineer nanoparticles are certainly aliphatic polyesters such as polylactide (PLA), polyglycolide, and copolymers^{2–4} whose biocompatibility and (bio) degradability are well-known and which are FDA approved.

To increase the therapeutic efficacy of the nanoparticle-encapsulated drugs, nanoparticles may be delivered to specific sites by passive or active targeting.⁵ For passive targeting, one can play with the size of nanoparticles: thus, drug-loaded nanoparticles can be retained in arteries after local administration by virtue of their size.⁶ It was also shown that rigid long-circulating carriers with a diameter larger than 200 nm might act as splenotropic particles.⁷ Passive delivery may also be directed to the mononuclear phagocyte system and circulating macrophages which are specialized in eliminating invaders that have gained entry to tissue fluids.⁵ On the other hand, the route of administration for nanoparticles can also have an important role in successful targeting. Thus, transdermal, pulmonary, or ocular delivery allows a great improvement in the therapeutic efficacy.

However, active targeting is the only means to get the greatest therapeutic efficacy and to reduce toxicity, as it greatly increases the probability of redirecting long-circulating particles to designated but accessible targets. Unlike passive targeting, ligands or homing devices that specifically bind to surface epitopes or receptors on the target sites are coupled to the surface of the carriers. A lot of effort has been devoted to achieving active targeting in order to deliver drugs to the right cells and tissues,^{5,8} particularly for cancer therapy: thus, as the elevated expression of the folate receptor has frequently been observed in various types of human cancers, folic acid has been attached to liposomes and nanoparticles.⁹ The folate nanoparticles were found to selectively target cancer cells and to improve the internalization of the encapsulated drugs.¹⁰ Other endogenously occurring ligands and substances have also been attached to vesicles or particles, which include oligosaccharides, for example, sialyl Lewis X,¹¹ galactosyl,¹² and so forth, and antibodies.¹³ Oligomers of hyaluronate (HA) were also used as ligands to target liposomes to the CD44 cell-surface marker overexpressed in certain tumor cells.¹⁴ CD44 is a receptor that binds HA, a polysaccharide consisting of β -1,3-N-acetylglucosaminyl- β -1,4-glucuronide.

The CD44 receptor is also expressed at the surface of chondrocytes, the cartilage cells, and its presence provokes the internalization of HA.¹⁵ Thus, nanoparticles covered with HA, containing molecules active in the treatment of cartilage pathologies, and directly injected in the joint cavity, could be both passively (by the effect of particle size) and actively targeted to the chondrocytes. This paper describes the synthesis and characterization of PLA nanoparticles covered with HA and containing water-soluble macromolecules such as chondroitin-sulfate (CS) and HA, both known for their positive effect on cartilage repair.^{16,17}

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: edith.dellacherie@ensic.inpl-nancy.fr.

[†] Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire.

[‡] Laboratoire de Physiopathologie et Pharmacologie Articulaires.

[§] Equipe de Mécanique et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire.

These nanospheres were then incubated with chondrocytes and synoviocytes in order to study the cytocompatibility of the particles and their capacity to be internalized into the cells.

Experimental Section

Preparation of Nanoparticles and Characterization. *Materials.* Sodium HA was obtained from Bioibérica S.A. (Barcelona, Spain). Its average molar masses were calculated from size exclusion chromatography coupled to multiangle laser scattering (SEC-MALLS) and were found to be 366 000 and 625 000 g/mol for M_n and M_w , respectively.

SEC was performed using a Waters HPLC model 590 pump with a serial set of OH Pack SP 806, 805, and 804 HQ columns (Shodex) and an OH Pack SBG as the guard column. The injection volume was 200 μ L. The eluent was a 0.1 M NaNO₃ solution containing NaN₃ as a bactericide (0.4 g/L) and was filtered (0.1 μ m; Millex VC, Millipore, France) prior to use. The flow-rate was 0.7 mL/min. The polymer solutions were prepared by dissolution in the same eluent and were left under stirring for 24 h. They were filtered (0.45 μ m; Millex GSWP, Millipore, France) right before injection, in order to remove possible aggregates. Elution was dually monitored by MALLS detection, using a Mini-Dawn (Wyatt Technology Corporation, USA) unit equipped with a He–Ne laser operating at 690 nm and by differential refractometry (Waters Model 410). dn/dc was measured in 0.1 N NaNO₃ using an Optilab 903 refractometer (Wyatt Technology Corporation, USA).

Poly(D,L-lactide) (PLA) was purchased from Sigma-Aldrich (France) and was characterized by a molar mass between 75 and 120 kg/mol. All of the reagents and solvents used for the polymer syntheses and the emulsions were obtained from the suppliers indicated by Pelletier et al.¹⁸ and Chognot et al.,¹⁹ respectively. The CS was a gift from Bioibérica SA (Barcelona, Spain). Bovine serum albumin (BSA), hyaluronan lyase (HA-lyase, from *Streptomyces hyaluroticus*), and chondroitin lyase ABC (CS-lyase, from *Proteus vulgaris*) were purchased from Sigma-Aldrich (France).

Synthesis of Amphiphilic HA and Characterization. The amphiphilic derivatives of HA (HA-Cn) were prepared by the fixation of aliphatic bromides (chains with 6 or 12 carbon atoms) according to the method already described.¹⁸ Briefly, it consisted of the reaction, in a homogeneous medium (dimethylsulfoxide), of an alkyl halide (here, hexyl or dodecyl bromide) with the carboxylic groups of HA, preliminarily transformed into its tetrabutylammonium salt (HA-TBA). The alkyl chains are thus linked to the polysaccharide backbone via ester functions. The nomenclature used is HA-Cn-x, where Cn is the covalently bound long alkyl chain ($n = 6$ or 12) and x is the substitution ratio (mol of alkyl chain/100 mol of monosaccharide unit).

The content in aliphatic chains was determined as reported by Pelletier et al.¹⁸ after hydrolyzing the ester function linking the Cn chain and the HA backbone. The dodecanol and hexanol thus released were extracted by toluene and quantified by gas chromatography. For hexanol, as it is slightly soluble in water, the content in C6 chains on HA-C6 was calculated by taking into account the partition coefficient between toluene and the aqueous solution resulting from the hydrolysis.

Surface tension measurements were carried out at 25 °C in 0.15 M NaCl using a TRACKER dynamic tensiometer (Model I.T. Concept, Longessaigne, France). All samples were equilibrated for a sufficient time to reach constant readings. Depending on the composition of HA derivatives, the time to reach equilibrium was between 30 min and 4 h. The measurements were made in triplicate, and the average value was then retained.

Preparation of Core–Shell Nanoparticles. The nanoparticles were produced by the double emulsion/solvent evaporation procedure derived from the procedure described by Chognot et al.¹⁹ for the elaboration of MPEO-covered PLA nanoparticles. It consists of using an amphiphilic copolymer as the surfactant of the secondary emulsion, here, HA substituted by pendent alkyl chains (HA-Cn).

Typically, a primary water-in-oil (w/o) emulsion was prepared by mixing an organic phase (4 mL of dichloromethane) containing PLA

(25 g/L) with an internal aqueous phase (200 μ L) containing or not containing BSA (50 g/L). The mixture was stirred for 2 min with a Vortex mixer (Top Mix, Bioblock Scientific, France), then sonicated (2 min, power 5, 50% active cycle, in an ice bath) using a Vibracell model 600 W (Sonics & Materials, Danbury, USA). This primary emulsion was poured into a second aqueous phase (8 mL; external aqueous phase) containing an amphiphilic derivative of HA (HA-C6 or HA-C12; 0.5, 1, or 5 g/L). The w/o/w emulsion was then obtained by sonication (same conditions as those used for the primary emulsion). This double emulsion was then transferred into an aqueous 10^{−2} M NaNO₃ dispersing phase (40 mL) and stirred for 5 min. The organic solvent was evaporated under stirring in ambient air, and the collected solid nanospheres were resuspended in water, then centrifuged again in order to remove the excess HA-Cn. This purification procedure was repeated two times. The final suspension was then freeze-dried.

Nanoparticles covered with poly(vinyl alcohol) (PVA) were prepared by the same method but using 10 g/L of PVA (Aldrich, Milwaukee, WI; molar mass = 13 000–23 000 g/mol, hydroxylated at 87–89%) instead of HA-Cn in the external aqueous phase.

Nanoparticles covered with HA or PVA and containing fluorescent dextran-FITC (molar mass = 500 000 g/mol, Sigma-Aldrich, France) were prepared according to the procedure described above. Dextran-FITC was dissolved in the internal aqueous phase at a concentration of 2.5 g/L.

Experiments were also carried out by replacing the ultrasonic device with a microfluidizer under 2 bar of pressure (model 110S, Microfluidics Corporation, Newton, MA).

The size distribution of nanospheres (mean diameter and standard deviation) was determined by photon correlation spectroscopy (PCS) using Malvern equipment (Model 4600, Malvern Instruments, UK) in 10^{−3} M NaCl at 25 °C.

Scattering Electron Microscopy (SEM) of Nanoparticles. After plate deposition and drying of the nanoparticle aqueous suspensions (1 mg/mL), the plates were fixed with 2.5% glutaraldehyde in a 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2, for one night at 4 °C. Afterward, the samples on the plug were rinsed and dehydrated by successive 2 min baths in a series of increasing concentrations of ethanol/water (30°, 50°, 70°, 80°, 90°, and 100°) and then finally treated with a 5 min bath of hexamethyldisilazane and dried under a range hood. The samples were then fixed on an aluminum support with a “carbon adhesive glue” and metallized with gold–palladium (Spotter Coater SC7640). The samples were observed with a Stereoscan S 240 (Cambridge Instruments UK).

Measurement of the Amount of HA Present at the Nanoparticle Surface. The principle consists of enzymatically hydrolyzing the HA present at the surface, by HA-lyase. A total of 300 mg of nanoparticles were dispersed in 10 mL of a 20 mM acetate buffer, pH 6, by sonication for 5 min. Then, 200 μ L of this suspension was treated with 20 μ L of a HA-lyase solution (100 units/mL, 20 mM acetate buffer pH = 6) for 72 h at 37 °C. The resulting polysaccharidic fragments were then analyzed and quantified by capillary electrophoresis according to a method described elsewhere.²⁰

Preparation of HA-Coated Nanoparticles Loaded with a Glycosaminoglycan. HA-coated nanoparticles loaded with HA or CS were prepared according to the procedure described above. The glycosaminoglycan (GAG) was dissolved in the internal aqueous phase of the primary emulsion at a concentration of 5 g/L.

Measurement of the Amount of Encapsulated Glycosaminoglycan. Each sample of HA-coated GAG-loaded nanoparticles was treated as follows: one-half was dispersed in a 20 mM buffer acetate, pH 6, and subjected to HA-lyase as described above. This experiment allowed the quantification of the HA present at the nanoparticle surface. In fact, preliminarily, it had been shown that, in the case of bare nanoparticles loaded with HA and treated with HA-lyase, the enzyme could not penetrate inside the PLA matrix as no peaks of polysaccharidic fragments were observed in the capillary electrophoregram.

The other half was treated at pH 10 with 1 M NaOH in order to degrade the particle PLA matrix.

For each HA determination, typically, 90 mg of nanoparticles were treated with 9 mL of 1 M NaOH for 2 h at 25 °C. Then, the solution pH was decreased down to 6 with concentrated acetic acid and diluted to 12 mL with a 20 mM acetate buffer, pH 6. A total of 200 μ L of this solution was subjected to enzymatic hydrolysis with 20 μ L of HA-lyase (100 units/mL). For the CS determination, the same process was used. The HA-lyase was just replaced by CS-lyase at the same concentration. All solutions were then filtered on an Ultrafree-MC (Millipore Corporation, Bedford, MA) of 10 000 nominal molecular weight limit.

The amounts of GAGs (at the surface or encapsulated) were calculated from calibration curves preliminarily determined with known concentrations of HA and CS.

The polysaccharidic fragments were quantified by capillary electrophoresis.²⁰ In the case of HA-coated, HA-loaded nanoparticles, the amount of encapsulated HA was calculated by the difference between the value obtained after nanoparticle degradation (total HA) and that obtained by the controlled enzymatic hydrolysis of surface HA.

In Vitro Biological Evaluation on Cartilage Cells. *Isolation and Culture of Rat Chondrocytes and Synoviocytes.* Animal experiments were conducted in accordance with institutional guidelines following the recommendations of the NIH for animal experimentation. Six-week-old male Wistar rats were kept in a 12/12 light/dark cycle (light-on period, 6:00 a.m. to 6:00 p.m.) in a controlled-temperature chamber (24 ± 1 °C).²¹

Normal articular cartilage was obtained from Wistar male rats (175–200 g, Charles River Laboratories, l'Arbresle, France) sacrificed under anesthesia [ketamine (50 mg/kg) and acepromazine (1.25 mg/kg)]. After joint surgery, articular cartilage pieces were aseptically dissected from femoral head caps, and chondrocytes were obtained by sequential digestion with Pronase (2 mg/mL, 2 h) and collagenase B (1.5 mg/mL, overnight) (Roche, Meyland, France). Synoviocytes were isolated from synovial membranes, digested overnight by a mix of collagenase and Dispase (respectively 0.1 units/mL and 0.8 units/mL, Roche). Then, cells were washed two times in PBS and cultured to confluence in 75 cm³ flasks at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. The culture medium was DMEM/Ham's F-12 (Invitrogen, France) supplemented with L-glutamine (2 mM), penicillin (100 units/mL), streptomycin (100 μ g/mL), and heat-inactivated fetal calf serum (10%) (Invitrogen, France) in an incubator at 37 °C and 5% CO₂.

Assessment of Cytotoxicity by MTT Assay. The MTT test was carried out following a protocol already described.²⁰ Cells were seeded in 96-well plates at a density of 5×10^4 cells per well, and they were exposed to several concentrations of HA- or PVA-coated nanoparticles loaded with dextran-FITC for several time periods (24, 48, and 72 h). The assay is based on the cleavage of the soluble yellow MTT [3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Sigma-Aldrich, France] by dehydrogenase present in intact mitochondria, forming insoluble purple formazan crystals. After being washed, the formazan crystals are solubilized in sodium dodecylsulfate/dimethylformamide (SDS/DMF), and the absorbance of the resulting colored solution is measured at 580 nm (Multiskan microplate reader, Labsystems, Montigny-le Bretonneux, France). Cells were incubated with 100 μ L of DMEM/F12 and 25 μ L of MTT solution (5 mg/mL) for 4 h. Then, the supernatant was removed and 100 μ L of the SDS/DMF solution was added into each well. The plate was incubated overnight before measurement. Results were expressed as means $\pm$ standard deviation for at least three assays. Comparisons were made by ANOVA, followed by the Fisher protected least-squares difference posthoc test using the Statview 5.0 software (SAS Institute Inc.). A *P* value of less than 0.05 was considered significant.

Single-Photon Confocal Microscopy Analysis. Chondrocytes and synoviocytes were cultivated under classical conditions and exposed to nanoparticles (100 μ g/mL) for various time periods (6, 12, and 24 h). Then, cells were fixed by a 4% paraformaldehyde solution, pH 7.4, for 15 min at room temperature, then washed three times (5 min each)

with PBS. Slides were observed with a Leica TCS SP2 equipped with an Acousto-Optical Band Splitter. Excitation for dextran-FITC ($E_{\text{emmax}} = 518$ nm, $E_{\text{exmax}} = 492$ nm) was achieved by the 488 nm line from an argon laser. All photomultipliers used were adjusted to the same sensitivity (gain/offset). A 1.32 numerical aperture oil immersion lense (Leica 63x, Planapo, Wetzlar, Germany) was used. Three-dimensional images of reconstituted tissues were compiled either into a single-view projection using LCS3D image processing software (Leica Microsystems, Mannheim, Germany) or into a 3D projection using Imaris reconstruction software (Bitplane AG, Suisse).

Scattering Electron Microscopy Analysis. Chondrocytes or synoviocytes were cultivated (90 000 cells for a 13-mm-diameter chamber, i.e., approximately 70 000 cells/cm²) on culture chambers (Laboratory-Tek, Nalge Nunc International, Naperville, IL) and left to adhere for 48 h. The wells were washed in DMEM without red phenol for 15 min. Then, they were fixed with 2.5% glutaraldehyde in a 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2, for one night at 4 °C. The rest of the experiment was performed as described above for SEM nanoparticle analysis.

Results and Discussion

Synthesis and Characterization of HA-Coated Nanoparticles. The method used for preparing the nanoparticles coated with HA and loaded with water-soluble macromolecules was derived from the method described by Chognot et al.¹⁹ for the elaboration of MPEO-covered nanoparticles. As mentioned above, it consists of using the double emulsion/solvent evaporation procedure in which the surfactant of the secondary emulsion is an amphiphilic copolymer whose hydrophilic part is designed according to the expected properties of the nanoparticle shell. After solvent evaporation, the nanoparticles present this hydrophilic part at their surface, the hydrophobic one being anchored inside the PLA matrix. This property has already been proved for PLA nanoparticles prepared by simple emulsion in the presence of amphiphilic dextran²² or water-soluble monomethoxy-poly(ethylene oxide)-b-PLA copolymers (MPEO-b-PLA).²³ This method was also used for the preparation of PLA nanospheres by double emulsion in the presence of water-soluble MPEO-b-PLA copolymers.¹⁹

In this study, this principle was applied to HA-based polymeric surfactants, HA-Cn.

Properties of the Synthesized HA-Cn. Two amphiphilic derivatives of HA were prepared: HA-C6–14 (HA with 14 mol pendent C6 chains/100 mol monosaccharide units) and HA-C12–5.5 (HA with 5.5 mol C12 pendent chains/100 mol monosaccharide units). These polymers were found to be slightly surfactive as their tension at equilibrium was about 60 mN/m at 0.5 g/L for each sample while pure water presents an air/water tension of about 70 mN/m under the same conditions.

Preparation of HA-Covered Nanoparticles. Study of a Simple Oil-in-Water Emulsion. This study was realized in order to determine the influence of some emulsification parameters on the size of particles. The simple oil-in-water emulsion was prepared with 10 mL of water containing 0.5 g/L of HA-C6 and 1 mL of dichloromethane containing PLA at 25 g/L.

First of all, the influence of the emulsification method (microfluidizer or ultrasonic device) on the emulsion size was studied. The microfluidizer treatment consisted of several passes in the device (10, 20, or 30 passes). The sonication was applied for 2 min, at a power of 5, and using a 50% active cycle in an ice bath, after 2 min of Vortex mixing.

Figure 1 shows the results concerning the droplet diameter obtained with these two methods. One observes that, with microfluidizer, it decreases from 400 nm to about 200 nm, when

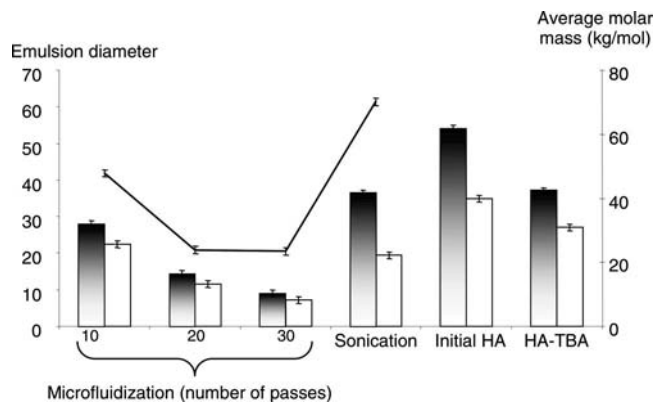


Figure 1. Influence of the emulsification method on the diameter of emulsion droplets and on the average molar masses of HA-TBA. Two simple emulsions were used as described in the text. The continuous line is related to the emulsion diameter, the histogram to the polymer average molar masses. "HA-TBA" and "initial HA" were not subjected to the emulsification process. Values expressed as means of three experiments.

the number of passes increases from 10 to 30. With sonication, the droplets are bigger (about 600 nm).

We have also controlled the influence of the two emulsification processes on the molar mass of HA. To this aim, the emulsion was constituted of 10 mL of HA-TBA (3 g/L in water) and 1 mL of dichloromethane. HA-Cn could not be used in these experiments as the amphiphilic derivatives could not be eluted on SEC columns because of their adsorption on the stationary phase. HA-TBA is the derivative of HA obtained during the synthesis of HA-Cn, just before the reaction with alkyl bromide. PLA was not added in the organic phase, in order to favor the demixion of the emulsion into two phases and to allow the measurement by SEC-MALLS of HA-TBA present in the aqueous phase.

Figure 1 gives the average molar masses of HA-TBA before the emulsification process and after. It is first seen that HA-TBA before emulsification possesses average molar masses slightly lower than those of unmodified HA. This has already been pointed out¹⁸ and was attributed to the synthesis chemical treatment. The sonication process applied to HA-TBA does not greatly modify M_w but slightly decreases M_n . Several papers have already reported on the degradation of polysaccharides by ultrasounds²⁴ and particularly of HA,²⁵ and this degradation was attributed to cavitation, stress concentration, and radical attachment to the depolymerization of polysaccharides.²⁴

On the other hand, when HA-TBA was subjected to the microfluidization process, a strong degradation of the HA backbone was observed as M_w and M_n were very low after 20 passages. Such a mechanical degradation by microfluidization has already been reported for polysaccharides and particularly for traganthan²⁶ and xanthan²⁷ and would be provoked by the high shearing stresses and the turbulent forces generated in the microfluidizer.

To explain the smaller droplet diameter obtained at 20 and 30 passes, one can thus assume that the low-molecular-weight HA-C6 fragments thus formed have different behavior from that of longer chains. In fact, these types of amphiphilic polysaccharides are well-known to exhibit associative properties in aqueous solutions:^{18,28} the smaller the chains, the lower the aggregation strength. The short fragments would thus be less compact than the long chains and could better adsorb at the interfaces, thus providing a better stabilization of small droplets in the emulsion.

Table 1. Influence on the Size of Emulsion Droplets, of the HA-Cn Concentration in the Aqueous Phase of the Simple Emulsion^a

polymer concentration (g/L)	nanoparticle average diameter (nm)		
	0.5	1	5
HA-C12	320 ± 30	350 ± 50	1630 ± 80
HA-C6	290 ± 30	380 ± 50	<5000

^a Values expressed as means of three experiments.

Finally, taking into account the fact that bioactive polysaccharides had to also be encapsulated, the sonication method was chosen in order to limit the possible degradation of active macromolecules.

Concerning the effect of the HA-Cn concentration on the droplet size, several concentrations in the aqueous phase were studied, that is, 0.5, 1, and 5 g/L. The results are given in Table 1, and they show that, whatever the HA-Cn, the higher its concentration, the bigger the droplets. The intermolecular hydrophobic aggregation of HA-Cn in the aqueous phase at high concentrations could thus lead to the adsorption of aggregates at the organic surface, making it responsible for higher particle diameters. A HA-Cn concentration of 0.5 g/L was then used for all of the following experiments as it allowed the production of the smallest droplets.

Preparation of Nanoparticles by Double Emulsion/Solvent Evaporation. First, we studied the formation of the water-in-oil primary emulsion prepared with 200 μ L of water and 4 mL of dichloromethane with 25 g/L of PLA. No stable emulsion could be formed as two phases were observed after 10 min. We had already shown that BSA was required to stabilize the primary emulsion in the case of MPEO-coated nanoparticles.¹⁹ In this work, we found that a 50 g/L BSA concentration in the aqueous phase of the primary emulsion was sufficient to stabilize it.

Taking into account the results of the preliminary experiments, the retained conditions for the preparation of GAG-loaded HA-covered particles were thus as follows: BSA 50 g/L and GAG 5 g/L in the internal aqueous phase, HA-Cn 0.5 g/L in the external aqueous phase, 2 min Vortex, and 2 min sonication (power 5, 50% active cycle) for both emulsions. The other parameters were those described in the Experimental Section.

Figure 2 presents a SEM photo of nanoparticles prepared with HA-C12, before washing, centrifugation, and freeze-drying. It is seen that the nanospheres are spherical and that their size distribution is relatively homogeneous.

Table 2 gives the size of particles after washing, centrifugation, and freeze-drying, prepared with HA-C6 or HA-C12 as the surfactant and with or without HA as the active polysaccharide (AP). The experiments were carried out with or without BSA in the aqueous phase of the primary emulsion. In this table, by comparing the results obtained with BSA and AP with those obtained with BSA without AP, it is seen that AP has an effect more or less favorable to the particle size depending on the nature of HA-Cn. It is likely that HA in the internal aqueous phase can contribute to stabilizing the primary emulsion as poly(vinyl alcohol) can do it.⁴ By comparing the results obtained with AP and BSA, with those obtained with AP without BSA, one observes that BSA contributes to the particle final size decrease. The influence of BSA on the stabilization of the primary emulsion has been already discussed by Chognot et al.¹⁹

On the other hand, if one compares the results concerning particle size in Figure 2 and Table 2, one observes that the average particle size evaluated by PCS is around 600–700 nm,

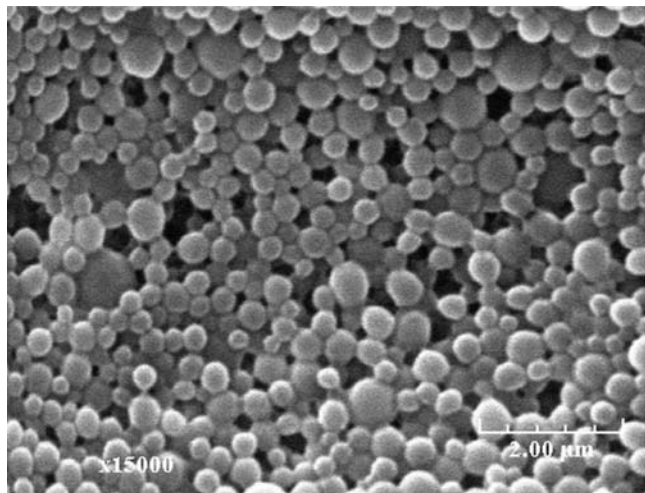


Figure 2. SEM photo of HA-covered nanoparticles loaded with HA. Nanoparticles prepared as described in the text with HA-C12 and without washing, centrifugation, and freeze-drying.

Table 2. Size of Nanoparticles (nm) Prepared under the Conditions Described in the text with HA as Active Polysaccharide (AP) in the Aqueous Internal phase [HA] = 5 g/L^a

amphiphilic polymer	BSA, ^b without AP	AP, without BSA	BSA ^b and AP
HAC ₆	450 ± 20	790 ± 40	650 ± 40
HAC ₁₂	650 ± 35	895 ± 60	690 ± 40

^a [HA-Cn] = 0.5 g/L in the aqueous external phase. ^b With BSA at 50 g/L in the aqueous internal phase. Diameters determined after the complete process of particle preparation, i.e., after washing, centrifugation, and freeze-drying.

while on the SEM photo, the average diameter is rather around 300 nm. This difference can be explained by various reasons: first, the particles of Figure 2 were studied just after the solvent evaporation before washing, centrifugation, and freeze-drying, while the size of the other ones was measured after these processes. Some aggregation may thus occur, particularly during freeze-drying, and could explain the bigger size seen in Table 2. A second reason is related to the technique of SEM that requires the study of the dry particles under a vacuum, which can provoke particle shrinkage. Finally, by PCS, one calculates an intensity average size, while by SEM, one evaluates a number average size which is generally lower than the other one.

Amount of HA Present at the Nanoparticle Surface. The HA present at the nanoparticle surface is a part of the HA-Cn used as the surfactant of the secondary emulsion in the nanoparticle preparation. We have thus verified that it could be correctly quantified after enzymatic hydrolysis by using the capillary electrophoresis method described for unmodified HA.²⁰ Defined amounts of HA-C6 and HA-C12 were treated by HA-lyase under the same conditions as for HA, and the results obtained for HA-Cn and unmodified HA after ECZ were found to be very close, which means that this method is valid for lowly substituted HA-Cn.

Table 3 shows the surface characteristics of the nanoparticles prepared.

Amount of Encapsulated GAG. The amounts of HA and CS encapsulated in the nanoparticles were enzymatically determined, after PLA matrix chemical degradation, as described in the Experimental Section.

The results are given in Table 3.

It is seen that HA and CS were really encapsulated but with ratios that are rather different, with 26 μg/mg of nanoparticles

Table 3. Characteristics of HA-Coated Nanoparticles Loaded with HA or CS^a

encapsulated GAG	particle average diameter (nm)	HA at the surface (μg/mg of nanoparticles)	GAG loading (μg/mg of nanoparticles)
HA	650 ± 40	21 ± 4	13 ± 1
CS	690 ± 50	23 ± 5	26 ± 3

^a Nanoparticles were prepared as described in the Experimental Section with: HA-C6 (0.5 g/L), BSA (50 g/L), and GAG (5 g/L). Results expressed as means of eight experiments.

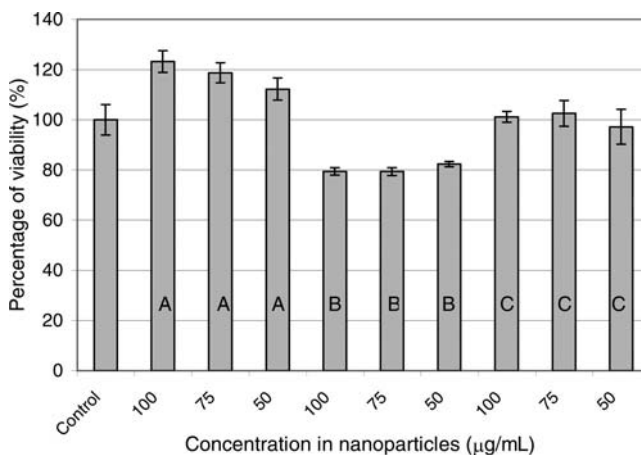


Figure 3. Cellular viability of synoviocytes in the presence of nanoparticles after 72 h of incubation and at different concentrations of nanospheres. (A) HA-covered nanoparticles loaded with dextran-FITC, (B) PVA-covered nanoparticles loaded with dextran-FITC, (C) HA-covered nanoparticles loaded with HA. (Control) Cells without nanoparticles.

for CS and 13 μg/mg for HA. The greater amount found for encapsulated CS could be related to possible ionic interactions between the GAG and BSA in the internal aqueous phase of the primary emulsion. These interactions could be stronger for CS (strongly negative sulfate groups) than for HA (weak carboxylic/carboxylate groups) and hamper the GAG leak in the external aqueous phase during the second emulsification.

In vitro Biological Evaluation on Cartilage Cells. The biological evaluation was carried out with nanoparticles of about 700 nm in diameter. According to the experiments to be carried out, some of them were prepared with HA-C6 and thus covered with HA (about 20 μg/mg nanoparticles), and other ones were coated with PVA. Some of them were loaded with HA as the bioactive molecule and other ones with dextran-FITC as the fluorescent marker.

Cytotoxicity Analysis. The MTT test was performed on synoviocytes and chondrocytes at three time points (24, 48, and 72 h) in the presence of nanoparticles covered with HA or PVA loaded with HA or dextran-FITC. This analysis allows the detection of mitochondrial activities that are the early changes observed in cells undergoing the death process. Three concentrations of nanoparticles (50, 75, and 100 μg/mL) were tested.

No significant differences were detected between control cells (no nanoparticles) and cells exposed to HA-covered nanoparticles. A slight decrease (20%) in cell viability was observed for cells incubated with PVA-coated nanoparticles at 72 h in both cell lines. None of the three concentrations of HA-coated nanoparticles affected cellular viability at any time or for either cell line. For example, Figure 3 shows the results obtained with synoviocytes.

The MTT analysis thus clearly indicates that the use of HA-covered nanoparticles has no deleterious effect on synoviocyte

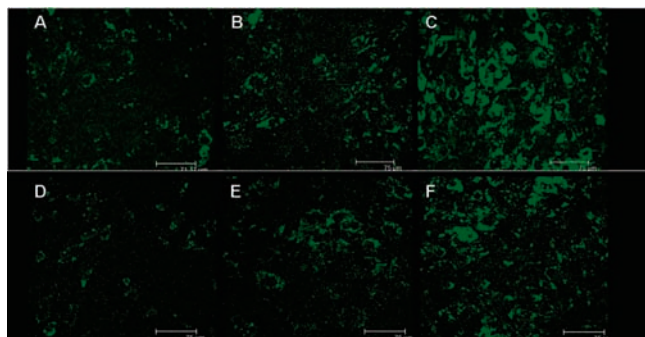


Figure 4. Kinetics of the uptake of HA-covered nanoparticles loaded with dextran-FITC by articular cells, as studied by confocal microscopy. Chondrocytes (A, B, C) and synoviocytes (D, E, F) at 6, 12, and 24 h of incubation, respectively.

and chondrocyte viability up to a nanoparticle concentration of 100 $\mu\text{g/mL}$ and for a 72 h period of time. A slight decrease is observed with PVA-coated particles, but it was mainly balanced at 96 or 120 h.

Study of the Nanoparticle Uptake by Articular Cells. Confocal Microscopy Analysis. In order to study the uptake of nanoparticles by articular cells, experiments were performed in which cells were incubated for 6, 12, and 24 h with dextran-FITC-loaded nanoparticles covered with HA. Cells were fixed, and slides were observed on a Leica confocal microscope. The results are presented in Figure 4.

It can be seen that with HA-coated particles, the amount of fluorescence in chondrocytes was just detectable at 6 h (Figure 4A), but the intensity of the signal was increased at 12 h (Figure 4B) and above all at 24 h (Figure 4C). Concerning the synoviocytes, the signal of fluorescence was weaker than for chondrocytes at any time (Figure 4D, E, and F). On the other hand, only a weak signal in a few cells was observed with PVA-coated nanospheres for both cell lines (not shown).

Additional experiments were performed on chondrocytes and synoviocytes, in which cells were preincubated with an anti-CD44 antibody (monoclonal anti-CD44 antibody mouse, Sigma-Aldrich, France) for 2 h at 5 $\mu\text{g/mL}$, washed twice to remove antibody excess, and then incubated with HA-covered dextran-FITC loaded nanoparticles. The results of confocal microscopy are presented in Figure 5. It is shown that, for chondrocytes (Figure 5A,B) and synoviocytes (Figure 5C,D), a decrease in the amount of fluorescence was observed between cells without CD44 antibody pretreatment (Figure 5A,C) and preincubated cells (Figure 5B,D). Thus, this means that the HA-coated nanoparticles' uptake is at least partly mediated by the CD44 receptor as its inhibition decreases the particle internalization. The fact that the uptake is not completely canceled after CD44 antibody pretreatment is probably the result of a too-weak concentration in antibodies compared to the number of CD44 receptors present at the cell surface.

Scattering Electronic Microscopy Analysis. The fluorescence observed in both cell lines seems to have an intracytoplasmic localization, with many fluorescent vesicles observed. But we were not able to determine the exact localization with the confocal microscope, and to overcome this technical drawback, a SEM analysis was performed to clearly localize the nanoparticles inside the cells. The pictures taken on a Stereoscan S240 are presented in Figure 6. The fluorescent vesicles are quite visible, and these photos clearly demonstrate that they are localized inside the chondrocytes, and probably in the cytoplasm, and not at their surface.

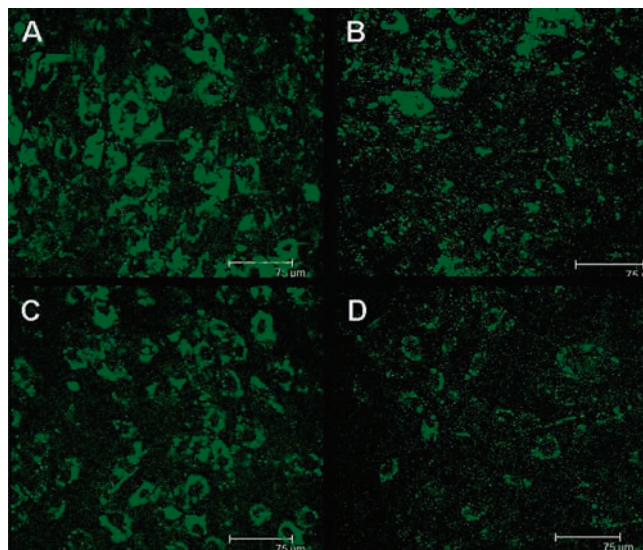


Figure 5. Influence of the cell treatment by CD44 antibody, on the uptake of HA-covered nanoparticles loaded with dextran-FITC by articular cells, as studied by confocal microscopy. The cells were incubated with particles for 24 h. (A and B) Chondrocytes without CD44 antibody preincubation (A) and after 2 h of incubation with CD44 antibody (B). (C and D) Synoviocytes without CD44 antibody preincubation (C) and after 2 h of incubation with CD44 antibody (D).

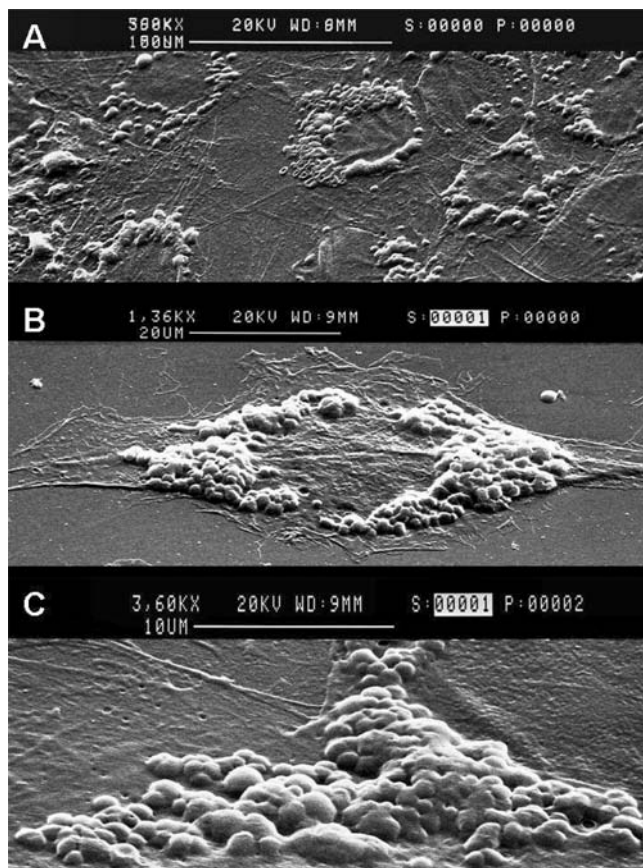


Figure 6. SEM pictures of chondrocytes after 24 h of incubation with HA-covered nanoparticles loaded with dextran-FITC. Photos at increasing magnification values. (A) $\times 465$, (B) $\times 1750$, (C) $\times 4600$.

Conclusion

This paper has shown that PLA nanoparticles (around 700 nm) covered with HA could be prepared by the double emulsion/

solvent evaporation procedure by using amphiphilic HA as the surfactant of the secondary emulsion. Polysaccharidic molecules active in cartilage treatment (HA, chondroitin sulfate) were then encapsulated, the objective being that, as HA specifically recognizes the CD44 receptor present at the chondrocyte surface, the encapsulated polysaccharides could be released inside the cells.

An *in vitro* biological evaluation on articular cells (chondrocytes and synoviocytes) was performed using HA-loaded nanoparticles covered with HA or PVA, and with HA- or PVA-covered particles loaded with dextran-FITC. The cytotoxicity analysis proved that none of the HA-coated nanospheres led to a decrease in cell viability. The analyses carried out with dextran-FITC-loaded particles in confocal microscopy and scanning electron microscopy showed that the HA-coated nanospheres were captured by chondrocytes and to a lesser extent by synoviocytes, while PVA-covered particles were not captured or were done so very weakly. This means that the uptake of HA-covered particles is mainly mediated by the presence of HA at the nanoparticle surface, the lower CD44 concentration at the synoviocyte surface being a possible reason for the slighter internalization. To confirm this hypothesis, some additional experiments should be performed, like the quantification of CD44 expression rate by chondrocytes and synoviocytes by, for example, a Western-Blot analysis. On the other hand, the very weak uptake of PVA-covered particles is probably due to a classical endocytosis mechanism and a lack of interactions between nanoparticles and articular cells. The SEM analysis confirmed the conclusion of a specific uptake by chondrocytes and showed that the localization inside the cells was cytoplasmic.

All these results prove that a target delivery of active molecules in articular cells could be achieved by this kind of HA-coated particles, but some other experiments are required, in particular, *in vivo* assays on rat cartilage defects, to verify the feasibility of this concept. Such *in vivo* experiments are now under investigation.

Acknowledgment. The authors thank Dominique Dumas and Luc Marchal for their helpful assistance in confocal microscopy and scattering electronic microscopy analyses. They acknowledge Région Lorraine and Communauté Urbaine du Grand Nancy for their financial support. Hamed Laroui was supported by a grant of the French Ministry in charge of research.

References and Notes

- (1) Ehrlich P. *The collected papers of Paul Ehrlich*; Pergamon: London, 1960; Vol. 3.
- (2) Langer, R.; Folkman, J. *Nature* **1976**, 263, 797–800.
- (3) Blanco, D.; Alonso, M. J. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1997**, 43, 287–294.
- (4) Zambaux, M.-F.; Bonneaux, F.; Gref, R.; Dellacherie, E.; Vigneron, C. *J. Controlled Release* **1999**, 60, 179–188.
- (5) Moghimi, S. M.; Hunter, A. C.; Murray, J. C. *Pharmacol. Rev.* **2001**, 53, 283–318.
- (6) Guzman, L. A.; Labhasetwar, V.; Song, C.; Jang, Y.; Lincoff, A. M.; Levy, R.; Topol, E. J. *Circulation* **1996**, 94, 1441–1448.
- (7) Moghimi, S. M.; Porter, C. J. H.; Muir, I. S.; Illum, L.; David, S. S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, 177, 861–866.
- (8) Brigger, I.; Dubernet, C.; Couvreur, P. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2002**, 54, 631–651.
- (9) Stella, B.; Arpicco, S.; Peracchia, M. T.; Desmaële, D.; Hoebeke, J.; Renoir, M.; D'Angelo, J.; Cattel, J. L.; Couvreur, P. *J. Pharm. Sci.* **2000**, 89, 1452–1464.
- (10) Stella, B.; Marsaud, V.; Couvreur, P.; Arpicco, S.; Peracchia, M. T.; Geraud, G.; Immordino, M. L.; Cattel, L.; Renoir, M. In *Proceedings of the Controlled Release of Bioactive Materials Congress*, San Diego, CA, 2001; No. 5200.
- (11) DeFrees, S. A.; Phillips, L.; Guo, L.; and Zalipsky, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 6101–6104.
- (12) Liang, H. F.; Chen, C. T.; Chen, S. C.; Kulkarni, A. R.; Chiu, Y. L.; Chen, M. C.; Sung, H. W. *Biomaterials* **2006**, 27, 2051–2059.
- (13) Dinuera, N.; Balthasarb, S.; Weberb, C.; Kreuterb, J.; Langerb, K.; von Briesen, H. *Biomaterials* **2005**, 26, 5898–5906.
- (14) Eliaz, R. E.; Szoka, F. C., Jr. *Cancer Res.* **2001**, 61, 2592–2601.
- (15) Dean, J. A.; Knudson, W.; B.; Knudson, C. B. *Exp. Cell Res.* **1999**, 252, 292–302.
- (16) Bassleer, C. T.; Bougaret, S.; Malaise, M. *Osteoarthritis Cartilage* **1998**, 6, 196–204.
- (17) Noble, P. *Matrix Biol.* **2002**, 21, 25–29.
- (18) Pelletier, P.; Hubert, P.; Lapique, F.; Payan, E.; Dellacherie, E. *Carbohydr. Polym.* **2000**, 43, 343–349.
- (19) Chognot, D.; Léonard, M.; Six, J.-L.; Dellacherie, E. *Colloid Surf., B* **2006**, 51, 86–92.
- (20) Gerard, C.; Catuogno, C.; Amargier-Huin, C.; Grossin, L.; Hubert, P.; Gillet, P.; Netter, P.; Dellacherie, E.; Payan, E. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2005**, 16, 541–551.
- (21) Grossin, L.; Cournil-Henrionnet, C.; Mir, L. M.; Liagre, B.; Dumas, D.; Etienne, S.; Guingamp, C.; Netter, P.; Gillet, P. *FASEB J.* **2003**, 17, 829–835.
- (22) Rouzes, C.; Léonard, M.; Durand, A.; Dellacherie, E. *Colloid Surf., B* **2003**, 32, 125–135.
- (23) Chognot, D.; Six, J.-L.; Léonard, M.; Bonneaux, F.; Vigneron, C.; Dellacherie, E. *J. Colloid Interface Sci.* **2003**, 268, 441–447.
- (24) Lii, C. Y.; Chen, C. H.; Yeh, A. I.; Lai, V. M. *Food Hydrocolloids* **1999**, 13, 477–481.
- (25) Rehakova, M.; Bakos, D.; Soldan, M.; Vizarova, K. *Int. J. Biol. Macromol.* **1994**, 16, 121–124.
- (26) Silvestri, S.; Gabrielson, G. *Int. J. Pharm.* **1991**, 73, 163–169.
- (27) Lagoueyte, N.; Paquin, P. *Food Hydrocolloids* **1998**, 12, 365–371.
- (28) Sinquin, A.; Dellacherie, E.; Hubert, P.; *Langmuir* **1993**, 9, 3334–3337.
- (29) Zambaux, M.-F.; Bonneaux, F.; Gref, R.; Dellacherie, E.; Vigneron, C. *J. Controlled Release* **1999**, 60, 179–188.

BM700836Y

Nom : **Monsieur LAROU**

Prénom : **Hamed**

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1

en **BIOLOGIE SANTÉ ENVIRONNEMENT**

Spécialité : *INGÉNIERIE CELLULAIRE ET TISSULAIRE*

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER N°

Nancy, le *11 février 2008*

Le Président de l'Université


Jean-Pierre FINANCE



Ce travail de thèse avait pour objectif de développer un système de vectorisation de molécules d'intérêt thérapeutique pour le traitement des pathologies ostéoarticulaires. En effet, les traitements actuels visent plus à traiter les symptômes qu'à enrayer la progression de la pathologie, la difficulté majeure étant la délivrance des molécules et leur adressage. La thématique de recherche a été développée selon deux axes de travail, (1) l'élaboration de systèmes nanoparticulaires, au sein desquels ont été encapsulées différentes molécules (traceur fluorescent, principes actifs) et (2) l'évaluation biologique des systèmes ainsi obtenus sur différents contingents cellulaires. L'originalité de ce travail repose d'une part sur le processus de préparation des nanoparticules mais également sur le recouvrement de leur surface celui-ci étant destiné à renforcer leur tropisme pour les cellules articulaires, les chondrocytes. Nous avons pu, grâce au procédé de synthèse mis au point, préparer différents lots de nanoparticules, encapsulant plusieurs types de molécules, qu'il s'agisse de dextrane FITC (traceur biologique) ou des principes actifs, comme la chondroïtine sulfate ou l'acide hyaluronique. Le choix du recouvrement de surface des nanoparticules par le hyaluronate (HA) a été déterminé par le fait que les cellules chondrocytaires expriment à leur surface un récepteur spécifique du HA, le CD44. Une fois le processus de synthèse et de recouvrement des nanoparticules établi, le travail a consisté à démontrer *in vitro* l'innocuité des particules (cytocompatibilité, absence d'effets pathogènes, maintien de l'activité de biosynthèse matricielle) et l'intérêt du recouvrement par le HA destiné à favoriser l'internalisation dans les chondrocytes. Après avoir montré la plus forte affinité des nanoparticules recouvertes de HA (en comparaison avec un recouvrement par le poly(alcool vinylique) pour les chondrocytes, nous avons testé le système de vectorisation en injectant nanoparticules chez des animaux sains par voie intraarticulaire infrapatellaire. Les résultats obtenus concernant la cytocompatibilité, l'absence d'effets pathogènes et le maintien de l'activité de biosynthèse ont confirmé ceux observés lors des expériences réalisées *in vitro*.

Mots clefs : Acide hyaluronique, cartilage, CD44, nanoparticule, vectorisation, internalisation, adressage cellulaire

The aim of the present work was to develop a nanoparticulate system of vectorisation of therapeutic interest molecules for the treatment of osteoarticular pathologies. Nowadays, treatments aim more at treating the symptoms than to stop the pathology progress, major difficulty being the release of molecules and their addressing. The objectives of such a research consist on two working axes, (1) the development of nanoparticulate systems, in which we have encapsulated various molecules (fluorescent tracer, pharmacological compounds) and (2) the evaluation of systems so obtained on different cells contingents. The originality of our work is on one hand the process of preparation of nanoparticles and on the other hand the coating of nanoparticles with HA in order to increase interactions with articular cells, chondrocytes. Thanks to our technique of synthesis, we could prepare different types of nanoparticles, loading several molecules like dextran FITC (biological tracer) or active principles, as the chondroitin sulphate or hyaluronic acid (HA). The choice of the HA for coated the nanoparticles surface was decided because it is well known that chondrocytes express in their surface a specific receptor of hyaluronic acid, CD44. Once the process of synthesis and the coating of nanoparticles established, our job consisted in showing the harmlessness of particles *in vitro* (cytocompatibility, lack of pathogenic effects, preservation of the matrix biosynthesis/turnover) and the interest of coating nanoparticles by HA to facilitate the internalisation by chondrocytes. We showed a stronger affinity of nanoparticles covered with HA (versus PVA-coated nanoparticles) for chondrocytes (versus synoviocytes). We also tested our cells targeting system by injecting nanoparticles by intraarticular way at healthy animals. The obtained results confirmed those observed during the *in vitro* experiments what allows us to validate the concept of vectorization of therapeutic molecules by means of nanoparticulate systems for the osteoarticular diseases.

Key words : Hyaluronic acid, cartilage, CD44, nanoparticle, vectorization, internalization, cell targeting