



HAL
open science

Nanoparticules recouvertes de dérivés amphiphiles de hyaluronate pour la vectorisation de molécules d'intérêt pour le traitement des pathologies de l'articulation

Hervé Zille

► **To cite this version:**

Hervé Zille. Nanoparticules recouvertes de dérivés amphiphiles de hyaluronate pour la vectorisation de molécules d'intérêt pour le traitement des pathologies de l'articulation. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2012. Français. NNT : 2012LORR0320 . tel-01749660

HAL Id: tel-01749660

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749660v1>

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>



**UNIVERSITÉ
DE LORRAINE**

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par **Hervé ZILLE**

**Nanoparticules recouvertes de dérivés
amphiphiles de hyaluronate pour la vectorisation
de molécules d'intérêt pour le traitement des
pathologies de l'articulation
soutenue le 10 décembre 2012**

Membres du jury :

Rapporteurs :

Mme Valérie HEROGUEZ

DR, LCPO UMR 5629, Bordeaux

Mme Véronique MIGONNEY

DR, CSPBAT UMR 7244, Paris

Examineurs : Mme Odile CHAMBIN

PR, EMMA EA 581, Dijon

Mr Pierre GILLET

**PU-PH, LPPIA UMR7561 Nancy Université,
directeur de thèse**

Mr Laurent GROSSIN

**CR1, LPPIA UMR 7561 Nancy Université, co-
encadrant de thèse**

Mr Jean-Luc Six

PU, LCPM UMR 7568, Nancy

**UMR 7561, Laboratoire de Physiopathologie et Ingénierie Articulaires, NANCY 1 Faculté de
Médecine - Bâtiment Biopôle.**

Remerciements

Je tiens à remercier la région Lorraine et le CNRS qui ont financé ce projet.

Je remercie Monsieur le Professeur Jacques Magdalou et Madame la Professeure Brigitte Jamart-Grégoire pour m'avoir accueilli et facilité mon intégration au sein des UMR 7561 et 7568.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur Pierre Gillet, directeur de ma thèse, pour son aide, son soutien sans faille, soyez assuré de toute ma gratitude.

Les *co*-encadrants de ce travail, Monsieur Laurent Grossin et Monsieur le Professeur Jean-Luc Six, merci à tous les deux d'avoir été à mes côtés jusqu'au bout et en particulier lors de la finalisation de ce manuscrit, j'ai appris énormément et passé de très bons moments en votre compagnie. J'espère pouvoir vous rendre un jour la pareille.

Je souhaite également remercier Mesdames Valérie Heroguez (Directrice de Recherche) et Véronique Migonney (Directrice de Recherche), je suis très honoré que vous ayez accepté d'être rapportrices de ce mémoire.

De même, je suis très honoré que Madame la Professeure Odile Chambin ait accepté d'être examinatrice de ce travail.

Je tiens à remercier les personnes avec qui j'ai travaillé au sein de chaque équipe : Christel Astrid, Emilie, Jean Marc, Marthe, Emmanuelle (merci beaucoup pour ton aide), Alain, Cécile et Jérôme.

Un grand merci aux secrétaires de chaque laboratoire, Nadia, Ghislaine, Valérie, Karine, Olinda, Jeanine et Amélie pour tout ce que vous avez fait pour moi.

Je remercie particulièrement Madame Marie Christine Grassiot (SEC-MALLS), Monsieur Olivier Fabre (RMN), Michel Thiery (rats) et Monsieur Jean Claude Sivault (dès que quelque chose ne fonctionne pas) pour leur aide, leur gentillesse et leur disponibilité.

Je remercie également Monsieur Jean François Remy (LRGP UPR 3349) pour son aide lors des analyses par MEB.

Que Madame Hélène Primerano, secrétaire de l'école doctorale biose, reçoive toute ma sympathie.

Je (re)remercie Jean Luc Six et Sandrine Gulberti pour m'avoir fait confiance et m'avoir confié des vacances à L'école Européenne d'Ingénieurs en Génie des Matériaux de Nancy ainsi qu'à l'Institut Universitaire de Technologie de Nancy Brabois.

Merci aussi à tous mes amis mais aussi collègues :

- Kévin, voté colloc d'or pour la saison 2009/2010, pour tous ces moments passés ensemble et tes talents de cuisinier
- Jo, l'homme qui « a des mains qui n'ont pas tripoté que des pipettes », pour ton aide au laboratoire mais surtout pour les bons moments passés ensemble
- Mathieu, pour ton aide notamment lors des manip *vivo*, je suis fier de t'avoir fait aimer la chimie (N'oublie jamais que la biologie c'est de la chimie qui bouge)
- Jean Baptiste, pour ton éclairage sur certaines notions de biologie, tu resteras pour moi le plus grand clubber de tout Nancy
- Le Caporal David, le colloc universel, chanteur au talent méconnu, qui entre autre m'a fait découvrir le bazooka à azote
- Fred, ambassadeur de la Moselle à l'étranger, tu devrais bientôt recevoir ton chèque cadeau de chez Beckman
- Double Doc Pij, d'après wikipédia, les injections de pectine dans les muscles, c'est le secret des plus grand bodybuilders
- Ludovic, champion du laboratoire de minigolf
- Charlotte, pour tous les bons moments passés ensemble (bisous à Michael Green de ma part)
- Maxime, allez encore un effort et tu auras fini aussi (en attendant, félicitations pour le plateau, pas facile de ne pas renverser de verres en moto)
- Jing, mon « petit » chinois préféré (attention tu deviens un « banana » !)

Et aussi tous les thésards et étudiants de chaque laboratoire en particulier Man, Rudy, Les Thaïlandaises : Poup, Nan, Nutch et Nat, Les WPI : Victoria, Amanda, Meghan et Scott, Khalid, Hicham ainsi qu'Asutoch.

D'une manière générale je souhaite remercier toutes les personnes que j'ai pu côtoyer dans chacun des laboratoires.

Merci aussi à ma famille pour son soutien indéfectible :

- mes parents qui pourront enfin venir à Chicago « c'est bon », j'espère que vous êtes fiers de moi
- Nona et Nono, plus la peine de s'inquiéter au téléphone cette fois c'est fini!
- Biquette, désolé je garde la montre, merci pour tes conseils et ton aide précieuse
- Lapin, 每次你的安排是不存在的, 要小心, 因為我們將在那裡為你的論文 (Tu t'arranges pour ne pas être là pour les soutenances mais on sera là pour la tienne)!
- Alfredo, j'espère que tu sauras me donner des conseils de visibilité
- CapeCod Grandma, thank you for all the goodies and especially The Carrot Cake, they sure helped a lot ! GO YANKEES !
- CapeCod Grandpa, thank you for letting me out of the well, I'll take care of your girl

Tous mes amis qui ont tant attendu ce moment et qui, je le sais, sont heureux pour moi.

Plus généralement, je tiens à remercier toutes les personnes qui, de près ou de loin, parfois sans le savoir, ont contribué à l'aboutissement de ce projet.

Last but absolutely not least, I want (have) to say thank you to my wife, you were in the shadow during the whole project and won't even be able to enjoy the presentation. You have been supportive during the whole Thesis and it wasn't easy every days. Thank you for pushing (punching?) me when I needed to. I'll try to pay you back during the next 60 years but I don't know if it's going to be enough.

Thank you for being here with me all the time, no matter what. I love you.

Je veux dédier cette thèse à ma femme,

“S’il n’y a pas de solution c’est qu’il n’y a pas de problème”

Proverbe Shadock

Table des Matières

Introduction générale	17
Chapitre I : La Vectorisation	21
I. Introduction	21
II. Les différentes générations de vecteurs	22
A. Les vecteurs de 1 ^{ère} génération : Les vecteurs hépato-spléniques	23
B. Les vecteurs de 2 ^{ème} génération : Les vecteurs furtifs	23
C. Les vecteurs de 3 ^{ème} génération : Les vecteurs à reconnaissance moléculaire	25
III. Le ciblage	26
A. Voie d'administration	26
B. Modifications de l'environnement	27
C. Influence de paramètres extérieurs	27
IV. Les avantages de la vectorisation	28
A. La protection de la molécule encapsulée	28
B. Une réduction des effets secondaires et/ou toxiques des principes actifs	28
C. L'amélioration des profils pharmacocinétiques	28
D. La sélectivité de la libération	29
V. Les différents types de vecteurs particuliers	29
A. Les particules organiques	30
1) Les liposomes.....	30
a) Synthèse des liposomes.....	31
b) Utilisation.....	31
c) Inconvénients	31
2) Les particules polymères.....	32
a) Les méthodes de préparation des particules polymères	32
(a) La synthèse de particules par polymérisation	33
(b) Formulation de particules à partir de polymères préformés	34
(i) L'émulsion/évaporation de solvant organique.....	34
(ii) Nanoprécipitation.....	34
(iii) Coacervation	35
(iv) Les fluides supercritiques (FSC).....	35
(a) SAS (Supercritical Anti Solvent).....	35
(b) RESS (Rapid Expansion of Supercritical Solution)	36
(v) Salting out	36
b) Les principaux constituants des particules polymères.....	36
(a) Matériaux cœur	36
(i) Les poly(cyanoacrylates d'alkyle) : PACAs.....	37
(ii) Les polyesters	37
(a) Les poly(α -hydroxy esters).....	37

(b)	Les poly(hydroxy alkanotes)	38
(c)	Les poly(β -amino esters).....	39
(iii)	Les poly(acides aminés) : PAAs.....	40
(b)	Les principaux polymères de surface.....	41
(i)	Le poly(éthylène glycol) (PEG).....	41
(ii)	Les poly(vinyles)	42
(a)	Le poly(alcool vinylique) : PVA	42
(b)	La poly(N-vinyl-pyrrolidone): PVP	43
(iii)	Les polysaccharides	43
(a)	Le chitosane	44
(b)	L'alginate.....	45
(c)	Le dextrane	45
c)	Encapsulation de molécules hydrosolubles.....	47
3)	Les Nanoparticules solides lipidiques.....	48
a)	Méthodes de préparation des SLN	49
b)	Encapsulation de principes actifs.....	50
4)	Les Cyclodextrines.....	51
5)	Les dendrimères	54
a)	Méthodes de synthèses.....	54
b)	Utilisation des dendrimères	55
B.	Les particules inorganiques	55
1)	Les Quantum Dots : QDots	55
a)	Synthèse des QDots	56
b)	Avantages des QDots par rapport aux sondes traditionnelles.....	58
c)	Applications biomédicales	58
2)	Les Particules d'oxyde de fer : SPIOs.....	59
a)	Définition du superparamagnétisme	59
b)	Les méthodes de préparation des SPIOs.....	60
c)	Applications des SPIOs au niveau biomédical.....	61
3)	Les particules d'or.....	62
a)	Synthèse des nanoparticules d'or.....	62
b)	Applications biomédicales des nanoparticules d'or.....	63
VI.	Les particules employées pour le diagnostic et le traitement des pathologies de l'articulation.....	64
	Conclusions du chapitre.....	66

CHAPITRE II : SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION DES DÉRIVÉS AMPHIPHILES

DU HA	75
I. Généralités sur le Hyaluronane	75
A. Origine.....	75
B. Structure	76
C. Propriétés du HA en solution.....	79
D. Rhéologie du HA.....	80
E. Propriétés biologiques et applications	81
F. Applications biomédicales du HA	82
G. Synthèse du HA	84
H. Régulation du HA	87

I.	Dégradation du HA dans l'organisme	87
J.	Les récepteurs du HA	89
	1) Le CD44	89
	2) RHAMM	92
	3) HARE et LYVE-1	94
K.	Les modifications chimiques du HA	96
	1) Modification du motif amide	98
	2) Modification du groupement hydroxyle.....	98
	3) Modification du groupement carboxyle	99
II.	Synthèse des dérivés amphiphiles du HA : HAC6	100
A.	Protocole de synthèse des HAC6	101
B.	Stabilité du squelette de HA au cours de la synthèse	103
	1) L'acidification du HANA.....	103
	2) Suivi des masses molaires pendant l'acidification	104
	3) Conclusions sur la stabilité du polymère lors de l'acidification	106
	4) Etude par RMN ¹ H de la pureté des polymères obtenus	107
	5) Conclusion sur la synthèse des HAC6	110
C.	Propriétés physico-chimiques en solution aqueuse des HAC6.....	110
	1) Principe de mesure	110
	2) Résultats	112
	3) Tension superficielle	113
	4) Tensiométrie interfaciale.....	114
	5) Conclusion sur les propriétés tensio-actives des HAC6	116
	Conclusions du chapitre	117

Chapitre III : Formulation et caractérisation de nanoparticules polymères recouvertes de HAC6

I.	Objectifs	125
II.	Procédé d'émulsion/évaporation de solvant organique	125
III.	Techniques de mesure de la taille des particules	126
A.	Granulomètre à diffraction laser	126
B.	Mesure des diamètres des particules par microscopie électronique à balayage	129
IV.	Optimisation des conditions de formulation et de stockage des particules	130
A.	Variation de la concentration en HAC6 dans la phase aqueuse externe	130
	1) Cas des émulsions simples	130
	2) Cas des émulsions doubles	133
B.	Purification des nanoparticules.....	137
C.	Stockage des particules.....	142
D.	Conclusion sur la formulation de particules « vides » par double émulsion.....	145
V.	Encapsulation de molécules d'intérêt	145
A.	Les traceurs fluorescents	145
	1) La fluorescéine	145
	2) Cyanine 3	148
B.	Les molécules d'intérêt thérapeutique : le HA et la CS	150
	1) Principe du dosage du HA et de la CS par ECZ	150
	2) Cas du HA en surface des particules.....	151
	3) Particules contenant du HA.....	153

a)	Evolution du diamètre des particules	153
b)	Dosage de la quantité totale de HA (HANa encapsulé + HAC6).....	154
4)	Particules contenant de la CS.....	154
a)	Evolution du diamètre.....	154
b)	Dosage de la quantité de CS encapsulée.....	155
C.	Conclusion sur l'encapsulation de molécules d'intérêt	156
	Conclusions du chapitre	157

Chapitre IV : Description des articulations synoviales, des pathologies associées et évaluation biologique des particules synthétisées	161
I. Les articulations	161
II. Les différents composants d'une diarthrose	162
A. Le cartilage articulaire.....	162
1) Description du cartilage hyalin	163
2) Les chondrocytes.....	165
3) La matrice extra cellulaire (MEC)	167
4) Les collagènes	168
5) Les protéoglycanes.....	171
6) Les protéines non collagéniques	174
7) Homéostasie du cartilage	174
B. La membrane synoviale.....	174
C. Le liquide synovial.....	177
D. L'os sous chondral	178
III. L'arthrose	179
A. Diagnostic de l'arthrose.....	180
B. Examens	180
C. Traitements	182
1) Les traitements non médicamenteux.....	182
2) Les traitements médicamenteux.....	183
3) La chirurgie	183
a) Lavage/débridement articulaire.....	183
b) Stimulation osseuse.....	184
c) Greffes.....	185
d) Mosaic plastie	185
e) ACI (implantation de chondrocytes autologues)	186
f) Arthroplastie	187
IV. Evaluation biologique des particules recouvertes de HAC6 (HABioC6)	188
A. Etudes <i>in vitro</i>	189
1) Etude de l'activité mitochondriale et de la viabilité cellulaire.....	189
2) Internalisation des particules par les cellules?	192
3) Etude de l'influence des particules sur la production d'ARN messagers par les chondrocytes : Biologie moléculaire.....	194
4) Conclusion sur l'évaluation <i>in vitro</i> des particules	198
B. Etudes <i>in vivo</i>	198
1) Rappel des résultats obtenus précédemment.....	198
2) Poursuite de l'évaluation <i>in vivo</i> des particules, résultats obtenus au cours de nos travaux..	201
3) Analyse histologique des compartiments articulaires	201

a)	Observation des coupes de membranes synoviales.....	203
b)	Observation des coupes de rotules.....	203
4)	Localisation des particules fluorescentes au niveau des tissus	204
	Conclusions du chapitre	206
	Chapitre V : Matériels et méthodes	211
	I. Synthèse des dérivés amphiphiles du HA	211
A.	Protocole de synthèse des HAC6	211
B.	Détermination du taux d'acidification.....	212
C.	Méthodes de caractérisation des différents produits.....	213
1)	Mesure des masses molaires	213
a)	Rappels sur la théorie de la diffusion de la lumière.....	213
b)	Equipements.....	214
c)	Conditions expérimentales	214
2)	Etude par RMN ¹ H.....	215
a)	Principe	215
b)	Le déplacement chimique	215
c)	Conditions expérimentales	216
d)	Détermination du taux de substitution des HAC6	216
D.	Propriétés des HAC6 en solution	218
	II. Formulation des nanoparticules	220
A.	Généralités sur les émulsions	220
B.	Stabilité des émulsions	220
C.	Protocole de formulation d'une émulsion simple (o/w)	221
D.	Protocole de formulation d'une émulsion double	222
E.	Evaporation du solvant organique	223
F.	Mesure de la taille des particules	224
1)	Principe de la diffraction de la lumière	224
2)	Théorie de Mie	225
3)	Théorie de Fraunhofer.....	226
4)	Principe de la mesure par le Mastersizer.....	227
5)	Protocole de mesure de la taille des particules par diffraction de la lumière.....	227
6)	Confirmation des diamètres de particules par microscopie électronique à balayage.....	227
G.	Optimisation des conditions de formulation des particules.....	228
1)	Centrifugations.....	228
2)	Protocole de lyophilisation des particules.....	229
3)	Lyoprotecteurs.....	229
	III. Electrophorèse Capillaire	229
1)	Historique de l'électrophorèse	229
2)	Principe	230
3)	L'électro-osmose.....	231
4)	Electrophorèse capillaire par association ionique	232
5)	Protocoles utilisés pour le dosage des polysaccharides	232
a)	Cas du HA.....	232
b)	Cas de la CS.....	233
c)	HA en surface : protocole 1.....	233
d)	Quantité totale de HA ou de CS : protocole 2	233

e) Dosage par ECZ	234
IV. Partie évaluation biologique des nanoparticules	235
A. Etude <i>in vitro</i> du potentiel inflammatoire des particules.....	235
1) Resuspension des particules.....	236
2) Culture cellulaire de chondrocytes	236
3) Culture cellulaire des synoviocytes.....	237
4) Entretien des cellules.....	237
5) Evaluation de la cytotoxicité des particules vis à vis des cellules	237
a) Test MTT	238
b) Test LDH	238
c) Microscopie optique.....	239
6) Biologie moléculaire	240
a) Extraction des ARN totaux de cellules cultivées en monocouches	240
b) Vérification de l'intégrité des ARN totaux extraits	241
c) Transcription inverse avec la reverse transcriptase M-MLV	241
d) PCR quantitative en temps réel.....	242
1. Principe	242
2. Intérêt de la technique de PCR quantitative.....	243
3. Principe de la technique de PCR quantitative	244
a) Exploitation des données	244
1. Protocole expérimental	244
2. Courbe de fusion	245
b) Analyse des résultats.....	245
c) Traitement statistique des résultats	246
B. Etude <i>in vivo</i> du devenir des particules	246
1) Préparation des animaux	246
2) Injection d'une suspension de particules.....	246
3) Sacrifice et dissection.....	247
4) Histologie et microscopie.....	247
a) Hématoxyline-Eosine-Safran (HES).....	247
b) Rouge Sirius.....	248
c) Bleu de toluidine	248
Conclusion générale	251

Liste des Abréviations

A :

Å: Angstrom

ADN: Acide Désoxyribonucléique

ADNc : Acide Désoxyribonucléique complémentaire

AFM : Microscopie à Force Atomique

AINS: Anti Inflammatoires Non Stéroïdiens

ARMM: Antirhumatismaux Modificateurs de la Maladie

ARN : Acide Ribonucléique

B :

BBDE : Ether Butanediol-Diglycidylque

BMP-7 : Protéine Osseuse Morphogénétique 7 (Bone Morphogenetic Protein 7)

BSA : Albumine de Sérum Bovin

BSA-Cy3 : BSA couplée à la Cyanine 3

C :

C6 : Groupements hexyle

CD44: Cluster de Différenciation 44

CD : Cyclodextrine

CD : Cluster de Différenciation

CMC : Concentration Critique Micellaire

Col1 : Collagène de type I

Col2 : Collagène de type II

COMP : Cartilage Oligomeric Matrix Protein

Cox-2: Cyclo-oxygénase 2

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse

CS : Chondroïtine Sulfate

Cy3 : Cyanine 3

D :

DA : Degré d'Acétylation

DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole

DDA : Dodécylamine

DEX-FITC : dextrane couplé à la FITC

DMARD : Disease-Modifying Antirheumatic Drug

DMSO : Diméthyl Sulfoxyde

DMF : Diméthyl Formamide

DMEM/F12 : Milieu Eagle Modifié

D₂O: eau deutérée

DTT : Dithiothréitol

DVS : Divinyl Sulfone

DXM : Dexaméthasone

E :

ECZ : Electrophorèse Capillaire de Zone

ECZ-AI: Electrophorèse Capillaire de Zone par Association Ionique

EDC : N-(3-diméthylaminopropyl)-N'-éthylcarbodiimide

EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétracétique

EGF: Facteur de Croissance Epidermique (Epidermal Growth Factor)

ELISA : dosage d'immunoabsorption par enzyme liée (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

EPR : effet de perméabilité et de rétention augmentée (Enhanced Permeability and Retention)

F :

FDA : Food and Drug Administration

FITC : Isothiocyanate de Fluorescéine

FSC : Fluides Supercritiques

G :

GAG : Glycosaminoglycane

GPI: Glycosylphosphatidylinositol

GRAS : Généralement Reconnu comme Sûr (Generally Recognize As Safe)

GTA : Glutaraldéhyde

H :

HA: Hyaluronate de sodium

HAC6 : HA estérifié par des groupements hexyle

HARE : Récepteur du HA pour l'Endocytose (HA Associated Receptor for Endocytosis)

Has : enzyme de synthèse du HANA

HAS : gène codant pour les Has

HCl : acide chlorhydrique

HDA : Hexadécylamine

HDPE: Polyéthylène Haute Densité (High Density Polyethylene)

HeLa : lignée de cellules cancéreuses (col de l'utérus)

HES: Hématoxyline-Eosine-Safran

HPG : Polyglycérols Hyperbranchés

HPLC : Chromatographie Liquide Haute Performance

HPPS : High Performance Particle Sizer

HYAL : gène codant pour les hyaluronidases

I :

ICAM- 1 : molécule d'adhésion intercellulaire (InterCellular Adhesion Molecule 1)

ICRS: *International Cartilage Repair Society*

IgA : Immunoglobuline A

IgG : Immunoglobuline G

IgM : Immunoglobuline M

IL-1: Interleukine 1

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

IV : Intra Veineuse

L :

LDH : Lactate Déshydrogénase

LUV : Liposomes de grande taille (Large Unilamellar Vesicle)

LYVE-1 : récepteur du HA (LYmphatic Vessel Endothelial)

M :

MALLS: diffusion de la lumière multi angles (Multi Angle Laser Light Scattering)

MAP : protéines associées aux microtubules (Microtubule Associated Protein)

MAPK: protéine kinase à activation mitogénique (Mitogen-Activated Protein Kinase)

MCF-7 : lignée de cellules tumorales (cancer du sein)

MEB : Microscopie Electronique à Balayage

MEC : Matrice Extra Cellulaire

MET : Microscopie Electronique à Transmission

MIO : oxyde de fer monocristal

MLV : liposomes multilamellaires (Multi Lamellar Vesicle)

MMLV : virus de la leucémie murine (Moloney Murine Leukemia Virus)

MMP : Métalloprotéases matricielles (Matrix Metalloproteinase)

MS : Spectrométrie de Masse

MTT : bromure de 3-[4, 5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tétrazolium

MTX: Methotrexate

N :

N_A : Nombre d'Avogadro

NaOD: soude deutérée

NIF-HANa : Fractions Non Inflammatoires de HANa

NMLW: poids limite moléculaire nominal (Nominal Molecular Weight Limit)

NP : Nanoparticules

dNTP : Désoxyribonucléotide Triphosphate

P :

PA : Principe Actif

PAA : poly(acides aminés)

PACA : poly(cyanoacrylate d'alkyle)

PbAE: poly(β -amino esters)

PAMAM: poly(amidoamine)

PBS : tampon phosphate (Phosphate Buffer Solution)

PCL : poly(ϵ -caprolactone)

PCRq : réaction en chaine par polymérase (quantitative Polymerase Chain Reaction)

PCS : Spectroscopie à Corrélacion de Photon

PDGF : facteur de croissance dérivé des plaquettes (Platelet Derived Growth Factor)

PEG : poly(éthylène glycol)

PGA: poly(acide glycolique)

PHB : poly(hydroxybutyrate)

PHBV : poly(hydroxybutyrate-*co*-valérate)

PHV: poly(hydroxyvalérate)

PIB : Produit Intérieur Brut

PIC[®] Reagent A: réactif pour la chromatographie par paire d'ions (Paired-Ion Chromatography)

PLA : poly(acide lactique)

PLGA : poly(acide lactique-*co*-glycolique)

PPG: poly(propylène glycol)

PVA : poly(alcool vinylique)

PVP : poly(N-vinyl-pyrrolidone)

Q :

Q Dots : Quantum Dots

R :

RES : Système Réticulo-Endothélial

RESS : Expansion Rapide d'une Solution Supercritique (Rapid Expansion of Supercritical Solution)

RHAMM : Récepteur pour la Mobilité et la Motilité du HA (Receptor for HA Mediated Motility)

RLT : tampon de lavage

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

RP29 : gène de ménage utilisé comme référence

RPE : tampon de lavage

RPLP0 : gène codant pour les protéines ribosomales utilisé comme gène de ménage

RW1 : tampon de lavage

S :

SAS : Anti Solvant Supercritique (Supercritical Anti Solvent)

SDS : Dodécyl Sulfate de Sodium

SEC : Chromatographie d'Exclusion Stérique

SLN : Nanoparticules Solides Lipidiques (Solid Lipid Nanoparticles)

SOP : Procédure Standard Automatisée

Sox : facteurs de transcription impliqués dans l'embryogénèse et la différenciation des cellules (Sry-related HMG box)

SPAM-1: Sperm Adhesion Molecule 1

SPIO: Oxyde de Fer Superparamagnétique (Super Paramagnetic Iron Oxyde)

SPM: Système Phagocytaire Mononucléé

SSPIO : SPIO Standard

STAB2 : Stabiline 2

SUV : liposomes de petite taille (Small Unilamellar Vesicle)

SVF : Sérum de Veau Fœtal

T :

TBA : Tétrabutyl Ammonium

TGF- β 1: Facteur de Croissance de Transformation (Transforming Growth Factor β 1)

THF: Tétrahydrofurane

TIMP-1: Inhibiteur Tissulaire des Métalloprotéinases Matricielles 1

TMS: Tétraméthylsilane

TNF- α : Facteur de Tumeur Nécrotique (Tumor Necrosis Factor alpha)

TOP : Trioctylphosphine

TOPO : Oxyde de Trioctylphosphine

U :

UDP : Uridine Diphosphate

USPIO : SPIO Ultrapetites (Ultrasmall SPIO)

UV : Ultra Violet

Introduction générale

Les pathologies qui affectent les articulations et plus particulièrement les articulations portantes sont un des problèmes majeurs du monde occidental.

Elles engendrent douleurs, diminution de la mobilité articulaire et réduisent considérablement le confort de vie des personnes atteintes. Les Etats-Unis d'Amérique comptaient plus de 40 millions de personnes concernées par ces affections en 2007 (15 % de la population) et l'on estime que leur nombre va augmenter à 60 millions à l'horizon 2020¹. L'Europe n'est pas épargnée par ces problèmes : par exemple 4,6 millions de personnes en France sont touchées par de l'arthrose symptomatique. Le coût financier y est estimé, entre la prise en charge hospitalière et la mise en place de prothèses (120 000 prothèses de hanche et de genou par an), à 2,6 milliards d'euros par an.

Les causes de ces pathologies articulaires sont en partie connues mais pas totalement caractérisées, les principales étant le poids de l'individu, son âge, son sexe, des prédispositions génétiques ou encore des traumatismes subis au niveau des articulations.

Il n'existe à ce jour pas de médicament permettant de guérir totalement les patients. De nombreuses méthodes de traitement ont été développées pour tenter de soigner au mieux les articulations, de l'administration d'anti-inflammatoires jusqu'à la chirurgie.

Parmi les techniques invasives « douces », la vectorisation de molécules d'intérêt en intra-articulaire au moyen de nanoparticules est un secteur en plein essor. Cette technique doit permettre de favoriser la biodisponibilité de ces molécules d'intérêt (principes actifs) au niveau articulaire et de limiter leur biodistribution dans l'ensemble du corps. L'objectif est d'une part de pouvoir augmenter l'effet des principes actifs vectorisés (ce qui peut favoriser des molécules jusqu'alors négligées) et d'autre part de limiter les éventuels effets secondaires induits par l'utilisation de certains principes actifs.

Les travaux décrits dans ce manuscrit concernent l'élaboration de particules polymère pouvant, après injection intra-articulaire, interagir de manière ciblée avec les cellules de l'articulation et plus précisément les cellules du cartilage : les chondrocytes.

Ces vecteurs doivent donc suivre des critères précis en terme de biocompatibilité, dégradabilité ou encore taille afin d'être utilisables chez l'être humain. Il faut de plus qu'elles puissent encapsuler des molécules d'intérêt en quantité suffisante pour déclencher une réponse biologique favorable.

Pour répondre à ces critères, nous avons choisi comme matériau cœur des particules le PLGA (acide poly(lactique-*co*-glycolique)) qui est un polymère hydrophobe biocompatible. La molécule utilisée pour le recouvrement du cœur de la particule est un dérivé amphiphile de l'acide hyaluronique (HA). Le HA est un polysaccharide naturellement présent dans le corps humain et possède la caractéristique de former des complexes avec un récepteur membranaire des chondrocytes : le CD44.

Cette interaction spécifique est l'élément important de ces travaux de recherche. Grâce à la présence de HA modifié en surface des particules, nous espérons favoriser la reconnaissance des particules par les chondrocytes après injection intra-articulaire. Idéalement, cette interaction va entraîner une internalisation des particules, libérant ainsi les principes actifs encapsulés dans les cellules lors de la dégradation de la matrice polymère.

Ce manuscrit est divisé en cinq chapitres décrivant les travaux effectués.

Le premier chapitre sera consacré à la vectorisation. Après une brève explication de ce concept, nous détaillerons les différents types de vecteurs pouvant être utilisés au niveau biomédical, en insistant sur les applications au niveau articulaire.

Dans le deuxième chapitre, nous présenterons l'acide hyaluronique, ses propriétés chimiques, physico-chimiques ainsi que biologiques puis nous mentionnerons les différents travaux reportés dans la littérature pour modifier ce polysaccharide afin de lui conférer des propriétés physico-chimiques différentes. Enfin, nous exposerons les résultats obtenus au cours de nos travaux, à savoir l'estérification du HA par des chaînes hexyle et la caractérisation physico-chimique des dérivés amphiphiles obtenus.

L'utilisation des dérivés de HA synthétisés comme tensio-actifs pour stabiliser des émulsions fera l'objet du troisième chapitre. Nous y décrirons les conditions de formulation des particules que nous avons définies ainsi que les résultats obtenus lors des essais d'encapsulation de molécules fluorescentes et de molécules d'intérêt.

Le quatrième chapitre sera consacré à l'évaluation biologique des particules obtenues. Leur biocompatibilité vis à vis des cellules de l'articulation (chondrocytes et synoviocytes) a été évaluée *in vitro*. La localisation de nanoparticules renfermant des molécules fluorescentes *in vivo* a ensuite été effectuée, après injection intra-articulaire de ces particules dans des articulations de rats sains.

Le cinquième et dernier chapitre rassemble conditions expérimentales et théories.

Enfin, nous terminerons par les conclusions sur ces travaux ainsi que les différentes perspectives envisagées pour les poursuivre et les améliorer.

Références Bibliographiques

1. Schulz, R. M. & Bader, A. Cartilage tissue engineering and bioreactor systems for the cultivation and stimulation of chondrocytes. *Eur. Biophys. J.* **36**, 539–568 (2007).

Chapitre I : La Vectorisation

I. Introduction

Les objectifs de la médecine et de l'industrie pharmaceutique sont de pouvoir proposer les traitements les plus efficaces pour chaque maladie et ce à un coût supportable pour la collectivité.

Si l'on peut traiter une maladie par l'administration de médicaments ou de principes actifs (PA), c'est parce que l'on sait qu'une quantité suffisante des molécules vont atteindre leur cible dans l'organisme et provoquer un effet bénéfique supérieur aux éventuels effets secondaires. C'est ce qu'on appelle la biodisponibilité. On la définit comme le rapport entre la quantité de PA qui agit dans l'organisme par rapport à la quantité administrée.

L'inconvénient est que le plus souvent les molécules n'arrivent pas sur leur lieu de destination, soit parce qu'elles sont dégradées avant, soit parce qu'elles sont phagocytées, qu'elles ne parviennent pas à franchir les barrières biologiques (endothéliums, épithéliums) ou s'accumulent en d'autres endroits.

Ces inconvénients font que beaucoup de molécules aux effets thérapeutiques potentiellement intéressants ont dû être abandonnées en raison d'une biodisponibilité faible qui peut se traduire par des coûts ou des effets secondaires trop importants pour le service rendu.

Les solutions pour améliorer l'efficacité thérapeutique de ces molécules peuvent être apportées pour partie par les nanotechnologies. En effet, très vite certains scientifiques ont compris que pour éviter qu'un principe actif ne soit dégradé avant d'arriver à sa destination finale, il fallait le protéger de manière à prolonger sa durée de vie dans les différents fluides biologiques. Les principes de base de la vectorisation étaient posés.

On peut définir ce concept comme étant le moyen de protéger une molécule de manière à ce qu'une fois administrée on puisse lui garantir un temps de résidence suffisant dans le corps humain pour atteindre une cible prédéfinie et, si possible, favoriser sa localisation ainsi qu'éviter que sa présence dans d'autres organes, tissus ou cellules ne provoque d'effets secondaires trop importants. Le vecteur employé peut être soluble ou insoluble dans les fluides biologiques, mais doit être inactif du point de vue thérapeutique.

Dès lors, l'utilisation d'un vecteur peut apporter des améliorations considérables telles que :

- La diminution de la quantité de principe actif nécessaire pour dépasser le seuil d'efficacité thérapeutique
- Une réduction des effets secondaires éventuels des molécules en limitant leur dispersion dans le corps humain
- La limitation du nombre de prises de médicaments ou d'injections

Ces avantages permettent d'améliorer parfois considérablement la qualité de vie des patients et de réduire significativement les coûts d'un traitement.

Les vecteurs utilisables, s'ils doivent répondre à quelques critères essentiels pour leurs applications (tels que la biocompatibilité, l'absence de toxicité, une taille adéquate), sont seulement limités pour un objectif donné par l'inventivité de l'opérateur et les bénéfices qu'ils peuvent apporter lors d'un traitement médical.

Dans la grande majorité des cas, ils consistent en des colloïdes dont la structure interne est soit pleine c'est-à-dire formée d'une matrice (sphère), soit « creuse » ou plutôt contenant un cœur liquide (capsule). Pour une utilisation par injection, la taille des vecteurs doit être inférieure à quelques dizaines de μm (intraveineuse) et pour certains cas seulement quelques centaines de nm. On parle donc de microparticules (microcapsules et microsphères) et de nanoparticules (nanocapsules et nanosphères).

Nous détaillerons dans la suite de ce chapitre les différentes générations de vecteurs, les principes du ciblage ainsi que les avantages de la vectorisation. Puis nous mentionnerons les principaux types de particules qui ont été mises au point et sont employées pour la vectorisation de molécules d'intérêt (PAS ou agents de contraste). Enfin nous présenterons quelques exemples de particules utilisées comme vecteurs dans le cas de pathologies articulaires.

II. Les différentes générations de vecteurs

L'amélioration des procédés de vectorisation et la compréhension des phénomènes biologiques ont permis de développer différents vecteurs qui peuvent être utilisés en fonction des besoins. Il n'existe pas de vecteur universel, chaque problématique possède sa/ses propres solutions.

Ils peuvent être classés en 3 groupes appelés générations correspondants à l'évolution historique des recherches¹. Cette classification concerne surtout les systèmes colloïdaux de taille submicronique.

A. Les vecteurs de 1^{ère} génération : Les vecteurs hépato-spléniques

Ils correspondent à des particules de type liposomes et nanoparticules qui sont le plus souvent constituées de polymère tel que le poly(acide lactique) (PLA) ou le poly(acide lactique-*co*-glycolique) (PLGA) « nu » c'est-à-dire qu'ils ne possèdent pas de groupements fonctionnels spécifiques en surface. De fait, ces vecteurs sont généralement hydrophobes et présentent sur leur surface des groupements anioniques (carboxylates pour le PLA ou le PLGA)²⁻⁴. Une fois injectés par voie intraveineuse, ils vont s'accumuler préférentiellement dans le système réticulo-endothélial (RES), c'est-à-dire principalement le foie, la rate et les reins. Ceci est le résultat de leur opsonisation rapide, quelques minutes après leur injection. Ces vecteurs sont effectivement rapidement reconnus comme des corps étrangers et les opsonines (protéines cationiques présentes dans le sang) vont s'adsorber sur leur surface pour favoriser leur reconnaissance puis leur phagocytose par les macrophages⁵. Les macrophages sont présents en nombre dans le foie et la rate ce qui explique la concentration des particules dans ces organes (tropisme hépatosplénique).

Cette caractéristique est utile pour le ciblage de ces organes notamment dans le cas de cancer du foie. On a pu ainsi vectoriser de la doxorubicine grâce à des liposomes (Doxil[®]) qui vont s'accumuler dans le foie. La localisation préférentielle des particules permet de limiter les effets secondaires liés à la doxorubicine qui peut être toxique en particulier pour le cœur¹.

La taille des vecteurs est aussi un paramètre important : ils ne doivent pas être trop petits au risque d'être éliminés par les reins dont les pores mesurent quelques nanomètres de diamètre, ni trop gros car ils risqueraient de boucher les plus petits capillaires sanguins.

B. Les vecteurs de 2^{ème} génération : Les vecteurs furtifs

Ces vecteurs ont été développés pour limiter, sinon bloquer, les phénomènes d'opsonisation et de phagocytose. Il s'agit d'une évolution des vecteurs de première génération qui consiste à modifier leur surface soit en recouvrant le polymère constitutif du colloïde, soit en le modifiant pour rendre l'adsorption des opsonines défavorable et ainsi permettre une prolongation du temps de résidence des particules dans le système sanguin.

On parle alors de « furtivité » des vecteurs. Les molécules qui recouvrent la surface des particules vont induire un encombrement stérique qui va empêcher la reconnaissance du vecteur comme corps étranger.

Ceci est basé sur les travaux de Pierre Gilles de Gennes (prix Nobel de physique 1991) et son concept de répulsion stérique⁶.

La furtivité est particulièrement utile pour prolonger la durée de résidence des vecteurs dans la circulation sanguine (et donc les principes actifs qu'ils contiennent). On passe d'un temps de circulation de quelques minutes pour les vecteurs de 1^{ère} génération à quelques heures⁷ ce qui permet de cibler des organes autres que ceux du système hépatosplénique et notamment les tumeurs grâce à l'effet « EPR » (Enhanced Permeability and Retention).

En effet, dans le cas de tumeurs, on observe une hausse de la vascularisation en périphérie de celles-ci et donc potentiellement une plus grande accumulation des particules. Ce « ciblage » est particulièrement favorisé en raison de « l'effet EPR » : au niveau des tissus pathologiques l'endothélium vasculaire est plus perméable qu'au niveau des tissus sains⁸ de par l'existence de défauts dans la structure endothéliale et la migration des particules des vaisseaux sanguins vers les tumeurs va être favorisée (Figure I-1).

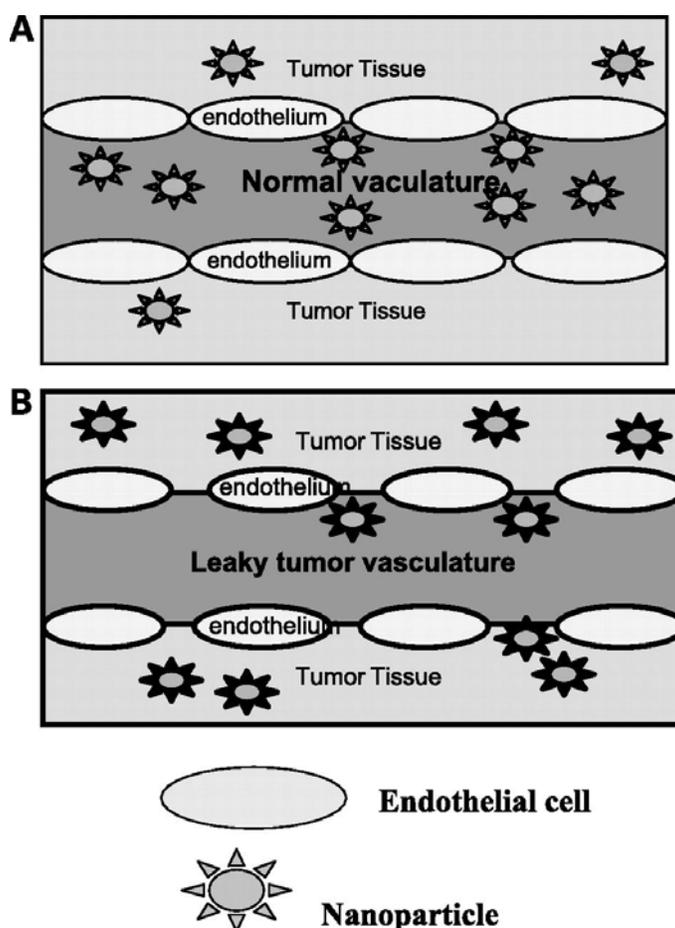


Figure I-1 : Représentation de l'état de l'endothélium cellulaire au voisinage des tissus sains (A) ou des tumeurs (B) d'après Sinha *et al.*⁹.

Les principales molécules utilisées pour rendre furtives les particules sont les poly(éthylène glycol) (PEG) qui sont des polymères hydrophiles. A concentration suffisamment élevée, ils vont adopter une conformation en forme de brosse, dite « end on » (Figure I-2), à la surface de la particule et donc considérablement limiter l'interaction entre les opsonines et le vecteur. Cette conformation résulte du fait que les PEGs sont greffés ou adsorbés sur la matrice par une de leurs extrémités. Lorsqu'un tensio-actif possède plusieurs point d'attache sur la matrice, on observe une conformation « side-on » (Figure I-2).

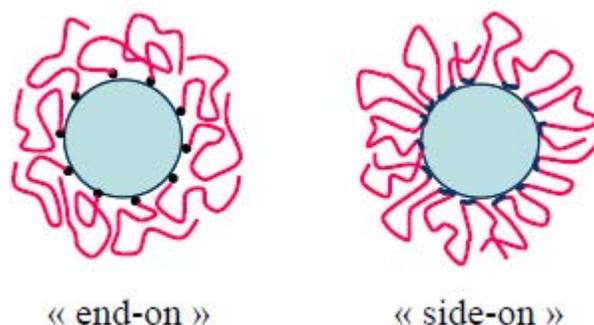


Figure I-2 : Schéma représentant l'adsorption de molécules tensio-actives (en rouge) à la surface de particules (en bleu)¹⁰. La conformation « end-on » est obtenue lorsque le tensio-actif ne possède qu'un seul point d'ancrage tandis que pour la conformation « side-on », la molécule possède plusieurs sites de fixation.

C. Les vecteurs de 3^{ème} génération : Les vecteurs à reconnaissance moléculaire

Ils permettent un ciblage choisi des particules envers un type de cellule spécifique. Leur fonctionnement suit le même principe que le système « clef-serrure ».

Ceci implique que les caractéristiques de surface des cellules visées soient suffisamment connues et différentes des autres pour que le ciblage soit efficace et que seules les cellules visées le soient (accumulation préférentielle des particules et donc diminution des effets secondaires dus à la non spécificité).

Ces vecteurs sont obtenus en greffant sur des vecteurs de 2^{ème} génération des molécules (anticorps, ligands, ...) pouvant reconnaître un marqueur particulier présent à la surface de la cellule ciblée¹⁰. Une fois dans le corps humain, les particules vont être reconnues par les récepteurs de la membrane cellulaire via la formation d'un complexe ligand-récepteur. Toutefois il existe un équilibre difficile à trouver entre la furtivité nécessaire aux vecteurs pour qu'ils possèdent une durée de vie suffisante pour atteindre leur cible et la reconnaissance voulue¹. La quantité de ligand présent à la surface des particules doit être suffisante pour favoriser le ciblage, mais si elle est trop importante la furtivité peut être défavorisée surtout si le ligand est hydrophobe et/ou chargé négativement et donc les particules vont être considérées comme des vecteurs de 1^{ère} génération et être opsonisées.

De l'acide folique¹¹, des anticorps monoclonaux¹² ou des peptides¹³ ont, entre autres, été greffés en surface de particules pour favoriser la reconnaissance avec un type cellulaire particulier.

Le ciblage actif d'un type cellulaire précis est obtenu grâce aux vecteurs de 3^{ème} génération. Il faut donc avoir suffisamment de connaissance des récepteurs présents à la surface des cellules pour favoriser l'accumulation des particules à proximité.

III. Le ciblage

L'injection d'un vecteur chargé en principe actif dans l'organisme ne suffit pas toujours à améliorer l'effet de celui-ci. Il faut s'assurer que les molécules soient libérées au plus près possible de la zone à traiter sinon on risque de provoquer des effets secondaires, et d'observer l'opsonisation du vecteur. La libération à des endroits non stratégiques des principes actifs conduit à une intervention ratée.

Il existe plusieurs méthodes pour favoriser la présence des vecteurs à un endroit précis. Ce concept est défini sous le terme de ciblage. Il a été proposé dès la fin du XIX^{ème} siècle par le Dr Paul Ehrlich (prix Nobel de médecine 1908) qui a imaginé une « magic bullet », vecteur capable d'interagir spécifiquement avec un tissu ou une cellule donné¹⁴.

Le ciblage constitue la délivrance du principe actif à proximité d'un tissu ou d'un type cellulaire. Il peut se faire soit par accumulation du vecteur qui va libérer les molécules qu'il contient au fur et à mesure de sa dégradation ou par endocytose, soit par déstabilisation de ce vecteur lorsqu'il circule à proximité de la cible.

On distingue deux types de ciblage : passif et actif.

Le ciblage passif peut s'avérer nécessaire si les principes actifs à délivrer ne visent pas les organes du système phagocytaire mononucléé (SPM) ; il repose principalement sur l'utilisation de moyens physiques pour délivrer préférentiellement les principes actifs.

Le ciblage actif s'appuie sur l'interaction entre des récepteurs membranaires et des molécules présentes à la surface des vecteurs pour favoriser l'accumulation des PAs au voisinage des cellules.

A. Voie d'administration

Un des paramètres les plus faciles à ajuster est la technique d'administration du vecteur dans l'organisme. En fonction du lieu de délivrance souhaité des principes actifs, certaines voies seront plus

intéressantes que d'autres. On peut citer l'injection intraveineuse pour cibler le foie ou la rate, une injection intra-articulaire produira beaucoup plus d'effets qu'une intraveineuse si l'on cherche à atteindre les chondrocytes du cartilage ou encore une absorption orale sera préférée si les muqueuses intestinales sont ciblées.

B. Modifications de l'environnement

Il est connu que l'environnement chimique au voisinage des tumeurs est différent de celui des tissus sains. Par exemple Tannock *et al.* ont montré que le pH peut être légèrement plus acide en raison d'un taux plus élevé de glycolyse aérobie et anaérobie¹⁵ ou la température peut y être plus élevée. La formulation de vecteurs dont la structure est sensible au pH ou à la température est donc un bon moyen de libérer des principes actifs à proximité de ces tumeurs¹⁶.

C. Influence de paramètres extérieurs

Il est relativement aisé de « conduire » les vecteurs vers un lieu désiré au moyen d'un guidage magnétique. Si les vecteurs renferment des molécules magnétiques, l'application d'un champ local suffisamment élevé permet la rétention et l'accumulation des vecteurs au niveau de la zone souhaitée. L'inconvénient de ces vecteurs est leur possible toxicité après utilisation ainsi que leur difficulté d'élimination.

De la même façon, une fois la zone atteinte, on peut favoriser la délivrance des principes actifs enfermés en déstructurant les vecteurs par ultrasons ou par hyperthermie locale¹⁷.

Dans les cas de cancer, les cellules tumorales expriment à leur surface des récepteurs au folate par conséquent leur ciblage est facilité si les particules possèdent de l'acide folique au niveau de leur couverture¹⁸.

La combinaison entre ciblage actif et ciblage passif peut être une solution si les récepteurs visés ne sont pas spécifiques à un type cellulaire. C'est le cas de nos travaux où les particules sont recouvertes de hyaluronate (HA) amphiphile qui peut être reconnu par les récepteurs CD44 présents en surface des chondrocytes (ciblage actif) et dont l'administration se fait par injection intra-articulaire (ciblage passif) pour favoriser la présence de ces particules à proximité des cellules.

IV. Les avantages de la vectorisation

A. La protection de la molécule encapsulée

Beaucoup de molécules biologiquement actives sont instables physico-chimiquement ou biochimiquement lorsqu'elles se trouvent dans le corps humain. Leur encapsulation dans des vecteurs permet de les protéger contre l'inactivation chimique, enzymatique ou immunologique. De cette manière on peut améliorer les propriétés pharmacocinétiques de ces molécules, ce qui est utile si les principes actifs choisis sont à faible durée de vie *in vivo*.

B. Une réduction des effets secondaires et/ou toxiques des principes actifs

Pour certaines maladies, notamment le cancer, les molécules employées comme traitement peuvent s'avérer toxiques alors qu'il est nécessaire d'en injecter des quantités importantes et/ou de répéter les injections pour obtenir un effet thérapeutique. L'encapsulation de ces principes actifs dans des vecteurs permet une libération prolongée des PAs et donc une diminution du nombre d'injections.

C. L'amélioration des profils pharmacocinétiques

Il s'agit de moduler les fluctuations de la concentration en principes actifs dans le corps humain afin qu'elle ne soit ni trop faible ni trop forte. En effet, pour qu'il puisse exercer son rôle, un PA doit être présent en quantité suffisante (au-delà du seuil d'efficacité minimum) sans toutefois dépasser son niveau toxique. Les injections de PAs dans l'organisme conduisent à une présence en quantité importante de celui-ci quelques instants après son administration puis à une diminution rapide de sa concentration, ce qui conduit à répéter les injections. L'emploi de particules permet de délivrer les PAs de manière prolongée, par diffusion ou par dégradation de la matrice, et donc de niveler sa concentration au fil du temps. Cette modification du profil pharmacocinétique est représentée par la figure I-3.

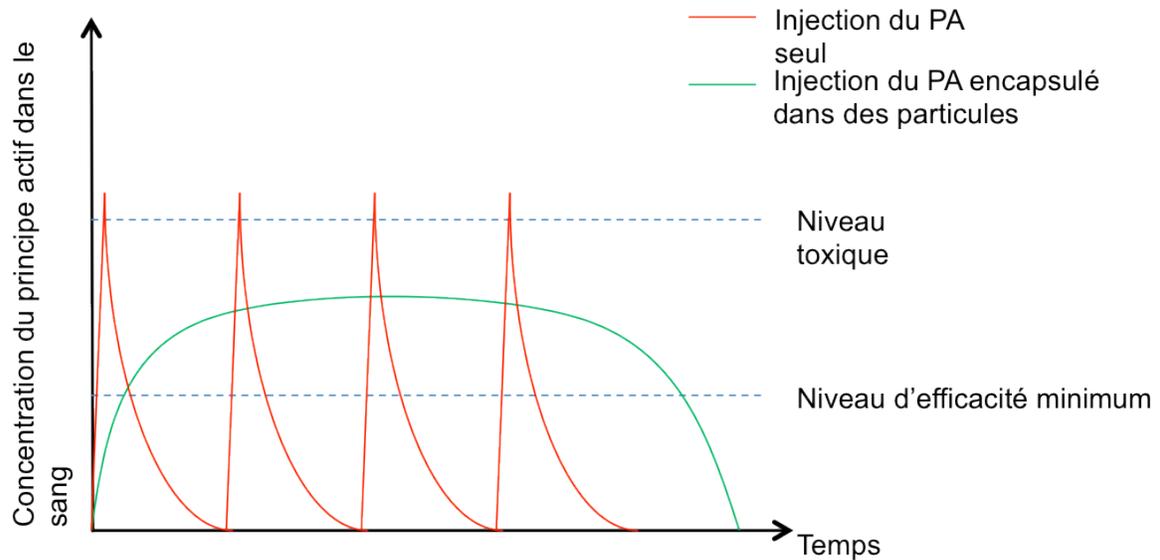


Figure I-3 : Diagramme représentant l'évolution de la concentration en principes actifs dans la circulation sanguine après injection selon qu'ils soient encapsulés dans des particules (en vert) ou non (en rouge).

D. La sélectivité de la libération

Si les caractéristiques du vecteur employé sont suffisamment connues, on peut limiter la biodistribution des PAs au sein de l'organisme et favoriser l'accumulation des vecteurs à proximité de la zone à traiter en recouvrant leur surface par des molécules ciblantes. Cette sélectivité permet de diminuer considérablement les effets secondaires engendrés par la présence de PAs au niveau des organes sains.

V. Les différents types de vecteurs particuliers

Les travaux effectués depuis plus de 50 ans afin d'améliorer la vectorisation de PAs ont permis de développer différents types de particules pouvant remplir des fonctions diverses. Elles peuvent contenir des molécules « traçantes » qui, après accumulation dans un organe ou un type cellulaire spécifique, vont faciliter l'établissement d'un diagnostic (visualisation de tumeur en IRM) ou bien vectoriser des molécules d'intérêt thérapeutique permettant de traiter une pathologie. Ces particules sont composées de molécules organiques ou inorganiques. Elles doivent être biocompatibles et non toxiques, idéalement biodégradables ou, à défaut, être éliminées par les voies naturelles.

Nous décrivons par la suite les principales particules organiques et inorganiques pouvant être employées au niveau médical, qu'elles soient à vocation thérapeutique ou de diagnostic.

A. Les particules organiques

Ce sont les vecteurs les plus étudiés pour la délivrance de molécules d'intérêt. Ils sont le plus souvent constitués de polymères d'origine naturelle ou synthétique et sont biocompatibles. Ils permettent d'encapsuler différentes molécules qu'elles soient hydrophiles ou hydrophobes.

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

1) Les liposomes

Les premiers travaux sur les liposomes ont été effectués par Bangham *et al.* en 1965 et sont considérés comme la base de la vectorisation. Les liposomes sont constitués principalement par des phospholipides qui s'associent en milieu aqueux pour former des vésicules composées d'une ou plusieurs bicouches lipidiques renfermant une phase aqueuse (Figure I-4).

Les phospholipides sont des molécules amphiphiles. Lorsqu'ils se trouvent en milieu aqueux ils vont donc s'organiser de manière à minimiser les interactions entre leur partie hydrophobe et l'eau ce qui conduit à la création de la bicouche dont l'épaisseur est environ égale à deux fois la longueur du plus grand lipide impliqué.

La taille des liposomes varie en fonction des molécules employées ainsi que des conditions de formulation, de quelques dizaines de nanomètres à plusieurs micromètres de diamètre.

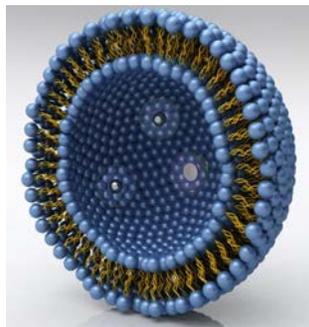


Figure I-4 : Représentation d'un liposome d'après

<http://www.lyosphericnutrients.fr/ReasearchAndDevelopment.aspx>.

a) Synthèse des liposomes

La principale méthode de préparation des liposomes consiste en l'hydratation de films lipidiques. Il s'agit en général de dissoudre les phospholipides dans un solvant organique qui va ensuite être évaporé de manière à créer un film, puis d'hydrater ce dernier. Ceci conduit à la formation de liposomes multilamellaires (MLV : Multi Lamellar Vesicle) de tailles diverses qui subissent ensuite un traitement physique afin d'obtenir des vésicules constituées d'une seule bicouche lipidique et de taille homogène¹⁹.

On peut obtenir respectivement des liposomes de petite taille (SUV : Small Unilamellar Vesicle) ou de grande taille (LUV : Large Unilamellar Vesicle) selon que l'on utilise des ultrasons ou des cycles de congélation/décongélation pour déstabiliser les MLV.

b) Utilisation

Au niveau biomédical, les liposomes sont utilisés comme vecteurs de principes actifs²⁰. On peut y encapsuler des molécules hydrophiles (dans le cœur de la vésicule), hydrophobes (au niveau de la bicouche) voire même des composés amphiphiles qui vont être situés à l'interface bicouche/phase aqueuse interne. Après injection dans le corps humain, les liposomes vont pouvoir libérer les principes actifs qu'ils renferment à proximité des cellules ou à l'intérieur de celles-ci après endocytose ou fusion avec la membrane cellulaire.

Plusieurs médicaments utilisent des liposomes afin de délivrer leurs principes actifs. C'est le cas notamment du DaunoXome[®] (NeXstar Pharmaceuticals, Inc.) qui encapsule de la daunorubicine. On peut également citer l'AmBisome[®] (Gilead Sciences / Fujisawa Healthcare) qui contient de l'amphotéricine B dans la bicouche lipidique du liposome.

L'industrie cosmétique utilise aussi les liposomes. Ils permettent de délivrer en application locale des molécules généralement solubles dans des phases huileuses ou alcooliques limitant ainsi les problèmes d'irritation.

c) Inconvénients

Bien qu'ils soient faciles à préparer, les liposomes présentent quelques inconvénients. Une fois dans l'organisme, ils sont facilement phagocytés par les macrophages et accumulés dans le foie ou la rate. Pour limiter ces phénomènes on peut rendre «furtifs» les liposomes en greffant à leur surface des PEGs

ou d'autres molécules²¹. De la même manière, il est possible de modifier la surface afin de cibler préférentiellement certaines cellules.

Les inconvénients majeurs des liposomes demeurent la faible quantité de principes actifs encapsulables, ainsi que leur instabilité physique²².

2) Les particules polymères

Ces particules désignent des systèmes de type cœur-couronne (core/shell) comportant une matrice solide de polymère recouverte d'une couronne hydrophile adsorbée ou greffée pour assurer leur stabilisation *in vivo*. Le PA peut être encapsulé dans le cœur, adsorbé ou conjugué à la surface des particules. Elles présentent une meilleure stabilité *in vivo* et lors de leur stockage que les liposomes. Leur taille varie de quelques dizaines de nanomètres à quelques micromètres de diamètre.

Les nanoparticules à base de polymères synthétiques ont été pour la première fois décrites par Couvreur *et al.* en 1979 avec la préparation de nanosphères de poly(cyanoacrylates d'alkyles) (PACA).

a) Les méthodes de préparation des particules polymères

De nombreuses techniques de formulation des particules polymères ont été développées. On peut les classer en deux groupes :

- Les particules obtenues par polymérisation de monomères en milieu dispersé.
- Les particules préparées à partir de polymères préformés.

La méthode de préparation des particules est déterminée par l'opérateur en fonction des objectifs d'utilisation, des principes actifs à encapsuler, du polymère cœur utilisé,...

Nous détaillerons dans cette section les principales méthodes de formulation des particules polymères ainsi que certaines de leurs applications pour l'encapsulation de principes actifs hydrophobes et hydrophiles le cas échéant.

(a) *La synthèse de particules par polymérisation*

- Polycondensation interfaciale

Elle consiste à faire réagir deux monomères, l'un hydrosoluble et l'autre liposoluble, à l'interface entre une phase aqueuse et une phase organique. Pour encapsuler un principe actif lipophile, celui-ci est solubilisé avec le monomère hydrophobe dans un solvant organique et l'on réalise l'émulsion de cette phase huileuse dans une phase aqueuse contenant du tensio-actif puis on ajoute le second monomère (qui est hydrophile) pour amorcer la réaction de polymérisation. Cette technique permet de préparer des nanocapsules²³.

- Polymérisation en dispersion

Cette technique joue sur le fait qu'un monomère soluble dans une phase aqueuse va polymériser et former des oligomères qui vont devenir insolubles dans cette phase. L'ajout de surfactant dans le milieu permet de stabiliser et de contrôler la taille des particules formées. L'amorçage de la polymérisation se fait par irradiation ou par ajout d'amorceurs chimiques ce qui risque de dégrader le principe actif.

- Polymérisation en émulsion

La technique de polymérisation en miniémulsion a été décrite pour la première fois par Couvreur *et al.* en 1979 pour préparer des nanoparticules de PACA à visées biomédicales²⁴. Dans ce cas, le monomère est insoluble (ou partiellement soluble) en phase aqueuse. On va former une émulsion des monomères dans la phase aqueuse grâce à des tensio-actifs (polysaccharides²⁵, PEG²⁶,...). L'amorçage de la polymérisation se fait en général par les ions hydroxydes du milieu. Pour l'élaboration de particules de PACA, le pH est le paramètre clé de cette technique, il détermine la taille finale des particules, en revanche ce n'est pas le cas pour des particules à cœur de PLA ou PLGA.

Ces techniques de polymérisation présentent de nombreux inconvénients en vue d'une utilisation biomédicale des particules obtenues. Il est en effet difficile de les purifier et donc chaque lot risque de contenir des traces de solvant organique, de surfactants, de monomères n'ayant pas réagi ou d'oligomères. Ces impuretés risquent de dégrader le principe actif encapsulé ou de provoquer des effets indésirables au contact des cellules.

C'est pour cela que la majorité des particules utilisées dans le domaine de la santé sont préparées avec des polymères déjà formés.

(b) *Formulation de particules à partir de polymères préformés*

Ces techniques présentent plusieurs avantages par rapport aux procédés de polymérisation :

- Les polymères utilisés sont bien caractérisés, possèdent des propriétés physico-chimiques définies et l'on peut travailler avec des échantillons de faible polymolécularité.
- On s'affranchit de l'étape d'élimination des réactifs (monomères, amorceurs, catalyseurs).
- Il n'y a généralement pas de réaction chimique possible avec le principe actif pendant la formulation des particules.

Voici un aperçu des principales techniques de formulation :

(i) *L'émulsion/évaporation de solvant organique*

Cette technique a été décrite pour la première fois en 1981 afin de préparer des particules de PLA²⁷. Un polymère hydrophobe est solubilisé avec le principe actif dans un solvant organique non miscible à l'eau (dichlorométhane, ...). Le mélange est émulsifié par addition de cette solution à une phase aqueuse contenant un tensio-actif (PVA, SDS, ...) puis agitation du système. La taille des gouttelettes, et donc des particules finales, est inversement proportionnelle à la quantité d'énergie fournie au moment de l'agitation et dépend de la quantité de tensio-actif utilisée.

Le solvant organique est ensuite éliminé par évaporation en chauffant le système ou par pression réduite sous agitation ce qui entraîne la précipitation du polymère et conduit à la formation des particules stabilisées par une couche surfacique de tensio-actifs adsorbés.

Une alternative consiste à rajouter un grand volume d'eau pour faire diffuser le solvant organique. On parle alors d'émulsion/extraction de solvant.

(ii) *Nanoprécipitation*

Pour cette technique décrite par Fessi *et al.* en 1986²⁸, le solvant organique utilisé est miscible à l'eau en toute proportion. L'acétone et l'éthanol sont les solvants les plus employés. La solution organique contenant le principe actif et le polymère est injectée au goutte à goutte dans une solution aqueuse contenant ou non un tensio-actif. Le solvant organique va diffuser instantanément vers la phase dispersante en provoquant la précipitation des particules. On peut par cette technique former des capsules si une huile dans laquelle le polymère est insoluble est ajoutée à la phase organique. Après évaporation du solvant, le polymère va se placer à l'interface entre l'huile et la phase aqueuse.

Cette technique permet d'encapsuler avec de bons rendements les principes actifs lipophiles. Les principes actifs hydrophiles vont quant à eux diffuser dans la phase aqueuse et les rendements sont très faibles. De plus, il est difficile d'obtenir des populations de particules monodisperses.

(iii) *Coacervation*

La coacervation permet de préparer des microparticules en jouant sur la solubilité d'un polymère en phase aqueuse ou organique. La solubilité du polymère est diminuée par ajout de quantité importante d'un agent de coacervation (un autre polymère), un électrolyte, un non solvant ou en modifiant la température. Le polymère se désolvate et coalesce ce qui conduit à la formation de gouttelettes. Cette variation va provoquer la formation de deux phases : le coacervat qui est riche en polymère et une phase pauvre en polymère.

Cette technique nécessite la réalisation d'un diagramme ternaire (solvant, polymère et agent de coacervation) afin d'optimiser les conditions d'encapsulation.

(iv) *Les fluides supercritiques (FSC)*

La formulation de particules grâce aux fluides supercritiques semble être une alternative intéressante pour l'industrie pharmaceutique. En effet, les autres méthodes utilisent presque systématiquement des solvants organiques pour solubiliser la matrice de polymère qui constitue le cœur des particules. Ces solvants ne sont pas toujours entièrement éliminés à la fin du procédé de formulation et les traces contenues dans les particules peuvent entraîner des effets indésirables plus ou moins marqués lors de leur utilisation (toxicité vis-à-vis des cellules, dégradation du PA, ...)⁸.

Un fluide est à l'état supercritique lorsque sa température et sa pression sont supérieures à sa température et sa pression critiques (T_c et P_c). Dans ce cas, ses propriétés sont intermédiaires entre un gaz et un liquide. Le fluide supercritique le plus utilisé est le $scCO_2$ (T_c : 31,1°C, P_c : 73,8 bars), particulièrement dans l'agro-industrie (décaféination du café). Il est peu cher à produire, non toxique et possède d'excellentes propriétés de solvant²⁹.

Il existe deux méthodes de formulation de particules grâce aux fluides supercritiques selon qu'ils soient utilisés comme solvants ou non solvants.

(a) SAS (Supercritical Anti Solvent)

Le polymère et le principe actif sont dissous dans un solvant et cette solution est atomisée dans un fluide en phase supercritique qui joue alors le rôle de non solvant. Le solvant va être extrait des gouttelettes rapidement et les particules formées vont précipiter³⁰.

(b) RESS (Rapid Expansion of Supercritical Solution)

Ici le fluide supercritique est utilisé comme solvant du polymère et du principe actif. La solution supercritique est nébulisée dans un milieu où la pression est inférieure à la P_c . L'expansion rapide du fluide entraîne la précipitation du polymère et la formation de particules.

Cette technique nécessite de travailler avec un couple polymère/PA solubles dans le FSC.

(v) *Salting out*

A la manière de la nanoprécipitation, le procédé de salting out nécessite l'utilisation d'un solvant organique miscible à l'eau tel que l'acétone. Cette phase organique contenant le principe actif et le polymère est émulsionnée par agitation dans une solution aqueuse saturée en électrolyte ($MgCl_2$) et contenant un stabilisant. Le sel empêche la diffusion du solvant organique et donc ce système biphasique va former une émulsion stable ce qui permet de contrôler la taille des gouttelettes. La précipitation des particules se fait par ajout d'un grand volume d'eau qui dilue la concentration en sel et permet la diffusion du solvant organique. Des étapes de lavage sont nécessaires si les sels utilisés ne sont pas compatibles avec l'utilisation voulue des particules.

b) Les principaux constituants des particules polymères

(a) *Matériaux cœur*

Les propriétés physico-chimiques du polymère qui constitue le cœur des particules vont influencer la quantité de PAs encapsulable ainsi que sa cinétique de libération. Les molécules liposolubles seront facilement encapsulées dans des matrices de polymère hydrophobe formant des nanoparticules. En revanche les molécules hydrosolubles vont plutôt se positionner à l'interface cœur/couronne ou peuvent être encapsulées dans la matrice par exemple via une préparation par double émulsion/évaporation de solvant mais dans ce cas la taille des particules va considérablement augmenter.

Les polymères employés sont principalement hydrophobes ou nécessitent une hydrophobisation préalable comme pour les poly(acides aminés). Ils doivent être biocompatibles, non toxiques et pouvoir être dégradés ou excrétés par l'organisme.

(i) *Les poly(cyanoacrylates d'alkyle) : PACAs*

Les PACAs (Figure I-5) sont des polymères principalement connus pour leurs propriétés adhésives exceptionnelles (SuperGlue®). Ils sont notamment utilisés comme bioadhésifs pour coller des pièces métalliques aux os (rotule artificielle) ou en chirurgie pour refermer une plaie sans sutures.

Les PACAs sont des polymères hydrophobes biocompatibles et non toxiques, obtenus par polymérisation de cyanoacrylates d'alkyles.

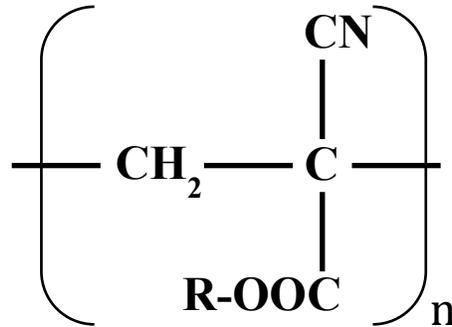


Figure I-5 : Unité de répétition du PACA.

Ce sont les premiers polymères à avoir été décrits pour l'utilisation comme matrice de particules à visée thérapeutique. Dès 1979, Couvreur *et al.* ont proposé un moyen de préparer des nanosphères de PACA par polymérisation en émulsion^{24,31}. Depuis, de nombreux articles ont concerné les PACAs et notamment leur emploi pour la vectorisation de molécules anticancéreuses³².

Les procédés de dégradation des PACAs dans l'organisme ne sont pas totalement connus. Il semble néanmoins que dans le sang des estérases clivent ces molécules et que les produits possèdent une masse molaire suffisamment faible afin de les rendre hydrosolubles et de faciliter leur élimination par les reins. Les monomères sont toxiques, toutefois il semble que la dégradation du polymère ne produise pas de taux significatifs de monomères³³.

(ii) *Les polyesters*

Les polyesters employés ici sont biocompatibles, biodégradables (par dégradation de la liaison ester) et peuvent être d'origine synthétique ou naturelle.

(a) *Les poly(α -hydroxy esters)*

Ce sont sans conteste les polymères les plus étudiés pour la préparation de particules et leur utilisation biomédicale. La poly(ϵ -caprolactone) (PCL), le poly(lactique acide) (PLA), le poly(acide glycolique)

(PGA) et leur copolymère poly(acide lactique-*co*-glycolique) (PLGA) sont des composés synthétiques et hydrophobes biocompatibles et biodégradables dans l'organisme (Figure I-6). Ils sont approuvés par la FDA pour différentes applications³⁴.

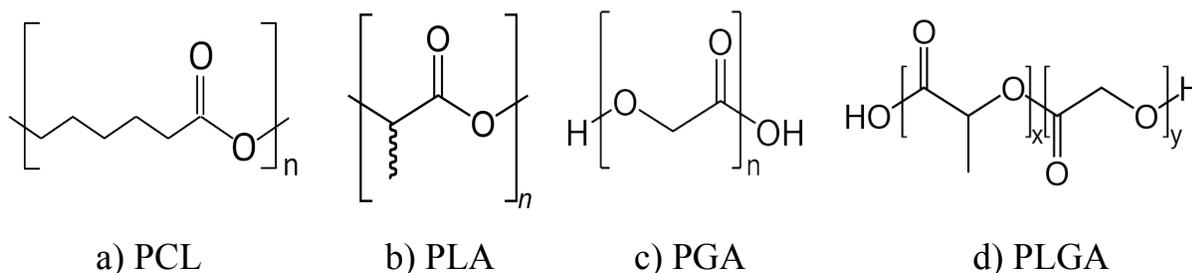


Figure I-6 : Représentation des unités de répétition des principaux poly(α -hydroxy esters).

De nombreux PAs hydrophobes ont été encapsulés dans des nanoparticules de PCL, PLA, PGA ou PLGA tels que des protéines³⁵ ou des anticancéreux^{36,37}. En revanche, en raison de leur nature anionique, on observe de faibles rendements d'encapsulation pour les ADNs et ARNs.

Le PLGA est le polymère qui se dégrade le plus vite en raison de sa faible cristallinité contrairement à la PCL. Une fois dans l'organisme, les particules vont se dégrader par clivage des liaisons ester et, au final, on obtient les monomères tels que l'acide lactique qui sont naturellement présents dans le corps humain³⁸. La dégradation est autocatalysée et favorisée par l'existence de microdomaines acides au sein de la matrice³⁹. Cette acidité locale peut poser problème pour les PAs encapsulés.

(b) Les poly(hydroxy alkanotes)

Ce sont des polymères naturels, synthétisés par des bactéries à partir de sucres ou de lipides. Le plus connu est le PHB ou poly(hydroxybutyrate) qui est hautement cristallin (entre 60 et 90 %) et donc se dégrade très lentement⁴⁰. De fait, on préférera l'utiliser sous forme de copolymères tel que le PHBV : poly(hydroxybutyrate-*co*-valérate)⁴¹ (Figure I-7).

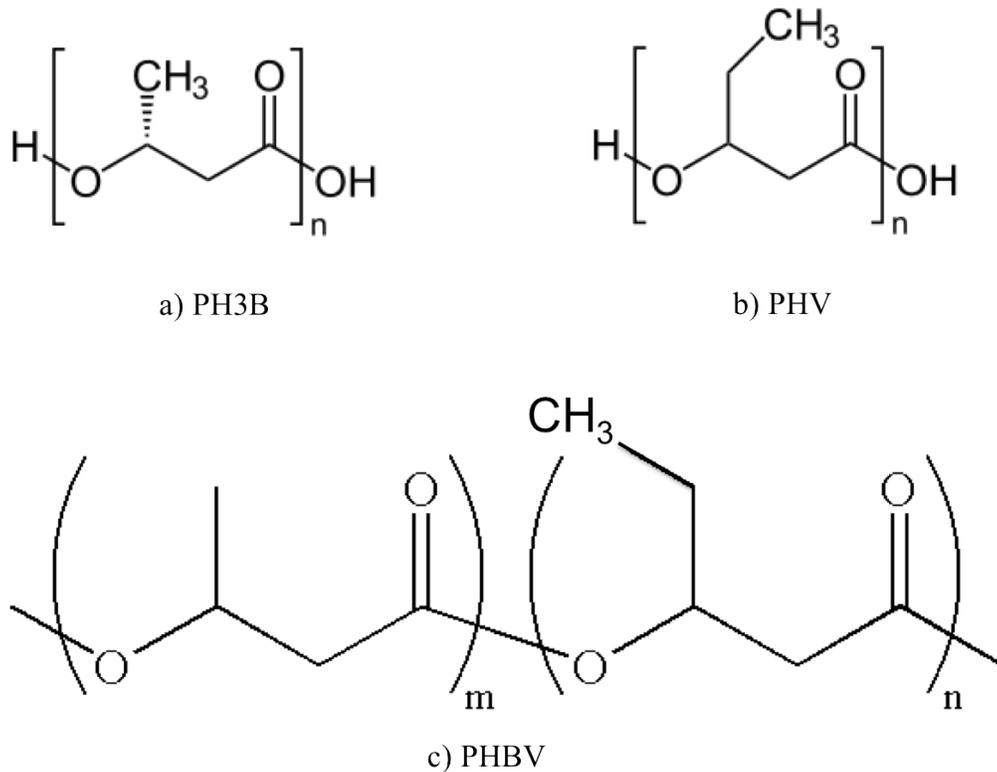


Figure I-7 : Unités de répétition constitutives du a) poly(hydroxybutyrate) : PH3B, du b) poly(hydroxyvalérate) : PHV et du c) poly(hydroxybutyrate-*co*-valérate) : PHBV.

(c) Les poly(β -amino esters)

Les PbAEs (Figure I-8) sont des polymères hydrophobes qui possèdent des propriétés physico-chimiques intéressantes car ils sont sensibles au pH. Ainsi, à pH acide ils présentent des motifs cationiques pouvant s'associer avec l'ADN permettant de mieux l'encapsuler et le protéger que les matrices de PLGA⁴¹. Des particules cœur/couronne de PbAE/PEG pH sensibles ont été développées et se déstructurent à un pH < 6,5 qui correspond aux conditions d'acidité que l'on retrouve à proximité des tumeurs. Ils constituent donc un matériau de choix pour la formulation de particules pouvant vectoriser des anticancéreux⁴².

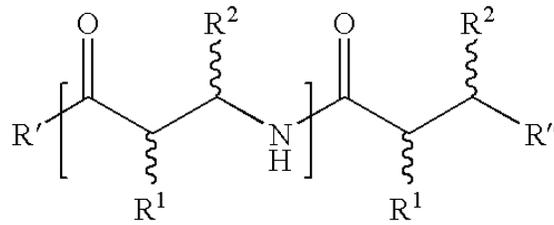
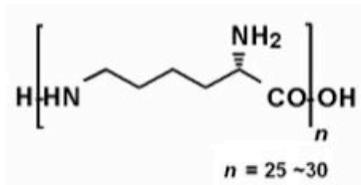


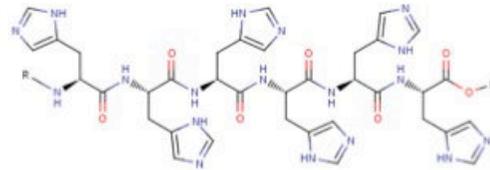
Figure I-8 : Représentation de l'unité de répétition d'un PAAE.

(iii) *Les poly(acides aminés) : PAAs*

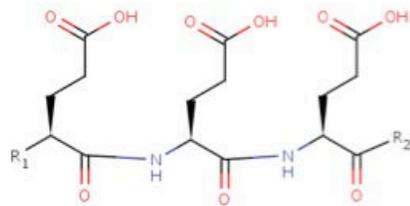
Les principaux PAAs sont la poly(lysine), la poly(histidine) ou le poly(glutamate) (Figure I-9). Ce sont des polymères naturels et hydrophiles qui sont biocompatibles et dégradables par voie enzymatique.



a) poly(lysine)



b) poly(histidine)



c) polyglutamate

Figure I-9 : Unité de répétition de la poly(lysine) (a), de la poly(histidine) (b) et du poly(glutamate) (c).

Ils sont moins utilisés que les autres polymères pour la formulation de particules car ils doivent préalablement être modifiés ou peuvent se complexer avec des molécules anioniques tel que l'ADN⁴³.

(b) Les principaux polymères de surface

Le matériau cœur des nanoparticules polymères est le plus souvent hydrophobe ; il faut donc les recouvrir d'une couche hydrophile pour éviter leur agrégation dans les solvants aqueux. Le recouvrement de la surface peut se faire par adsorption ou greffage à l'aide de molécules amphiphiles.

Voici un aperçu des principales molécules utilisées comme constituants de la couronne des particules polymères :

(i) Le poly(éthylène glycol) (PEG)

Les poly(éthylène glycols) sont les polymères les plus étudiés pour le recouvrement de particules. Ce sont des polyéthers non ioniques et cristallins qui sont solubles dans l'eau indépendamment de leur masse molaire. Ils sont de plus biocompatibles et faiblement immunogènes, c'est pourquoi ils sont approuvés par la FDA notamment pour des applications pharmaceutiques, cosmétiques et même alimentaires⁴⁴. En revanche ils ne sont pas biodégradables. Pour ces applications on préférera employer des PEGs de masse molaire inférieure à 20 000 g/mol car au-delà ils deviennent difficiles à éliminer par l'organisme.

Les PEGs sont obtenus principalement par polymérisation par ouverture de cycle de l'oxyde d'éthylène (figure I-10).

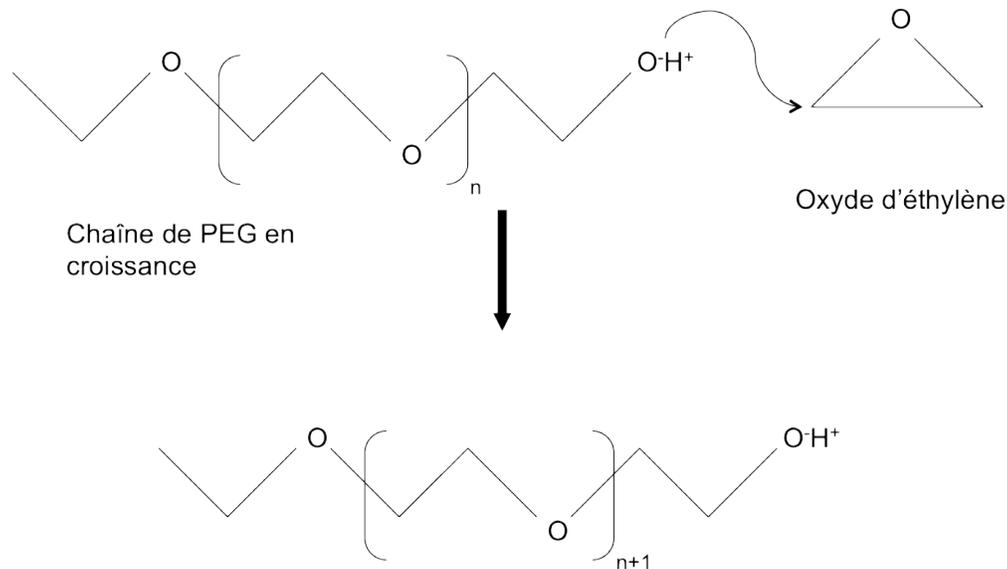


Figure I-10 : Schéma de la synthèse des PEGs par ouverture de cycle de l'oxyde d'éthylène.

Les chaînes de PEG sont inertes chimiquement mais on peut coupler ce polymère à d'autres molécules via le groupement hydroxyle terminal ce qui permet d'obtenir des molécules amphiphiles qui peuvent s'adsorber à la surface de matrices hydrophobes.

Parmi ces dérivés amphiphiles on peut citer la famille des poloxamers et poloxamines qui sont des copolymères de PEG et de poly(propylène glycol) (PPG) dont on peut faire varier le rapport hydrophile/hydrophobe selon les quantités de chaque polymère. Par la suite, des copolymères diblocs de type PEG-*b*-PLA (ou PCL et PLGA) ont été synthétisés pour améliorer l'adsorption à la surface de matrices polymères hydrophobes⁴⁵.

Plusieurs systèmes nanoparticulaires à base de PEG sont présents sur le marché des médicaments pour traiter l'hépatite C : le Pegasys[®] (Hoffman La Roche) et le Peg Intron[®] (Schering Plough) qui permettent de vectoriser l'interféron $\alpha 2a$ et $\alpha 2b$ respectivement^{46,47}. Dans ce cas le principe actif est lié chimiquement aux chaînes de PEG.

(ii) *Les poly(vinyles)*

(a) Le poly(alcool vinylique) : PVA

Le polymère est obtenu par hydrolyse d'une partie des fonctions acétate du poly(acétate de vinyle) qui lui-même résulte de la polymérisation de l'acétate de vinyle. Le PVA (Figure I-11) consiste donc en un copolymère statistique d'acétates et d'alcools vinylique et le degré d'hydrolyse indique la proportion de

fonctions alcool dans le polymère. Son hydrophilie dépend du degré d'hydrolyse et de sa masse molaire. Les unités acétate étant hydrophobes et les unités alcool étant hydrophiles, le PVA présente un comportement amphiphile, c'est pourquoi il intervient fréquemment dans la stabilisation de vecteurs colloïdaux. Lors de la formulation de particules type cœur/couronne, le PVA peut être l'unique émulsifiant⁴⁸ ou servir de stabilisant additionnel⁴⁹.

(b) La poly(N-vinyl-pyrrolidone): PVP

Les PVPs (Figure I-11) sont des polymères hydrophiles neutres et biocompatibles, solubles dans l'eau et les solvants polaires⁵⁰. Ils sont utilisés pour la cryoprotection des cellules⁵¹ ou la lyoprotection des protéines⁵².

Les PVPs sont aussi employés pour recouvrir les matrices hydrophobes de nanoparticules : par exemple Gaucher *et al.* ont développé des copolymères amphiphiles PVP-*b*-PLA pour stabiliser des matrices de PLA. Les NPs alors obtenues sont cependant éliminées assez rapidement dans l'organisme par opsonisation. Ceci semble dû au fait que les PVPs sont rigides et donc recouvrent moins bien la surface des particules en comparaison avec le PEG⁵³.

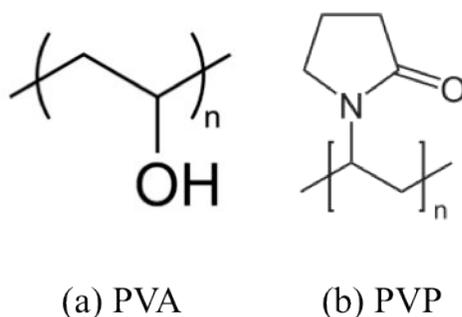


Figure I-11 : Unité de répétition du PVA (a) et de la PVP (b).

(iii) Les polysaccharides

Les polysaccharides sont des polymères naturels dont l'unité de répétition est composée de sous unités saccharidiques. Ils sont hydrophiles, biocompatibles et dégradables par les cellules. Leur utilisation comme couronne des particules pour la vectorisation de PAs est largement étudiée depuis quelques années. Ils sont une alternative intéressante aux polymères synthétiques car mieux tolérés par le corps humain. Néanmoins leur inconvénient majeur est la difficulté de contrôler de manière suffisamment fine

leur masse molaire. On est donc amené à travailler avec des lots polydisperses et hétérogènes selon leur mode de préparation ce qui limite la reproductibilité d'une synthèse à l'autre.

Parmi les polysaccharides les plus étudiés, nous décrivons le chitosane, l'alginate et le dextrane. Le hyaluronane et ses dérivés seront l'objet du chapitre II de cette thèse. La structure chimique de ces molécules est représentée dans la figure I-12.

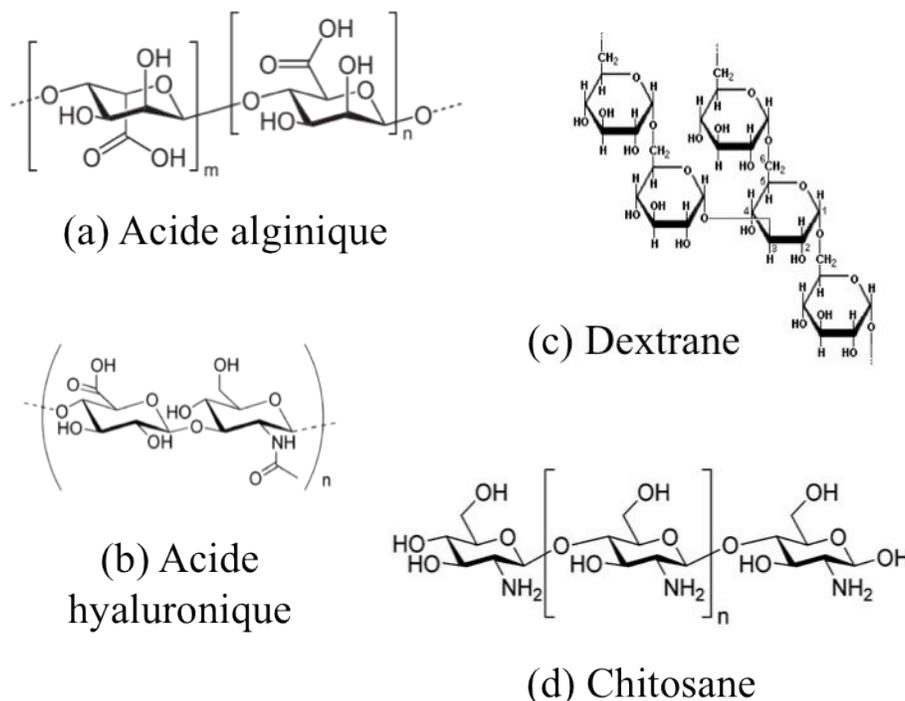


Figure I-12 : Structure chimique des principaux polysaccharides employés pour la vectorisation.

(a) Le chitosane

Le chitosane est un dérivé de la chitine présente essentiellement dans la carapace des crustacés, c'est donc une molécule abondante (la plus abondante après la cellulose) ce qui la rend peu coûteuse. La chitine est déacétylée pour obtenir le chitosane, polysaccharide linéaire composé d'un enchainement d'unités glucosamine et de N-acétyl glucosamine.

Le degré d'acétylation (DA) du chitosane va déterminer ses propriétés. Il est soluble à pH acide (entre 2 et 6) lorsque son DA est inférieur à 25 % ; aux alentours de 50 % il est soluble quel que soit le pH ; au-delà de 60 %, à cause de l'établissement de liaisons hydrogène, il est insoluble pour des $pH > 6^{54}$. La solubilité est aussi dépendante de la masse molaire du chitosane, elle augmente lorsque la masse molaire du polymère diminue.

Le chitosane est un polymère cationique ce qui lui permet d'interagir avec la membrane des muqueuses par interaction ionique^{55,56}. Il est considéré comme biocompatible et non toxique.

Il permet de recouvrir des particules type cœur/écorce pour prolonger leur temps de résidence dans l'organisme. Pour cela il peut être utilisé tel quel⁵⁷ ou avoir été préalablement hydrophobisé⁵⁸. Du chitosane « natif » a par exemple été utilisé pour stabiliser des NPs de PLGA par nanopréciipitation ; celles ci renfermant du paclitaxel en vue d'une administration orale⁵⁶.

Il peut aussi être utilisé seul comme vecteur non viral pour la délivrance de plasmides⁵⁹ car le chitosane peut faire des complexes avec l'ADN et l'ARN via des interactions électrostatiques. La préparation de NPs de chitosane par gélation ionotropique est une méthode décrite par Calvo *et al.* en 1997⁶⁰, qui consiste en l'interaction électrostatique entre les groupements amine du chitosane et un polyanion tel que le tripolyphosphate⁶¹.

Le chitosane est donc un polysaccharide très utile pour la délivrance de principes actifs dans l'organisme.

(b) L'alginate

L'alginate est extrait d'algues ; c'est un polysaccharide anionique linéaire constitué de dérivés du mannose : l'acide α -L-gulonique et l'acide β -D-mannuronique.

Les alginates peuvent former des liaisons ioniques via leurs groupements carboxylate, notamment en présence de cations bivalents tel que Ca^{2+} ou après modification chimique. Ils adoptent des changements de conformation ce qui peu conduire à la formation de gels. On peut ainsi l'utiliser dans l'organisme comme matériau de comblement et/ou y piéger des cellules⁶², enzymes ou diverses molécules hydrophiles⁶³ qui seront libérés par diffusion ou lors de l'érosion du gel.

Ils interviennent aussi dans la formulation de particules cœur/couronne comme stabilisant de la matrice hydrophobe⁶⁴.

(c) Le dextrane

C'est un polysaccharide neutre et hydrophile obtenu par fermentation de sucrose catalysée par une enzyme : la dextranase-sucrase. Il est composé d'un enchainement α -1,6 d'unité glucopyranose et possédant des chaines latérales pouvant être en α -1,2, α -1,3 ou α -1,4. La bactérie *Leuconostoc*

Mesenteroïdes (souche *Lm* NRRL-B 512F) est le microorganisme le plus employé pour la production commerciale du dextrane, notamment pour des applications dans les secteurs pharmaceutique et biochimique⁶⁵.

Le dextrane est biocompatible et biodégradable. Une fois dans l'organisme il va être réduit en glucose par la dextranase (α -1-glucosidase), enzyme présente dans les organes du SPM (système des phagocytes mononucléés). L'enzyme dégrade le dextrane indépendamment de sa masse molaire. Le glucose ainsi formé est ensuite converti en CO₂ et H₂O.

Le dextrane natif peut être modifié grâce à la présence de nombreux groupements hydroxyle sur la molécule, trois par unité de répétition, afin de lui conférer des propriétés physico-chimiques différentes.

L'emploi du dextrane au niveau biomédical nécessite que celui-ci possède une masse molaire supérieure à 7 000 g/mol afin d'éviter son élimination par le système rénal^{66,67}. Ces caractéristiques (biocompatibilité et biodégradabilité) en font un polymère de choix pour une utilisation biomédicale ; il est par exemple utilisé comme substitut du plasma sanguin^{67,68} car il est hémocompatible et possède des propriétés anti-thrombiques. En France, ces substituts sont commercialisés sous les noms de Rhéomacrodex® et Macrodex®.

La vectorisation de principes actifs grâce au dextrane est largement documentée. Lié de façon covalente aux molécules d'intérêt, il peut par exemple servir de prodrogue et ainsi prolonger la durée de vie des principes actifs dans les fluides corporels⁶⁹. Le LCPM s'est spécialisé dans la modification du dextrane pour lui conférer des propriétés tensio-actives⁷⁰. Ainsi des oligomères de PLA^{71,72} ou encore des chaînes alkyle⁷³ ont pu être greffées sur ses fonctions hydroxyle ; ces dérivés amphiphiles ont ensuite été utilisés comme stabilisants externes lors de la formulation de particules polymères à cœur de PLA⁷¹.

Les nanoparticules polymères sont des vecteurs efficaces, particulièrement pour la délivrance de molécules hydrophobes. La grande variété de polymères utilisables ainsi que les différentes techniques de préparation permettent leur utilisation pour de nombreuses applications (Tableau I-1).

Toutefois leur stabilité est limitée : lors des périodes de stockage on observe une tendance à l'agrégation. L'encapsulation de molécules hydrophiles reste délicate et conduit à de faibles rendements ou à des tailles de particules importantes et leur production à grande échelle est difficile.

cœur	couronne	molécule encapsulée	objectif	réfs
PLA	PVA	TNF α	gastrointestinal	74
PLA/PLGA	PEG (PEG- <i>b</i> -PLA/PLGA)	betaméthasone	maladies inflammatoires immunologiques	75
PLGA	PEG (PEG- <i>b</i> -PLGA)	protéine/peptides/facteurs de croissance	pulmonaire	76
PLGA	PEG	rhodamine B isothiocyanate	biodistribution après IV	77
PLGA/SPIO	PVA	Dexaméthasone	intra-articulaire	78
PLGA	PVA	naproxen	AINS pour traiter l'arthrite	48
PLGA	chitosane	DNA/RNA	cancer du poumon	79
PCL	chitosane	virus recombinant (H1N1)	grippe	80
PACA	PEG	α - β -peptide	maladie d'Alzheimer	81
PACA	dextrane	-	-	82

Tableau I-1 : Exemples d'utilisation des nanoparticules polymériques pour la vectorisation de principes actifs.

c) Encapsulation de molécules hydrosolubles

Plusieurs techniques permettent d'obtenir des particules polymères contenant des molécules hydrosolubles. Il s'agit principalement de l'émulsion/évaporation de solvant, la coacervation ou encore la polycondensation interfaciale.

La technique la plus documentée est sans conteste la double émulsion/évaporation de solvant. Dans ce cas une émulsion primaire eau/huile est préparée et les molécules à encapsuler sont solubilisées dans la phase aqueuse interne. Il est généralement nécessaire d'utiliser un tensio-actif pour stabiliser cette émulsion primaire dite émulsion interne. L'émulsion secondaire (finale) est ensuite obtenue par suspension de l'émulsion interne dans une phase aqueuse externe contenant un tensio-actif. Le solvant organique est enfin évaporé pour conduire à la formation de particules polymères. Ainsi de

nombreuses molécules ont pu être encapsulées telles que des peptides⁸³, des protéines⁸⁴ ou encore des vaccins⁸⁵.

La formulation par double émulsion/évaporation de solvant engendre des particules le plus souvent de taille microscopique et dont la distribution en taille est relativement large (typiquement 50 %) ⁸⁶. La grande taille des vecteurs conduit cependant à de forts taux d'encapsulation.

Les étapes clés de cette méthode de préparation sont la formulation de l'émulsion secondaire et l'évaporation de solvant. Elles doivent s'effectuer le plus rapidement possible afin de limiter la diffusion des molécules de la phase aqueuse interne vers la phase aqueuse externe⁸⁷. De plus la diffusion des molécules favorise l'adsorption de ces dernières à la surface des particules et donc entraîne leur relargage rapide et important lors de la resuspension des particules. Ce « burst effect » est généralement attribué à la libération préférentielle des PA en raison de la formation de canaux poreux à travers la matrice polymère durant la lyophilisation des particules⁸⁸.

Des microparticules de PLA/PLGA encapsulant de la gentamicine (antibiotique) ont été préparées par spray drying ou par émulsion/évaporation. Quel que soit le procédé, la taille des nanoparticules et la distribution sont identiques par contre le taux d'encapsulation est plus élevé en spray drying qu'en émulsion/évaporation⁸⁹. On peut aussi citer l'encapsulation de facteurs de croissance ((PDGF)-BB) dans des microparticules de PLGA recouvertes de PVA. La taille de ces particules est d'environ 40 µm pour un taux d'encapsulation de 15 à 20 %⁸⁴.

3) Les Nanoparticules solides lipidiques

Les nanoparticules solides lipidiques (SLN, solid lipid nanoparticle) ont été mises au point à partir des années 1990 afin de s'affranchir des problèmes inhérents à la préparation des liposomes et des nanoparticules polymères. Elles sont composées d'un cœur lipidique recouvert par des tensio-actifs. Les SLNs présentent plusieurs avantages :

- leurs méthodes de préparation ne nécessitent pas d'utiliser des solvants organiques
- leur production à grande échelle est relativement aisée à mettre en œuvre
- leur conservation au fil du temps est beaucoup plus facile⁹⁰

Ces particules possèdent la caractéristique d'utiliser un matériau cœur sous forme solide à température ambiante et en général à 37 °C.

Le choix du matériau cœur dépend bien entendu des caractéristiques souhaitées pour les SLNs (taille, type de principe actif encapsulé, température d'utilisation, ...), elles font partie des composés dits « GRAS » (Generally Recognize As Safe). Il s'agit le plus souvent de triglycérides (tristearin), diglycérides (glycerol behenate⁹¹), monoglycérides (glycerol monostearate⁹²) ou de stéroïdes (cholestérols⁹³) utilisés dans la mesure où le composé cœur de la particule sera biodégradable bioassimilable et non toxique.

a) Méthodes de préparation des SLN

Les 2 méthodes principales de production des SLN sont l'homogénéisation haute pression et les ultrasons^{90,94}.

- Homogénéisation haute pression

La première étape consiste à dissoudre le principe actif à encapsuler dans le cœur lipidique ; cette opération a lieu à une température supérieure de 5 à 10 °C à la température de fusion du lipide choisi. L'homogénéisation peut ensuite se faire à chaud⁹¹ ou à froid.

A chaud, le mélange est ensuite dispersé sous agitation dans une solution aqueuse de surfactant chauffée à la même température ce qui conduit à la formation d'une pré-émulsion qui va ensuite être homogénéisée dans un homogénéiseur haute pression. Le refroidissement de cette nanoémulsion entraîne la recristallisation du cœur lipidique et au final la formation de nanoparticules lipidiques solides.

Cette technique permet d'encapsuler des principes actifs relativement sensibles à la température car les temps de chauffage sont relativement courts et n'entraînent pas une dégradation trop importante.

La technique d'homogénéisation à froid est employée si les principes actifs sont très sensibles à la température ou s'ils sont hydrophiles. Dans ce cas, le mélange principe actif-cœur lipidique fondu est refroidi rapidement (pour assurer la répartition statistique du principe actif lors de la recristallisation) puis pulvérisé en microparticules de quelques dizaines de µm de diamètre par broyage. Elles sont ensuite dispersées à froid dans une solution aqueuse de surfactant. Puis la pré-émulsion obtenue est homogénéisée à froid afin d'obtenir les nanoparticules.

Contrairement à la technique d'homogénéisation à chaud, l'homogénéisation à froid conduit à la formation de particules plus grosses et dont la polydispersité est plus élevée⁹⁵.

Ces techniques sont déjà largement utilisées pour la production à grande échelle dans l'industrie pharmaceutique.

- Ultrasons

De la même manière que pour l'homogénéisation à chaud, le principe actif est chauffé avec le cœur lipidique puis dispersé dans une solution aqueuse de surfactant à chaud⁹⁶. Après agitation, la pré-émulsion formée est ensuite soniquée, la cavitation acoustique va rompre les microgouttelettes et conduire à la formation de nanoparticules⁸⁸.

Cette technique possède l'avantage d'être facilement mise en œuvre au niveau d'un laboratoire mais conduit à la formation de particules plus grosses et plus polydisperses que dans le cas de l'homogénéisation. L'utilisation d'une sonde métallique peut aussi contaminer les lots de particules préparés en raison de la libération de petites particules métalliques.

b) Encapsulation de principes actifs

Les SLNs sont majoritairement utilisées pour l'encapsulation de composés hydrophobes. Les principaux facteurs régissant l'efficacité d'encapsulation sont la solubilité et la miscibilité du principe actif dans le cœur lipidique fondu ainsi que les caractéristiques chimiques, physiques et le polymorphisme du matériau cœur une fois recristallisé⁹⁰. Lors de la phase de refroidissement des SLNs, le cœur va peu à peu cristalliser et ainsi piéger les principes actifs. La structure cristalline du matériau cœur est donc un paramètre essentiel d'une part au niveau du taux d'encapsulation mais aussi du point de vue de la cinétique de libération du principe actif. Cette recristallisation n'est pas forcément uniforme, c'est pourquoi on parle de polymorphisme cristallin.

Les glycérides par exemple peuvent cristalliser sous 3 formes principales : α , β , β' .

Un refroidissement rapide des SLNs composées de glycérides va entraîner une cristallisation sous la forme α qui est instable et va au cours du temps aboutir à une cristallisation sous forme β . Cette évolution tend à former un cristal avec le moins de défauts possibles et conduit à l'expulsion progressive des principes actifs encapsulés. Si cette caractéristique est connue et maîtrisée, elle peut être un atout très puissant en vue de libérer des molécules à un moment précis. Si au contraire on souhaite limiter la formation de « cristaux parfaits », il devient alors intéressant d'utiliser un mélange de matériaux cœurs.

La phase de refroidissement du cœur lipidique est le point clé de l'encapsulation. Lorsqu'une zone a cristallisé, les principes actifs ne peuvent plus y pénétrer ou en sortir ; on peut donc, si les caractéristiques du matériau sont suffisamment connues, choisir en quelque sorte où vont être encapsulés les principes actifs.

Le tableau I-2 décrit des exemples de principes actifs encapsulés au sein des SLNs ainsi que leurs applications :

type de molécule encapsulée	matériau cœur	cible	type d'injection	réfs
risperidone	Compritol® 888 ATO (glyceryl behenate)	-	-	97
	Imwitor® 900K (glyceryl monostearate 40-55%)	-	-	97
	Lipocire® (glycerides hydrogénés d'amande de palmier)	-	-	97
lopinavir (traitement HIV)	Compritol® 888 ATO (glyceryl behenate)	lymphocytes T	orale/injection intra intestinale	98
pDNA	acide stéarique	Na1300 (neuroblastome)	<i>vitro</i>	99
betamethasone	Precirol® ATO 5 (glycerol distéarate)	peau	local	99
doxorubicine	monostéarine	MCF-7 (cellules tumorales mammaires)	<i>vitro</i>	100

Tableau I-2 : Exemples de molécules encapsulées au sein de SLN.

Les SLNs possèdent cependant quelques inconvénients et notamment une tendance à la gélification. Lors du passage d'une structure cristalline à une autre, il semblerait que l'apparition de zones cristallisées et pauvres en tensio-actif en surface favorisent la gélification des particules. Cette transformation est le plus souvent irréversible.

La structure cristalline du cœur lipidique limite aussi la quantité de principe actif encapsulable. Enfin leur trop grande stabilité peut s'avérer un problème pour la délivrance de molécules d'intérêt au niveau du corps humain.

4) Les Cyclodextrines

Les composés de la famille des cyclodextrines (CD) sont des oligosaccharides cycliques issus de la dégradation de l'amidon par *Bacillus macerans* et ont été découverts par Villiers en 1891. Cette dégradation bactérienne conduit à la formation de D-glucopyranoses liés en α (1,4). Dans cette configuration, chaque unité glucosidique est en conformation chaise.

Les cyclodextrines (Figure I-13) ont une forme conique dont le sommet est tronqué. La partie extérieure est hydrophile (des groupements hydroxyle sont présents du fait de la conformation chaise) alors que l'intérieur de la cavité comporte un domaine apolaire et plutôt hydrophobe. Ce sont des molécules biocompatibles qui se dégradent dans l'organisme en unités glucosidiques.

Les 3 cyclodextrines le plus souvent employées (CDs naturelles) sont appelées α -, β - et γ - cyclodextrines et possèdent respectivement 6, 7 et 8 unités glucosidiques. En laboratoire il est possible de synthétiser des cyclodextrines contenant beaucoup plus d'unités glucosidiques mais leur purification est difficile et limite leur production à grande échelle.

La figure I-13 montre la structure moléculaire des α -, β - et γ - cyclodextrines :

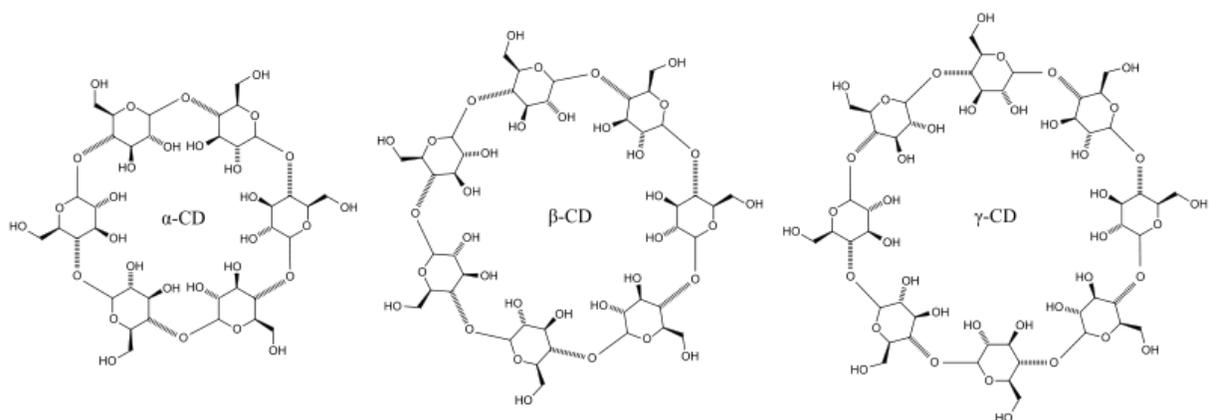


Figure I-13 : Structure moléculaire des α -, β - et γ - cyclodextrines d'après Stanisław Skowron.

Les CDs peuvent former des complexes d'inclusion grâce à des interactions non covalentes avec une molécule hydrophobe dont la taille est suffisamment petite pour se loger dans la cavité de la CD (figure I-14).

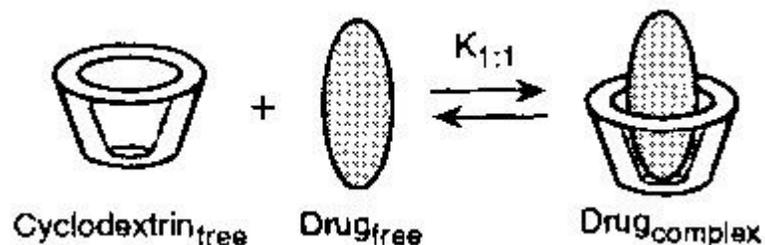


Figure I-14 : Principe du complexe d'inclusion entre une cyclodextrine et une molécule hydrophobe (d'après <http://www.pharmainfo.net/pharma-student-magazine/cyclodextrins-pharmaceuticals-overview-0>).

Dans le cas d'une utilisation des CD comme vecteurs de principes actifs, on procède en général à une modification de leur surface extérieure de manière à prolonger la durée de vie du complexe CD-principe actif dans l'organisme et de permettre un ciblage cellulaire. Ainsi les groupements hydroxyle présents en surface peuvent être modifiés. Les CD sont de petites molécules (diamètre extérieur <2 nanomètres) par conséquent on les utilise le plus souvent sous une forme liée à une structure porteuse pour former un édifice de quelques dizaines à quelques milliers de nanomètres. De cette manière on peut encapsuler plusieurs molécules de principe actif par édifice.

Leur biocompatibilité permet de les employer au niveau médical. Certaines CD comme la α -cyclodextrine, l'hydroxypropyl- β -cyclodextrine ou la sulfobutylether- β -cyclodextrine interviennent dans la composition de vecteurs de protéines injectables¹⁰².

Quelques exemples d'applications des cyclodextrines sont représentés dans le tableau I-3 :

matériau cœur	cible	type de liaison	type de molécule encapsulée	réfs
β cyclodextrine	-	épichlorhydrine	anti-inflammatoire (naproxen, nabumétone)	101
	-	épichlorhydrine	antifongique (naftifine, terbinafine)	101
β cyclodextrine	HpG2	polyglycérols hyperbranchés (HPG)	paclitaxel	103
	HeLa	chitosan	doxorubicine	104

Tableau I-3 : Exemples de molécules encapsulées grâce à des cyclodextrines et leurs applications.

5) Les dendrimères

Les dendrimères (du grec *dendro* : arbre) sont des macromolécules branchées organisées autour d'un cœur plurifonctionnel. Ils forment une structure à trois dimensions composée d'unités monomères possédant au moins trois sites réactionnels dont un est lié à la génération précédente et dont les autres servent de point d'ancrage à la génération future. Les dendrimères ont un diamètre en général inférieur à 20 nanomètres, d'une part parce que les monomères constitutifs des particules sont petits et d'autre part, De Gennes a montré en 1983 qu'en raison de l'encombrement stérique il est difficile d'aller au-delà d'une dizaine de générations greffées.

a) Méthodes de synthèses

Il y existe deux approches possibles pour la synthèse des dendrimères¹⁰⁵, l'une dite divergente¹⁰⁶ et l'autre dite convergente¹⁰⁷ (Figure I-15).

La synthèse divergente est la première à avoir été utilisée. Le dendrimère est construit à partir du cœur puis les monomères sont greffés au fur et à mesure (si les monomères possèdent 3 sites réactionnels, on double le nombre de monomères greffés à chaque étape).

La synthèse convergente s'effectue de l'extrémité vers le cœur. Les monomères vont dans un premier temps former des dendrons (assemblage de monomères ne possédant qu'un seul site réactionnel) qui sont liés à chaque étape pour finalement se fixer sur le cœur.

Du point de vue pratique, la synthèse divergente est plus compliquée puisqu'elle nécessite des étapes de purification à chaque génération et engendre des défauts au niveau de l'assemblage. Les dendrimères obtenus par synthèse convergente sont plus faciles à purifier et cette méthode permet d'obtenir des particules monodisperses mais limite la taille finale en raison de l'encombrement stérique. Le choix de la méthode de synthèse est le plus souvent régi par le type de molécules utilisé.

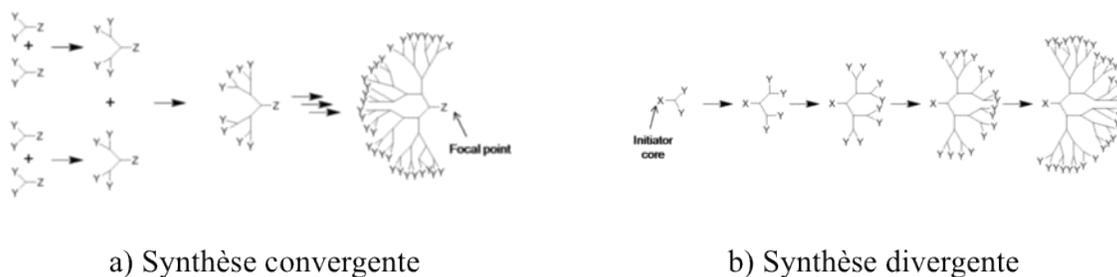


Figure I-15 : Schéma des deux modes de synthèse des dendrimères d'après <http://fr.wikipedia.org/wiki/Dendrimère>.

b) Utilisation des dendrimères

Les dendrimères sont utilisés de différentes manières au niveau biomédical¹⁰⁸, les particules peuvent en effet encapsuler¹⁰⁹ ou adsorber des molécules en vue d'une injection au niveau du corps humain. Ceci nécessite parfois de modifier les dendrimères en surface pour cibler spécifiquement un type cellulaire¹¹⁰. On peut également les modifier au niveau de la couche interne afin de créer suffisamment d'espace pour pouvoir encapsuler des principes actifs ou pour utiliser la molécule à vectoriser comme cœur du dendrimère. On peut aussi greffer des dendrons en surface de nanoparticules^{111,112} afin d'augmenter la quantité de principe actif encapsulée et la taille de la particule.

Les dendrimères de la famille des PAMAMs (poly(amidoamine)) ont été les premiers décrits dans la littérature par Tomalia en 1985¹⁰⁶. Ils sont aussi bien utilisés en tant que vecteurs de principes actifs que pour du diagnostic ou de la transfection de gènes.

B. Les particules inorganiques

Ces particules dont le cœur est généralement composé de métaux servent principalement comme agents de contraste en imagerie médicale.

1) Les Quantum Dots : QDots

Les Quantum Dots (boîtes quantique) sont des cristaux semi conducteurs en général de forme sphérique et d'un diamètre inférieur à 10 nanomètres. Ils sont constitués d'un alliage entre un élément de la colonne II et un élément de la colonne VI du tableau périodique (CdTe, ZnSe)¹¹³ ou un élément des colonnes III et V (InAs, InP)^{114,115}.

Ces particules, du fait de leur taille, possèdent des propriétés physiques particulières. L'excitation d'un QDot par un photon d'énergie supérieure au gap (bande interdite séparant la bande de valence et la bande de conduction) conduit à la formation d'un exciton : une paire trou-électron ; un électron se retrouve au niveau de la bande de conduction tandis que la bande de valence se retrouve en déficit (trou). Lorsque l'électron retourne à son état fondamental, il émet de la fluorescence à une longueur d'onde proportionnelle au diamètre du QDot. Le contrôle de la taille des particules permet ainsi de sélectionner une longueur d'onde d'émission souhaitée : en faisant diminuer la taille des QDots, on augmente la valeur du gap¹¹⁶.

En augmentant la taille des cristaux, on va balayer le spectre du bleu au rouge (Figure I-16).

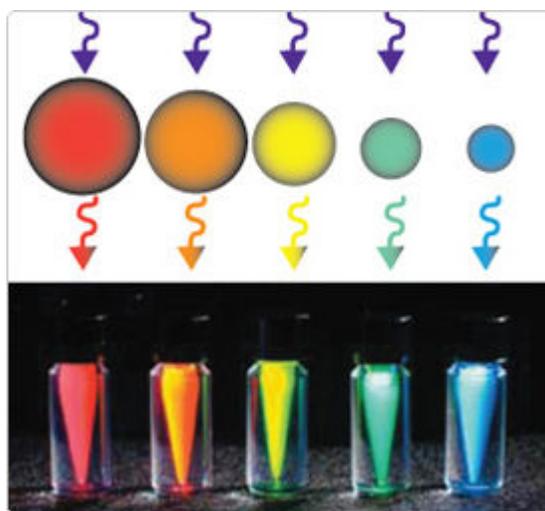


Figure I-16 : Représentation schématique de la couleur d'émission des quantum dots en fonction de leur diamètre (d'après <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/brands/Molecular-Probes/Key-Molecular-Probes-Products/Qdot/Technology-Overview.html?icid=fr-qdot-1>).

a) Synthèse des QDots

Il existe deux grandes voies de synthèse des Quantum Dots :

- la première a été décrite par Murray en 1993 et nécessite des solvants organiques coordinants,
- la seconde, dite hydrothermale, se fait en milieu aqueux et a été développée par Weller en 1996.

Un des précurseurs est solubilisé dans le solvant à chaud et on ajoute ensuite le second précurseur de manière à ce que la concentration totale en précurseurs soit supérieure au seuil de nucléation. Ceci conduit à la formation de germes (la formation de germes a lieu tant que la concentration totale en

précurseurs est supérieure au seuil de nucléation) qui vont croître par addition des précurseurs encore présents dans le milieu. Enfin, lorsqu'il n'y a plus suffisamment de précurseurs dans le réacteur, des phénomènes de maturation d'Ostwald vont entraîner l'augmentation de la taille des particules.

La vitesse d'ajout du second précurseur est cruciale quant à la formation de particules monodisperses ; celle-ci doit se faire le plus rapidement possible.

- Synthèse organométallique

La première synthèse de QDots décrite a été celle de nanocristaux de CdSe. Un précurseur du cadmium (CdMe_2) est dissout dans un mélange de solvants organiques coordinants (trioctylphosphine et oxyde de trioctylphosphine : TOP/TOPO) chauffé à 300°C puis le précurseur du sélénium (TOPSe) est ajouté rapidement¹¹⁷. Il est possible de « choisir » la longueur d'onde d'émission des QDots si l'on stoppe le mûrissement d'Ostwald en précipitant les QDots dans un mélange d'alcools¹¹⁸.

Cette voie de synthèse a depuis été optimisée afin de mieux contrôler la phase de croissance des particules et ainsi obtenir une distribution en taille plus petite, notamment par l'ajout d'un autre solvant coordinant comme l'hexadécylamine (HDA) ou la dodécylamine (DDA)¹¹⁹. Toutefois, la toxicité et le coût de ces solvants ont amené les chercheurs à se tourner vers des solvants non coordinants (alcane, alcènes, ...) ¹²⁰.

De la même façon, le choix des précurseurs a évolué au cours du temps et le diméthylcadmium est aujourd'hui remplacé par de l'oxyde de cadmium¹²¹.

Les QDots sont le plus souvent passivés après leur synthèse¹²² ce qui permet d'augmenter sensiblement leur rendement quantique de fluorescence et limite la dégradation du cœur. Cette passivation se fait par ajout d'une couche de ZnS ou de CdS qui se forme après ajout en goutte à goutte de précurseurs de zinc (ou de cadmium) et de soufre et à une température plus basse que celle de la synthèse des QDots.

Ce type de synthèse présente plusieurs inconvénients :

- elle nécessite une injection rapide des précurseur
- les solvants organiques utilisés sont toxiques et chers

- les QDots obtenus sont hydrophobes car on retrouve à leur surface des ligands organiques (restes de solvant) et une étape d'hydrophilisation est donc nécessaire en vue d'une utilisation biomédicale.

- Synthèse en milieux aqueux

Le principe est le même que celui de la synthèse par voie organique ; il consiste en l'ajout rapide du deuxième précurseur dans un milieu aqueux contenant le premier précurseur puis le mélange est chauffé à reflux ou dans un autoclave ce qui permet la formation des monomères. Les particules vont ensuite être soumises aux phénomènes de mûrissement d'Ostwald puis passivées pour répondre aux critères définis par l'expérimentateur. Les ions métalliques sont généralement stabilisés par des thioalcools et des thioacides¹²².

Les conditions opératoires (pH, température lors de la phase de croissance, ...) influencent les propriétés des QDots.

La synthèse en milieu aqueux possède de nombreux avantages par rapport à celle en milieu organique :

- elle s'affranchit des solvants organiques nocifs et coûteux
- elle nécessite moins de matériels (boîte à gants, rampe à vide,...) et peut donc être mise en place facilement

b) Avantages des QDots par rapport aux sondes traditionnelles

Les QDots présentent un large spectre d'absorption UV-visible et un spectre d'émission étroit (qui peut être facilement sélectionné) contrairement aux composés fluorescents classiques (fluorescéine, Alexa Fluor, ...) qui présentent un spectre d'absorption étroit et un spectre d'émission large. Le large spectre d'absorption permet de visualiser des QDots de tailles différentes à partir d'une excitation unique¹²³. Ils sont beaucoup plus résistants au photoblanchissement ainsi qu'aux dégradations chimiques et ont une durée de vie de fluorescence plus grande.

c) Applications biomédicales

Les QDots peuvent être utilisés en imagerie pour visualiser par fluorescence des cellules ou des tissus. Cependant une modification de la surface des particules est nécessaire pour, d'une part rendre les

molécules hydrophiles (et ainsi éviter leur agrégation après injection dans le corps) et, d'autre part protéger le cœur semi-conducteur de la dégradation et donc la libération de cations métalliques potentiellement toxiques¹²³. Cette étape permet aussi d'augmenter la taille des particules et de prolonger leur durée de vie dans l'organisme.

Cette fonctionnalisation de la surface peut conduire à des interactions spécifiques ou non avec un type cellulaire. On peut ainsi recouvrir les QDots de PEGs¹²⁴, de liposomes¹²⁵. Il est possible de lier les QDots à des anticorps pour cibler spécifiquement des marqueurs de surface cellulaire.

2) Les Particules d'oxyde de fer : SPIOs

Les SPIOs (Super Paramagnetic Iron Oxyde) sont des particules dont le matériau cœur est composé d'oxydes de fer ; il s'agit en général de magnétite (Fe_3O_4) et de maghémite ($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$), ce qui leur confère des propriétés magnétiques particulières.

a) Définition du superparamagnétisme

Lorsque des matériaux ferro- ou ferrimagnétiques sont de taille suffisamment petite (quelques nanomètres), leur aimantation peut se renverser simplement par une variation de la température : on appelle temps de relaxation de Néel le temps nécessaire entre chaque renversement.

On dit qu'un matériau est superparamagnétique si, en l'absence de champ magnétique, le temps de relaxation de Néel est suffisamment petit par rapport au temps de mesure de l'aimantation pour que l'aimantation mesurée du matériau soit nulle. Un matériau superparamagnétique possède les mêmes propriétés d'aimantation qu'un matériau paramagnétique sous l'action d'un champ extérieur mais une susceptibilité magnétique supérieure.

Ainsi, des SPIOs soumises à un champ magnétique extérieur vont voir leurs moments dipolaires alignés dans la direction du champ. Du fait de leur rémanence (magnétisme résiduel) et de leur coercitivité (champ nécessaire pour annuler la magnétisation) négligeables, les SPIOs sont de formidables agents de contraste en imagerie par résonance magnétique.

Sous l'action d'un champ magnétique, le spin induit par les SPIOs perturbe le processus de relaxation des spins des protons, ce qui induit une diminution du temps de relaxation transversal (T_2) en raison de l'absence d'homogénéité du champ magnétique local. On obtient ainsi un assombrissement des images obtenues (agent de contraste négatif).

Les SPIOs peuvent être classées en plusieurs catégories en fonction de leur taille :

nom	taille
Oral SPIO	300 nm à 3,5 μ m
Standard SPIO (SSPIO)	60 à 150 nm
Ultrasmall SPIO (USPIO)	10 à 40 nm
Monocrystal IO (MIO)	10 à 30 nm

Tableau I-4 : Classification des particules d'oxydes de fer en fonction de leur taille.

b) Les méthodes de préparation des SPIOs

Historiquement, la formulation de SPIOs était obtenue par broyage de magnétite en présence de stabilisants (surfactants) mais ce procédé est long et coûteux¹²⁶. Les 2 méthodes principalement employées pour la préparation de ferrofluides sont la coprécipitation et l'émulsion.

- La coprécipitation

D'après les travaux publiés par Massart en 1981, cette technique consiste à faire précipiter des sels de fer ferreux et ferriques dans un milieu alcalin en présence ou non de surfactants (dextrane, PEG, PVA, ...) afin d'augmenter la stabilité colloïdale et la biocompatibilité des particules. Le précipité est ensuite purifié par centrifugation ou décantation magnétique, traité par une solution acide (acide nitrique ou perchlorique en général) et enfin peptisé (ajout d'un surfactant ou écrantage des charges à la surface des particules pour limiter la floculation) afin d'obtenir une suspension magnétique en milieu acide. Cette méthode de synthèse permet d'obtenir facilement de grandes quantités de particules dont le diamètre est compris entre 5 et 20 nanomètres (en fonction des conditions opératoires). Toutefois les nanoparticules obtenues ont tendance à s'agréger.

- L'émulsion

Les SPIOs peuvent être préparées dans une émulsion huile dans eau ; dans ce cas le précipité d'un mélange sel ferreux-surfactants dans un solvant organique est mis en suspension dans un solvant aqueux. L'ajout d'une base (en général méthylamine) permet de former le ferrofluide¹²⁶.

L'émulsion eau dans huile est plus utilisée dans le cas d'applications médicales pour les SPIOs. Des nanogouttes d'une solution aqueuse contenant des sels de fer recouvertes de surfactants sont mises en suspension dans un solvant organique et entraînent la formation de micelles inverses. Après ajout de nanogouttes de solution alcaline, les nanoparticules sont oxydées dans les micelles.

L'émulsion permet d'obtenir des SPIOs monodisperses de taille inférieure à 20 nanomètres.

- Autres méthodes

Les SPIOs peuvent aussi être obtenues par différentes techniques telles que la sonication de solutions aqueuses qui crée des phénomènes de cavitation générant des points chauds pendant des temps très courts dans lesquels les sels ferreux forment des particules¹²⁷, ou encore, la décomposition thermique de complexes ou d'alliages contenant du fer qui va dégrader un précurseur à haute température (entre 180 et 320 °C) : ce précurseur va devenir le noyau des SPIOs autour duquel vont se greffer d'autres molécules¹²⁸.

c) Applications des SPIOs au niveau biomédical

Les SPIOs servent essentiellement d'agents de contraste au niveau biomédical, leurs propriétés magnétiques engendrent une diminution du temps de relaxation transversal (T2) en IRM et on peut ainsi visualiser leur localisation.

Les SPIOs peuvent être utilisées pour un ciblage passif ou actif.

Dans le cas du ciblage passif, on emploie des SPIOs nues ou recouvertes de molécules non spécifiques (dextrane, PVA, ...). Les particules vont être internalisées par différentes cellules¹²⁹ : les macrophages, les cellules tumorales, les ganglions lymphatiques, ainsi que les organes du RES.

Par exemple au niveau du foie et de la rate sains, les AMI-25 (Endorem® laboratoire Guerbet) qui sont des SPIOs recouvertes de dextrane d'environ 100 nanomètres de diamètre sont internalisées de manière non spécifique par les cellules de Kupffer. En cas de tumeur ces cellules sont absentes et une non accumulation traduira un tissu malade.

Pour le ciblage actif, la surface des SPIOs est recouverte de diverses molécules pouvant interagir avec les récepteurs membranaires des cellules visées. L'essentiel une fois la cellule ciblée est de pouvoir accumuler suffisamment de SPIOs pour obtenir un contraste exploitable en IRM.

3) Les particules d'or

Les colloïdes à base d'or ont été étudiés depuis de nombreuses années. Les premiers travaux publiés remontent à 1857 avec Michael Faraday qui a décrit la réduction des ions AuCl_4^- par des composés phosphorés¹³⁰.

L'or est un matériau biocompatible. Sous forme de particules il est utilisé principalement en détection mais on peut aussi l'employer pour du ciblage actif et passif ; toutefois il est nécessaire de modifier sa surface afin d'éviter que les particules d'or s'agrègent. La formulation des nanoparticules d'or est facile et rapide ; de plus en fonction du ligand employé pour stabiliser les particules, il est possible d'ajuster la taille des particules et de greffer des molécules pouvant interagir avec des récepteurs de surface des cellules dans le but d'un ciblage actif¹³¹.

Les nanoparticules peuvent être visualisées en MET car le noyau d'or est dense ; on l'utilise aussi comme agent de contraste grâce à la résonance plasmon de surface (disparition de l'onde réfléchie sous excitation).

a) Synthèse des nanoparticules d'or

Historiquement, la synthèse de nanoparticules d'or consiste en la réduction d' $\text{Au}(\text{III})$ ou $\text{Au}(\text{I})$ en $\text{Au}(0)$. La réduction est d'autant plus facile que l'or est le métal de transition le plus électronégatif.

En 1951, Turkevitch décrit la formation de particules après réduction d'ions HAuCl_4 puis stabilisation par du citrate de sodium. La synthèse en milieu aqueux conduit à la formation de particules d'un diamètre de 20 nanomètres¹³². Néanmoins la liaison entre le citrate et l'or n'est pas très forte et le plus souvent les particules préparées par cette méthode sont ensuite stabilisées après une réaction d'échange de ligands par des molécules thiolées (la liaison Au-S est une liaison forte)¹³⁰.

L'autre mode de synthèse chimique des particules développée par Brust conduit directement à la stabilisation des particules par des ligands thiolés, l'or est dissout dans un solvant organique grâce à des agents de transfert de phase puis réduit en présence de groupements thiolés^{130,132}.

Le choix du mode de synthèse dépend de l'utilisation des particules. Bien souvent on choisira la méthode de Turkevitch pour les applications biomédicales car elle n'utilise pas de solvants organiques. La nature du réducteur employé peut varier mais en général il s'agit de NaBH_4 , les caractéristiques des particules d'or étant dépendantes des conditions opératoires (rapport molaires or/ligands, température, type de réducteur, ...)

Il existe aussi quelques procédés physiques de préparation des particules tels que l'ablation laser ou la synthèse métal vapeur qui génère un gaz d'atomes d'or qui vont être condensés de manière contrôlée en particules¹³².

b) Applications biomédicales des nanoparticules d'or

Les particules d'or peuvent être utilisées de deux façons différentes : pour la délivrance de molécules d'intérêt¹³³ ou comme agent de contraste¹³⁴ afin de marquer certaines zones du corps humain (les tumeurs principalement). Il a ainsi été démontré que des nanoparticules d'or injectées par voie intraveineuse chez des souris développant une tumeur peuvent être facilement détectées par radiographie au niveau de cette tumeur tout en utilisant des concentrations moins élevées que pour des composés à base d'iode¹³⁴.

Les propriétés de résonance de plasmon des particules permettent de créer un échauffement local lorsque celles-ci sont soumises à un rayonnement infrarouge ; on les utilise donc en cancérologie pour cibler et détruire les tumeurs par photothermie¹³⁵.

La délivrance de molécules d'intérêt ou d'oligonucléotides est largement décrite dans la littérature. Leur greffage sur les particules est relativement aisé mais plus la liaison est forte, plus il est difficile de les décrocher une fois la zone de ciblage atteinte.

Le tableau I-5 regroupe quelques applications des nanoparticules d'or :

préparation	ligand	cible	référence
réduction de HAuCl_4 par NaBH_4	anticorps anti-métadhérine	métadhérine récepteur MCF7	136
		cellules cancéreuses (sein)	136
citrate	polystyrène thiolé	-	137
citrate	PEG, FITC	HeLa	138
citrate	doxorubicine	cellules cancéreuses	139
citrate	anticorps, oligonucléotides	-	140
citrate	anticorps (hépatite B)	-	141
citrate	oligonucléotides	macrophages, HeLa, fibroblastes	142

Tableau I-5 : Principales applications des nanoparticules d'or en vue d'une utilisation biomédicale (type de synthèse, greffage, cible).

VI. Les particules employées pour le diagnostic et le traitement des pathologies de l'articulation

On l'a vu précédemment, les injections systémiques nécessitent d'administrer de grandes quantités de principes actifs pour espérer atteindre le seuil thérapeutique au niveau de l'articulation. Ceci pose des problèmes avec certaines molécules telles que les inhibiteurs de p38 MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) ou de $\text{IL1-}\beta$ qui sont facilement éliminés¹⁴³.

Le traitement des pathologies articulaires peut être amélioré par l'injection en intra-articulaire de particules encapsulant des molécules d'intérêt. La quantité de principe actif nécessaire pour dépasser le seuil thérapeutique est moindre comparée à une injection systémique et la biodistribution de ces principes actifs sera réduite. Dès lors on peut espérer vectoriser des molécules dont les effets secondaires trop importants ou une élimination rapide dans l'organisme ne permettraient pas leur utilisation.

Il n'existe pour l'instant que peu de produits disponibles sur le marché ; on peut citer le Lipotalon® (Merckle, Allemagne) qui est une formulation à base de liposomes contenant de la dexaméthasone (DXM) modifiée : DXM-21-palmitate ; la chaîne d'acide gras greffée sur la DXM permet d'améliorer l'encapsulation en réduisant la solubilité dans l'eau¹⁴⁴.

Certaines précautions doivent être observées lors des injections intra-articulaires. L'administration de principes actifs peut en effet engendrer des risques d'infection ; il est important de pouvoir les limiter et

donc l'utilisation de systèmes retard peut s'avérer utile pour traiter les pathologies articulaires puisqu'ils assurent une libération progressive des principes actifs qu'ils renferment¹⁴⁵.

Un autre inconvénient est l'élimination rapide des produits injectés au niveau articulaire, c'est pourquoi l'articulation est généralement immobilisée pendant un certain temps après l'injection pour limiter ce phénomène. Une solution à ce problème peut être apportée par l'utilisation de particules contenant des SPIOs ; après injections de ces particules un champ magnétique appliqué au niveau de l'articulation permet de les maintenir à proximité de la zone d'injection et donc limite l'élimination à travers la membrane synoviale. Ainsi des microparticules encapsulant de la dexaméthasone¹⁴⁶ ou encore des nanoparticules de PEI (poly(éthylène imide)) renfermant des SPIOs sur lesquels ont pu être greffés des plasmides¹⁴⁷, présentent des résultats encourageants dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde. De tels systèmes ne sont toutefois qu'en phase d'expérimentation, l'innocuité des particules magnétiques et de leurs produits de dégradation devant être vérifiée avant une éventuelle utilisation biomédicale.

La plupart des systèmes vectorisant des principes actifs au sein de l'articulation sont destinés à traiter les cas de polyarthrite rhumatoïde. Des molécules regroupées sous l'appellation DMARDs (Disease-Modifying AntiRheumatic Drug) ou ARMMs (AntiRhumatismaux Modificateurs de la Maladie) permettent de ralentir la progression de la polyarthrite rhumatoïde voire de la bloquer pendant un certain temps. Les DMARDs sont différents des anti-inflammatoires qui atténuent la réponse inflammatoire sans pour autant modifier la progression de la maladie et peuvent donc être utilisés en parallèle. Ils peuvent être d'origine naturelle ou synthétique.

Parmi les DMARDs les plus utilisés, on peut citer le méthotrexate (MTX), le Sulfasalazine qui sont des molécules de synthèse ainsi que les anti TNF-alpha ou les anti IL-1 pour les molécules d'origine naturelle. Ces principes actifs provoquent toutefois des effets secondaires importants au niveau du foie, de la moelle osseuse ou des reins. Le MTX est considéré comme tératogène et est donc déconseillé aux femmes enceintes. De nombreux travaux sont aujourd'hui focalisés sur l'encapsulation de ces molécules au sein de vecteurs afin de les injecter directement dans les articulations pathologiques pour limiter leurs effets secondaires. On peut citer notamment le cas de particules contenant du MTX qui sont ensuite injectées dans des articulations atteintes de polyarthrite rhumatoïde^{148,149}.

Concernant les atteintes du cartilage, Park *et coll.* ont étudié la formation de néocartilage suite à l'injection de microparticules de PLGA recouvertes de PVA dont la matrice renferme des micelles d'héparine et de PLL contenant du TGF- β 3. Les particules sont relativement grosses (20 à 80 μ m) par comparaison à la taille des chondrocytes et donc ne permettent pas une internalisation mais les résultats obtenus sont encourageants quant à la synthèse de néocartilage.

Conclusions du chapitre

Les nanotechnologies, et principalement l'utilisation de particules pour vectoriser des molécules d'intérêt, ouvrent la voie à de nouvelles thérapies. En effet l'encapsulation de principes actifs dans des particules va non seulement permettre leur protection contre les défenses immunitaires mais peut favoriser la délivrance de ces molécules sur une zone désirée, diminuant ainsi les éventuels effets secondaires et augmentant l'efficacité thérapeutique.

Cette présentation des moyens de vectoriser des molécules d'intérêt à travers le corps humain nous a permis de constater qu'à chaque problématique biologique, la chimie peut tenter d'apporter des solutions ; cependant il s'agit le plus souvent de compromis entre les effets bénéfiques et les effets délétères.

L'encapsulation d'agents de contraste a considérablement amélioré les connaissances et la caractérisation de certaines maladies (on peut notamment parfaitement discriminer des tissus sains et pathologiques) tandis que la délivrance de principes actifs constitue une solution pour le développement de nouvelles thérapies et l'administration de molécules jusqu'ici non utilisées.

Il n'existe actuellement que peu de vecteurs utilisés pour la délivrance de molécules d'intérêt au niveau articulaire et ceux ci sont majoritairement destinés à traiter la polyarthrite rhumatoïde.

Nous avons décidé de nous servir des avantages de la vectorisation pour tenter d'apporter une solution aux pathologies du cartilage. Notre objectif est de pouvoir augmenter la biodisponibilité de certaines molécules telles que le HA et la CS au sein d'une articulation pathologique et plus précisément au voisinage des chondrocytes.

Nous nous sommes donc efforcés de préparer des particules polymères submicroniques dont la couronne est constituée de HA modifiés dans le but de cibler les récepteurs CD44 présents à la surface des chondrocytes.

Références Bibliographiques

1. Vauthier, C. & Couvreur, P. Nanotechnologies pour la thérapeutique et le diagnostic. (2008).
2. Cohen-Sela, E., Chorny, M., Koroukhov, N., Danenberg, H. D. & Golomb, G. A new double emulsion solvent diffusion technique for encapsulating hydrophilic molecules in PLGA nanoparticles. *Journal of Controlled Release* **133**, 90–95 (2009).
3. Chorny, M., Fishbein, I., Danenberg, H. D. & Golomb, G. Lipophilic drug loaded nanospheres prepared by nanoprecipitation: effect of formulation variables on size, drug recovery and release kinetics. *J Control Release* **83**, 389–400 (2002).
4. Chawla, J. S. & Amiji, M. M. Cellular uptake and concentrations of tamoxifen upon administration in poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles. *AAPS PharmSci* **5**, 28–34 (2003).
5. Hillaireau, H. & Couvreur, P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 2873–2896 (2009).
6. Jeon, S. ., Lee, J. ., Andrade, J. . & De Gennes, P. . Protein—surface interactions in the presence of polyethylene oxide: I. Simplified theory. *Journal of Colloid and Interface Science* **142**, 149–158 (1991).
7. Moghimi, S. M. & Szebeni, J. Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. *Prog. Lipid Res.* **42**, 463–478 (2003).
8. Chen, V. M. and Y. Nanoparticles - A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* **5**, 561–573 (2006)
9. Sinha, R., Kim, G. J., Nie, S. & Shin, D. M. Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery. *Mol Cancer Ther* **5**, 1909–1917 (2006).
10. Suh, W. H., Suh, Y.-H. & Stucky, G. D. Multifunctional nanosystems at the interface of physical and life sciences. *Nano Today* **4**, 27–36 (2009).
11. mittal, V. V., Patel, S. J. & Sheth, S. K. Development and characterization of folate targeted nanoparticle drug delivery system. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* **1**, 1–12 (2010).
12. Kocbek, P., Obermajer, N., Cegnar, M., Kos, J. & Kristl, J. Targeting cancer cells using PLGA nanoparticles surface modified with monoclonal antibody. *J Control Release* **120**, 18–26 (2007).
13. Zhang, N., Chittapuso, C., Ampassavate, C., Siahaan, T. J. & Berkland, C. PLGA Nanoparticle-Peptide Conjugate Effectively Targets Intercellular Cell-Adhesion Molecule-1. *Bioconjug Chem* **19**, 145–152 (2008).
14. Bae, Y. H. & Park, K. Targeted drug delivery to tumors: myths, reality and possibility. *J Control Release* **153**, 198–205 (2011).
15. Gaucher, G. Mise au point de nanoparticules polymères pour l'administration parentérale d'agents anticancéreux hydrophobes. (Doctorat de l'Université de Montréal, 2009)
16. Fan, L. *et al.* Novel super pH-sensitive nanoparticles responsive to tumor extracellular pH. *Carbohydrate Polymers* **73**, 390–400 (2008).
17. Böhmer, M. R. *et al.* Ultrasound triggered image-guided drug delivery. *European Journal of Radiology* **70**, 242–253 (2009).
18. Stevanović, M., Radulović, A., Jordović, B. & Uskoković, D. Poly(DL-lactide-co-glycolide) Nanospheres for the Sustained Release of Folic Acid. *Journal of Biomedical Nanotechnology* **4**, 349–358 (2008).
19. Lorin, A., Flore, C., Thomas, A. & Brasseur, R. Les liposomes : description, fabrication et applications. *Biotechnologie, agronomie, société et environnement* **8**, 163–176 (2004)

20. Cai, S., Yang, Q., Bagby, T. R. & Forrest, M. L. Lymphatic drug delivery using engineered liposomes and solid lipid nanoparticles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **63**, 901–908 (2011).
21. Nguyen, S., Alund, S. J., Hiorth, M., Kjøniksen, A.-L. & Smistad, G. Studies on pectin coating of liposomes for drug delivery. *Colloids Surf B Biointerfaces* **88**, 664–673 (2011).
22. Satheeshbabu, N. & Gowthamarajan, K. Manufacturing techniques of lipospheres: overview. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **3**, 17–21 (2011).
23. Benoit, J. P., Briançon, S., Fattal, E., Fessi, H., Legrand P., Passirani C. Chapitre 7: Spheroides et formes vectorisées.
24. Couvreur, P. *et al.* Polycyanoacrylate nanocapsules as potential lysosomotropic carriers: preparation, morphological and sorptive properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **31**, 331–332 (1979).
25. Laroui, H. *et al.* Hyaluronate-Covered Nanoparticles for the Therapeutic Targeting of Cartilage. *Biomacromolecules* **8**, 3879–3885 (2007).
26. Wu, M., Dellacherie, E., Durand, A. & Marie, E. Poly(n-butyl cyanoacrylate) nanoparticles via miniemulsion polymerization. 2. PEG-based surfactants. *Colloids Surf B Biointerfaces* **69**, 147–151 (2009).
27. Wu, M. *Synthèse de nanoparticules à propriétés de surface contrôlées par polymérisation en miniémulsion pour la vectorisation de molécules actives.* (Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Lorraine 2007).
28. Bouchemal, K., Briançon, S., Perrier, E. & Fessi, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. *Int J Pharm* **280**, 241–251 (2004).
29. Bimark, M. *et al.* Supercritical Carbon Dioxide (SC-CO₂) Extraction of Bioactive Flavonoid Compounds from Spearmint (*Mentha Spicata* L.) Leaves. *European Journal of Scientific Research* **33**, 679–690 (2009).
30. A. Montes, M. D. G. Particles Formation Using Supercritical Fluids. (2011).
31. Couvreur, P., Roland, M. & Speiser, P. Process for preparing biodegradable submicroscopic particles containing a ... (1984). United States Patent N° 4,489,055
32. Fattal, E. *et al.* Recent advances in poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles for drug delivery. *Nanoparticles for Pharmaceutical Applications* 212–232 (2007).
33. Chauvierre, C., Labarre, D., Couvreur, P. & Vauthier, C. Novel Polysaccharide-Decorated Poly(Isobutyl Cyanoacrylate) Nanoparticles. *Pharmaceutical Research* **20**, 1786–1793 (2003).
34. Ding, A. G. & Schwendeman, S. P. Determination of water-soluble acid distribution in poly(lactide-co-glycolide). *Journal of Pharmaceutical Sciences* **93**, 322–331 (2004).
35. Li, Y. *et al.* PEGylated PLGA nanoparticles as protein carriers: synthesis, preparation and biodistribution in rats. *J Control Release* **71**, 203–211 (2001).
36. Zhang, Z. & Feng, S.-S. Nanoparticles of poly(lactide)/vitamin E TPGS copolymer for cancer chemotherapy: synthesis, formulation, characterization and in vitro drug release. *Biomaterials* **27**, 262–270 (2006).
37. Gaucher, G., Poreba, M., Ravenelle, F. & Leroux, J.-C. Poly(N-vinyl-pyrrolidone)-block-poly(D,L-lactide) as polymeric emulsifier for the preparation of biodegradable nanoparticles. *J Pharm Sci* **96**, 1763–1775 (2007).
38. Jain, R. A. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials* **21**, 2475–2490 (2000).
39. Mishra, N., Tiwari, S., Vaidya, B., Agrawal, G. P. & Vyas, S. P. Lectin anchored PLGA nanoparticles for oral mucosal immunization against hepatitis B. *J Drug Target* **19**, 67–78 (2011).
40. Zinn, M., Witholt, B. & Egli, T. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **53**, 5–21 (2001).
41. Little, S. R. Poly ([beta]-amino ester)s as pH sensitive biomaterials for microparticulate genetic vaccine delivery. (Doctorat du Massachusetts Institute of Technology, 2005)

42. Devalapally, H., Shenoy, D., Little, S., Langer, R. & Amiji, M. Poly(ethylene oxide)-modified poly(beta-amino ester) nanoparticles as a pH-sensitive system for tumor-targeted delivery of hydrophobic drugs: part 3. Therapeutic efficacy and safety studies in ovarian cancer xenograft model. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **59**, 477–484 (2007).
43. Parker, A. L., Oupicky, D., Dash, P. R. & Seymour, L. W. Methodologies for monitoring nanoparticle formation by self-assembly of DNA with poly(l-lysine). *Anal. Biochem.* **302**, 75–80 (2002).
44. Harris, J. M. & Chess, R. B. Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nat Rev Drug Discov* **2**, 214–221 (2003).
45. des Rieux, A. *et al.* Helodermin-loaded nanoparticles: characterization and transport across an in vitro model of the follicle-associated epithelium. *J Control Release* **118**, 294–302 (2007).
46. <http://www.centerwatch.com/drug-information/fda-approvals/drug-details.aspx?DrugID=697>.
47. Barnard, D. L. Pegasys (Hoffmann-La Roche). *Curr Opin Investig Drugs* **2**, 1530–1538 (2001).
48. Javadzadeh, Y. *et al.* Preparation and physicochemical characterization of naproxen-PLGA nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces* **81**, 498–502 (2010).
49. Sant, S., Nadeau, V. & Hildgen, P. Effect of porosity on the release kinetics of propafenone-loaded PEG-g-PLA nanoparticles. *J Control Release* **107**, 203–214 (2005).
50. PVP (polyvinylpyrrolidone)
<http://online1.ispcorp.com/Brochures/Performance%20Chemicals/PVP.pdf>.
51. Duarte, J. M. B., Ramalho, M. F. P. D. T., Lima, V. F. H. de & Jorge, W. A leukocyte cryopreservation technique for cytogenetic studies. *Genetics and Molecular Biology* **22**, 399–400 (1999).
52. Wang, W. Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. *Int J Pharm* **203**, 1–60 (2000).
53. Gaucher, G., Asahina, K., Wang, J. & Leroux, J.-C. Effect of Poly(N-vinyl-pyrrolidone)-block-poly(D,L-lactide) as Coating Agent on the Opsonization, Phagocytosis, and Pharmacokinetics of Biodegradable Nanoparticles. *Biomacromolecules* **10**, 408–416 (2009).
54. Domard, A. & Domard, M. Chitosan: Structure-Properties Relationship and Biomedical Applications. *Polymeric Biomaterials, Revised and Expanded* (2001). Edition CRC Press (ISBN: 978-0-8247-0569-5)>
55. Grabovac, V., Guggi, D. & Bernkop-Schnürch, A. Comparison of the mucoadhesive properties of various polymers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**, 1713–1723 (2005).
56. Yuancai, D.
<http://scholarbank.nus.edu/bitstream/handle/10635/15295/Chapter%205%20Chitosan%20coated%20PLGA%20NP.pdf?sequence=4>. 88–108 (2006).
57. Wang, Q., Jamal, S., Detamore, M. S. & Berkland, C. PLGA-chitosan/PLGA-alginate nanoparticle blends as biodegradable colloidal gels for seeding human umbilical cord mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res A* **96**, 520–527 (2011).
58. Sahu, S. K., Maiti, S., Maiti, T. K., Ghosh, S. K. & Pramanik, P. Hydrophobically modified carboxymethyl chitosan nanoparticles targeted delivery of paclitaxel. *J Drug Target* **19**, 104–113 (2011).
59. Prabha, S., Zhou, W.-Z., Panyam, J. & Labhasetwar, V. Size-dependency of nanoparticle-mediated gene transfection: studies with fractionated nanoparticles. *Int J Pharm* **244**, 105–115 (2002).
60. Tiyaboonchai, W. Chitosan Nanoparticles : A Promising System for Drug Delivery. *Naresuan University Journal* **11**, 51–66 (2003).
61. Xu, Y. & Du, Y. Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles. *Int J Pharm* **250**, 215–226 (2003).
62. Jeon, O., Bouhadir, K. H., Mansour, J. M. & Alsberg, E. Photocrosslinked alginate hydrogels with tunable biodegradation rates and mechanical properties. *Biomaterials* **30**, 2724–2734 (2009).

63. Jeon, O., Powell, C., Solorio, L. D., Krebs, M. D. & Alsberg, E. Affinity-based growth factor delivery using biodegradable, photocrosslinked heparin-alginate hydrogels. *J Control Release* **154**, 258–266 (2011).
64. Liu, D. Z. *et al.* Effects of alginate coated on PLGA microspheres for delivery tetracycline hydrochloride to periodontal pockets. *J Microencapsul* **21**, 643–652 (2004).
65. Dupayage, J. *Élaboration contrôlée de glycopolymères amphiphiles à partir de polysaccharide : synthèse de Dextrane-g-PMMA par polymérisation radicalaire par transfert d'atome.* (Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Lorraine 2009).
66. Nouvel, C. *Synthèse contrôlée de copolymères dextrane-g-poly lactide: de leur utilisation comme surfactifs biodégradables à la mise en œuvre de systèmes de vectorisation particulières.* (Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Lorraine 2002).
67. *Polysaccharides in Medicinal Applications Edition CRC Press Book.*(1996 - ISBN 9780824795405>
68. American National Red Cross Scientific Symposium (9th :, 1977 : W., Jamieson, G. A. (Graham A.), Greenwalt, T. J. (Tibor J. & American National Red Cross *Blood substitutes and plasma expanders / edited by G. A. Jamieson and Tibor J. Greenwalt ; with the editorial assistance of Alice R. Scipio.* (A. R. Liss: New York :, 1978).
69. Zhang, X. & Mehvar, R. Dextran-methylprednisolone succinate as a prodrug of methylprednisolone: plasma and tissue disposition. *J Pharm Sci* **90**, 2078–2087 (2001).
70. Covis, R. *Synthèse de polysaccharides amphiphiles à partir de dextrane et application à la stabilisation d'émulsions directes et inverses.* (Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Lorraine 2011).
71. Nouvel, C. *et al.* Biodegradable nanoparticles made from polylactide-grafted dextran copolymers. *Journal of Colloid And Interface Science* **330**, 337–343 (2009).
72. Gavory, C. *et al.* Polysaccharide-covered nanoparticles prepared by nanoprecipitation. *Carbohydrate Polymers* **84**, 133–140 (2011).
73. Rotureau, E. *et al.* Application of amphiphilic polysaccharides as stabilizers in direct and inverse free-radical miniemulsion polymerization. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **331**, 84–90 (2008).
74. Laroui, H. *et al.* Functional TNF α Gene Silencing Mediated by Polyethyleneimine/TNF α siRNA Nanocomplexes in Inflamed colon. *Biomaterials* **32**, 1218–1228 (2011).
75. Ishihara, T. *et al.* Polymeric nanoparticles encapsulating betamethasone phosphate with different release profiles and stealthiness. *Int J Pharm* **375**, 148–154 (2009).
76. Mundargi, R. C., Babu, V. R., Rangaswamy, V., Patel, P. & Aminabhavi, T. M. Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. *J Control Release* **125**, 193–209 (2008).
77. Esmaeili, F. *et al.* PLGA nanoparticles of different surface properties: preparation and evaluation of their body distribution. *Int J Pharm* **349**, 249–255 (2008).
78. Butoescu, N. *et al.* Dexamethasone-containing biodegradable superparamagnetic microparticles for intra-articular administration: physicochemical and magnetic properties, in vitro and in vivo drug release. *Eur J Pharm Biopharm* **72**, 529–538 (2009).
79. Nafee, N., Taetz, S., Schneider, M., Schaefer, U. F. & Lehr, C.-M. Chitosan-coated PLGA nanoparticles for DNA/RNA delivery: effect of the formulation parameters on complexation and transfection of antisense oligonucleotides. *Nanomedicine* **3**, 173–183 (2007).
80. Gupta, N. K., Tomar, P., Sharma, V. & Dixit, V. K. Development and characterization of chitosan coated poly-(ϵ -caprolactone) nanoparticulate system for effective immunization against influenza. *Vaccine* **29**, 9026–9037 (2011).
81. Brambilla, D. *et al.* Nanoparticles against Alzheimer's disease: PEG-PACA nanoparticles are able to link the A β -peptide and influence its aggregation kinetic. *J Control Release* **148**, e112–113 (2010).

82. Lemarchand, C. *et al.* Physico-chemical characterization of polysaccharide-coated nanoparticles. *J Control Release* **108**, 97–111 (2005).
83. Tewes, F., Tajber, L., Corrigan, O. I., Ehrhardt, C. & Healy, A. M. Development and characterisation of soluble polymeric particles for pulmonary peptide delivery. *Eur J Pharm Sci* **41**, 337–352 (2010).
84. Jiang, B., Zhang, G. & Brey, E. M. Dual delivery of chlorhexidine and platelet-derived growth factor-BB for enhanced wound healing and infection control. *Acta Biomater* (2012).doi:10.1016/j.actbio.2012.10.005
85. Rice-Ficht, A. C., Arenas-Gamboa, A. M., Kahl-McDonagh, M. M. & Ficht, T. A. Polymeric particles in vaccine delivery. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**, 106–112 (2010).
86. Kim, K. & Pack, D. W. Chapter 2: Microspheres for drug delivery. *BioMEMS and Biomedical Nanotechnology* **1**, 19–50 (2006).
87. Hans, M. L. & Lowman, A. M. Chapter 23: Nanoparticles for Drug Delivery. (2006).
88. Bio Conjugation of Biodegradable Poly (Lactiglycolic Acid) to Protein, Peptide, And Anti-Cancer Drug an Alternative Pathway for Achieving Controlled Release From Micro- And Nan. *Scribd* at <<http://www.scribd.com/doc/31018137/Bio-Conjugation-of-Biodegradable-Poly-Lactiglycolic-Acid-to-Protein-Peptide-And-Anti-Cancer-Drug-an-Alternative-Pathway-for-Achieving-Controlled-R>>
89. Prior, S., Gamazo, C., Irache, J. M., Merkle, H. P. & Gander, B. Gentamicin encapsulation in PLA/PLGA microspheres in view of treating Brucella infections. *Int J Pharm* **196**, 115–125 (2000).
90. Müller, R. H., Mäder, K. & Gohla, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. *Eur J Pharm Biopharm* **50**, 161–177 (2000).
91. Küchler, S. *et al.* SLN for topical application in skin diseases--characterization of drug-carrier and carrier-target interactions. *Int J Pharm* **390**, 225–233 (2010).
92. Hu, F.-Q. *et al.* Preparation and characterization of stearic acid nanostructured lipid carriers by solvent diffusion method in an aqueous system. *Colloids Surf B Biointerfaces* **45**, 167–173 (2005).
93. Choi, S. H. *et al.* Novel cationic solid lipid nanoparticles enhanced p53 gene transfer to lung cancer cells. *Eur J Pharm Biopharm* **68**, 545–554 (2008).
94. Pardeike, J., Hommoss, A. & Müller, R. H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *Int J Pharm* **366**, 170–184 (2009).
95. <http://formulation.vinensia.com/2011/06/method-of-solid-lipid-nanoparticles-sln.html>.
96. Aji Alex, M. R., Chacko, A. J., Jose, S. & Souto, E. B. Lopinavir loaded solid lipid nanoparticles (SLN) for intestinal lymphatic targeting. *Eur J Pharm Sci* **42**, 11–18 (2011).
97. Silva, A. C. *et al.* Preparation, characterization and biocompatibility studies on risperidone-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): high pressure homogenization versus ultrasound. *Colloids Surf B Biointerfaces* **86**, 158–165 (2011).
98. Vighi, E., Ruozi, B., Montanari, M., Battini, R. & Leo, E. pDNA condensation capacity and in vitro gene delivery properties of cationic solid lipid nanoparticles. *Int J Pharm* **389**, 254–261 (2010).
99. Jensen, L. B., Petersson, K. & Nielsen, H. M. In vitro penetration properties of solid lipid nanoparticles in intact and barrier-impaired skin. *Eur J Pharm Biopharm* **79**, 68–75 (2011).
100. Ying, X.-Y., Cui, D., Yu, L. & Du, Y.-Z. Solid lipid nanoparticles modified with chitosan oligosaccharides for the controlled release of doxorubicin. *Carbohydrate Polymers* **84**, 1357–1364 (2011).
101. Ellouze, F., Ben Amar, N. & Deratani, A. Les cyclodextrines a large cycle : synthèse, purification et applications. *Comptes Rendus Chimie* **14**, 967–971 (2011).
102. Serno, T., Geidobler, R. & Winter, G. Protein stabilization by cyclodextrins in the liquid and dried state. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **63**, 1086–1106 (2011).
103. Zhang, X. *et al.* A hydrotropic β -cyclodextrin grafted hyperbranched polyglycerol co-polymer for hydrophobic drug delivery. *Acta Biomater* **7**, 585–592 (2011).

104. Wang, J., Zong, J.-Y., Zhao, D., Zhuo, R.-X. & Cheng, S.-X. In situ formation of chitosan-cyclodextrin nanospheres for drug delivery. *Colloids Surf B Biointerfaces* **87**, 198–202 (2011).
105. Grayson, S. M. & Fréchet, J. M. Convergent dendrons and dendrimers: from synthesis to applications. *Chem. Rev.* **101**, 3819–3868 (2001).
106. Tomalia, D. A. The dendritic state. *Materials Today* **8**, 34–46 (2005).
107. Hawker, C. J. & Frechet, J. M. J. Control of surface functionality in the synthesis of dendritic macromolecules using the convergent-growth approach. *Macromolecules* **23**, 4726–4729 (1990).
108. Svenson, S. & Tomalia, D. A. Dendrimers in biomedical applications--reflections on the field. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**, 2106–2129 (2005).
109. Jain, S. *et al.* Poly propyl ether imine (PETIM) dendrimer: a novel non-toxic dendrimer for sustained drug delivery. *Eur J Med Chem* **45**, 4997–5005 (2010).
110. Jiang, X. *et al.* Self-aggregated pegylated poly (trimethylene carbonate) nanoparticles decorated with c(RGDyK) peptide for targeted paclitaxel delivery to integrin-rich tumors. *Biomaterials* **32**, 9457–9469 (2011).
111. Bronstein, L. M. & Shifrina, Z. B. Dendrimers as encapsulating, stabilizing, or directing agents for inorganic nanoparticles. *Chem. Rev.* **111**, 5301–5344 (2011).
112. Lamanna, G. *et al.* Dendronized iron oxide nanoparticles for multimodal imaging. *Biomaterials* **32**, 8562–8573 (2011).
113. Cingarapu, S., Yang, Z., Sorensen, C. M. & Klabunde, K. J. Synthesis of CdSe/ZnS and CdTe/ZnS Quantum Dots: Refined Digestive Ripening. *Journal of Nanomaterials* **2012**, 1–12 (2012).
114. Hatami, F. *et al.* InP quantum dots embedded in GaP: Optical properties and carrier dynamics. *Phys. Rev. B* **67**, 085306 (2003).
115. TANG, X., YIN, Z., DU, A., ZHAO, J. & DENY, S. MOVPE growth of InAs quantum dots for mid-IR applications. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China* **16**, Supplement 1, s25–s28 (2006).
116. Chandezon, F. & Reiss, P. Nanocristaux semi-conducteurs fluorescents. *Techniques de l'Ingenieur* 1–15 (2004).
117. Hashizume, K., Matsubayashi, M., Vacha, M. & Tani, T. Individual mesoscopic structures studied with sub-micrometer optical detection techniques: CdSe nanocrystals capped with TOPO and zns-overcoated system. *Journal of luminescence* **98**, 49–56 (2005).
118. Ishikawa, M. & Biju, V. Luminescent quantum dots, making invisibles visible in bioimaging. *Prog Mol Biol Transl Sci* **104**, 53–99 (2011).
119. Lobo, A., Borchert, H., Talapin, D. V., Weller, H. & Möller, T. Surface oxidation of CdTe nanocrystals—A high resolution core-level photoelectron spectroscopy study. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **286**, 1–7 (2006).
120. Chin, P. T. K. *et al.* Dual-emissive quantum dots for multispectral intraoperative fluorescence imaging. *Biomaterials* **31**, 6823–6832 (2010).
121. Nordell, K. J., Boatman, E. M. & Lisensky, G. C. A Safer, Easier, Faster Synthesis for CdSe Quantum Dot Nanocrystals. *J. Chem. Educ.* **82**, 1697 (2005).
122. Andrade, J. J., Brasil Jr., A. G., Farias, P. M. A., Fontes, A. & Santos, B. S. Synthesis and characterization of blue emitting ZnSe quantum dots. *Microelectronics Journal* **40**, 641–643 (2009).
123. Yu, W. W., Chang, E., Drezek, R. & Colvin, V. L. Water-soluble quantum dots for biomedical applications. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **348**, 781–786 (2006).
124. Praetner, M. *et al.* The contribution of the capillary endothelium to blood clearance and tissue deposition of anionic quantum dots in vivo. *Biomaterials* **31**, 6692–6700 (2010).
125. Gopalakrishnan, G. *et al.* Multifunctional lipid/quantum dot hybrid nanocontainers for controlled targeting of live cells. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **45**, 5478–5483 (2006).
126. Thorek, D. L. J., Chen, A. K., Czupryna, J. & Tsourkas, A. Superparamagnetic iron oxide nanoparticle probes for molecular imaging. *Ann Biomed Eng* **34**, 23–38 (2006).

127. Cao, X., Kolytyn, Y., Prozorov, R., Kataby, G. & Gedanken, A. Preparation of amorphous Fe₂O₃ powder with different particle sizes. *Journal of material chemistry* **7**, 2447–2451 (1997)
128. Roca, A. G., Marco, J. F., Morales, M. del P. & Serna, C. J. Effect of Nature and Particle Size on Properties of Uniform Magnetite and Maghemite Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **111**, 18577–18584 (2007).
129. Mou, Y. *et al.* In vivo migration of dendritic cells labeled with synthetic superparamagnetic iron oxide. *Int J Nanomedicine* **6**, 2633–2640 (2011).
130. Debouttière, P.-J. Elaboration de nanoparticules d'or fonctionnalisées pour la détection et l'imagerie biologiques. (2006).at <<http://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00194115>>
131. Cao, X., Ye, Y. & Liu, S. Gold nanoparticle-based signal amplification for biosensing. *Anal. Biochem.* **417**, 1–16 (2011).
132. Schmid, G. & Corain, B. Nanoparticulated Gold: Syntheses, Structures, Electronics, and Reactivities. *ChemInform* **34**, no–no (2003).
133. Ghosh, P., Han, G., De, M., Kim, C. K. & Rotello, V. M. Gold nanoparticles in delivery applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* **60**, 1307–1315 (2008).
134. Hainfeld, J. F., Slatkin, D. N., Focella, T. M. & Smilowitz, H. M. Gold nanoparticles: a new X-ray contrast agent. *Br J Radiol* **79**, 248–253 (2006).
135. Cai, W., Gao, T., Hong, H. & Sun, J. Applications of gold nanoparticles in cancer nanotechnology. *Nanotechnology, Science and Applications* **2008**, 17–32 (2008).
136. Unak, G. *et al.* Gold nanoparticle probes: design and in vitro applications in cancer cell culture. *Colloids Surf B Biointerfaces* **90**, 217–226 (2012).
137. Nishi, H. & Kobatake, S. Facile preparation of gold nanoparticle with diarylethene polymers by disodium malate and its photoreversible optical properties. *Dyes and Pigments* **92**, 847–853 (2012).
138. Gu, Y.-J. *et al.* Nuclear penetration of surface functionalized gold nanoparticles. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **237**, 196–204 (2009).
139. Mirza, A. Z. & Shamshad, H. Preparation and characterization of doxorubicin functionalized gold nanoparticles. *Eur J Med Chem* **46**, 1857–1860 (2011).
140. Potůčková, L., Franko, F., Bambousková, M. & Dráber, P. Rapid and sensitive detection of cytokines using functionalized gold nanoparticle-based immuno-PCR, comparison with immuno-PCR and ELISA. *J. Immunol. Methods* **371**, 38–47 (2011).
141. Shen, G. & Zhang, Y. Highly sensitive electrochemical stripping detection of hepatitis B surface antigen based on copper-enhanced gold nanoparticle tags and magnetic nanoparticles. *Anal. Chim. Acta* **674**, 27–31 (2010).
142. Rosi, N. L. *et al.* Oligonucleotide-Modified Gold Nanoparticles for Intracellular Gene Regulation. *Science* **312**, 1027–1030 (2006).
143. Butoescu, N., Jordan, O. & Doelker, E. Intra-articular drug delivery systems for the treatment of rheumatic diseases: a review of the factors influencing their performance. *Eur J Pharm Biopharm* **73**, 205–218 (2009).
144. Bone & Cartilage Program, Novartis Institutes for BioMedical Research, Novartis Pharma AG, CHE *et al.* Intraarticular drug delivery in osteoarthritis
. *Advanced drug delivery reviews* **58**, 226–242 (2006).
145. McCarty, D. J. & Koopman, W. J. *Arthritis and allied conditions: a textbook of rheumatology.* (Lea & Febiger: 1993).
146. Butoescu, N. *et al.* Magnetically retainable microparticles for drug delivery to the joint: efficacy studies in an antigen-induced arthritis model in mice. *Arthritis Res. Ther.* **11**, R72 (2009).
147. Galuppo, L. D. *et al.* Gene expression in synovial membrane cells after intraarticular delivery of plasmid-linked superparamagnetic iron oxide particles--a preliminary study in sheep. *J Nanosci Nanotechnol* **6**, 2841–2852 (2006).

148. Zhou, H., Hu, G., Wickline, S. A., Lanza, G. M. & Pham, C. T. Synergistic effect of antiangiogenic nanotherapy combined with methotrexate in the treatment of experimental inflammatory arthritis. *Nanomedicine (Lond)* **5**, 1065–1074 (2010).
149. Zykova, M. G., Prozorovskii, V. N., Ipatova, O. M., Torkhovskaia, T. I. & Glazatov, V. V. [Antirheumatoid activity of methotrexate in phospholipid nanoparticles (Phosphogliv)]. *Biomed Khim* **53**, 435–441 (2007).

CHAPITRE II : SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION DES DÉRIVÉS AMPHIPHILES DU HA

L'acide hyaluronique est une molécule extrêmement importante pour le corps humain et en particulier au niveau des articulations portantes.

C'est ce polysaccharide qui confère des propriétés physico-chimiques si particulières au liquide synovial (cf chapitre IV) et, par ses liaisons avec des protéines et d'autres polysaccharides pour former l'agrégat, joue un rôle prépondérant au sein de la matrice extra cellulaire.

Dans l'articulation, il est synthétisé par les chondrocytes majoritairement et par les synoviocytes. Les chondrocytes possèdent sur leur membrane des récepteurs appelés CD44 ayant une reconnaissance spécifique pour le HA. Ce récepteur est de type transmembranaire : il peut se lier au HA au niveau extracellulaire et le faire pénétrer dans la cellule.

Ces propriétés (reconnaissance spécifique et internalisation du HA) font l'objet de nombreuses études et, dès lors, le HA peut être utilisé pour transporter diverses molécules à proximité des chondrocytes voire à l'intérieur de ceux-ci. Cette vectorisation a été l'objet des travaux détaillés dans ce manuscrit. Notre objectif a été de préparer des particules recouvertes de HA pouvant contenir différentes molécules d'intérêt. Ces particules, une fois injectées dans une articulation pathologique, doivent pouvoir interagir avec les chondrocytes via leurs récepteurs CD44 et ainsi libérer les principes actifs encapsulés à proximité de ces cellules ou à l'intérieur de celles-ci s'il y a eu internalisation.

Le HA, molécule hydrophile, a dû tout d'abord être modifié préalablement pour le rendre tensio-actif afin de l'utiliser pour recouvrir la surface des particules. Cette modification chimique fait l'objet de ce chapitre II.

I. Généralités sur le Hyaluronane

A. Origine

En 1934, Meyer et Palmer isolent de l'humeur vitreuse de bœuf une molécule qu'ils nomment, en raison de son aspect, acide hyaluronique (hyalos signifie vitreux en grec et uronique provient du groupement uronique constitutif du HA)¹. Selon eux, les deux rôles principaux du HA sont de combler les espaces

interstitiels grâce à sa capacité à retenir les molécules d'eau ce qui empêche les déformations du globe oculaire et de protéger la cornée par recouvrement².

Au fil des investigations, il est apparu que le HA est présent dans le cordon ombilical des mammifères, la peau, les articulations et à la surface de certaines bactéries³. En fait, on le retrouve dans à peu près tous les êtres vivants (de la bactérie à l'homme) et, chez les mammifères, il est présent dans le corps entier⁴. Un humain de 70 kg contient jusqu'à 20 grammes de HA (Tableau II-1).

organe/fluide	quantité $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
cordon ombilical	4 100
liquide synovial	1 400 à 3 600
humeur vitreuse	140 à 338
cerveau	31 à 115
derme	200
crête de coq	7 500
poumon de rat	34
rein de rat	30
cerveau de rat	74

Tableau II-1 : Quantités de HA dosées dans différents tissus humains et de mammifères^{4,5}.

B. Structure

Sa structure a été déterminée après action de diverses hyaluronidases et analyse des oligomères obtenus⁶. Le HA est un polysaccharide linéaire constitué d'un enchaînement d'acide D-glucuronique lié en β 1-3 à la N-acétyl glucosamine. Chaque disaccharide est lié au suivant par une liaison β 1-4 (Figure II-1).

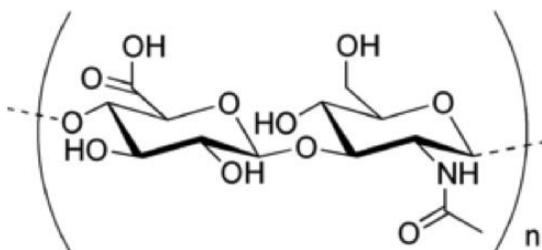


Figure II-1 : Schéma d'un motif disaccharidique de l'acide hyaluronique (l'acide D glucuronique est à gauche et la N acétyl glucosamine à droite).

Le HA fait partie de la famille des glycosaminoglycane (GAG) qui regroupe aussi les chondroïtines, les kératanes, les dermatanes et les héparines. La principale différence entre le HA et les autres GAGs est qu'il ne possède pas de groupement sulfaté qui peut se trouver en différents endroits sur le motif saccharidique et donc engendrer une infinité d'isomères.

Chaque unité glucuronate possède une charge négative à pH physiologique car le groupement carboxyle est déprotoné. De cette manière, différents cations peuvent s'associer aux chaînes de HA afin d'assurer un équilibre ionique (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , ...). Contrairement aux autres glycosaminoglycane sur lesquels on peut observer des changements de structure après formation de la chaîne (sulfatation, déacétylation), il n'y a pas de modifications post polymérisation pour le HA dans la mesure où celui-ci est extrudé des cellules directement après sa biosynthèse⁷.

Des analyses faites par microscopie à force atomique (AFM) ont permis de donner un ordre de grandeur de la macromolécule. Ainsi pour une masse d'environ 2 MDa, le HA mesure près de 4 μm de longueur pour un diamètre de 0,5 à 0,6 nm⁸.

La structure secondaire est caractérisée par des liaisons hydrogène intramoléculaires⁹, jusqu'à quatre liaisons hydrogène, (Figure II-2) qui peuvent s'établir entre les unités disaccharides. En solution aqueuse, des liaisons hydrogène avec l'eau peuvent aussi s'établir, les molécules d'eau vont alors s'intercaler entre les groupements carboxylate et acétamide¹⁰. Ces liaisons engendrent une rigidité de la chaîne qui restreint les degrés de liberté de la macromolécule. La rotation autour des liaisons β entre chaque saccharide est ainsi difficile. Le HA possède donc peu de conformations différentes.

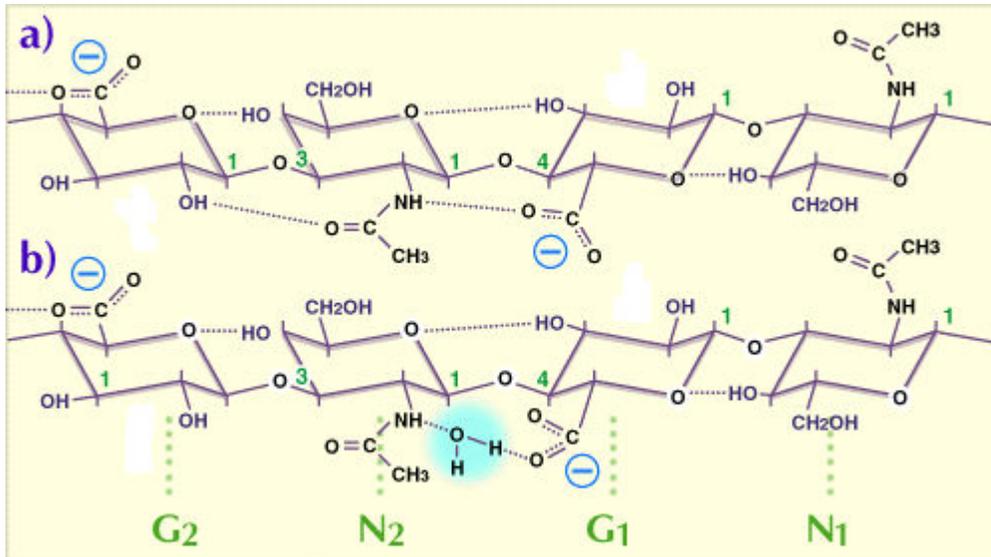


Figure II-2 : Représentation des liaisons hydrogène qui peuvent s'établir à partir d'un tétrasaccharide de HA : a) dans un solvant aprotique et b) dans l'eau¹¹.

La chaîne de HA en solution est ordonnée de manière à ce que chaque dimère soit orienté à 180° par rapport à celui qui le précède. Le polymère possède donc une conformation en hélice simple à pas de 2. Cette conformation, due aux liaisons hydrogène intramoléculaires, permet la présence de faces hydrophobes le long de la molécule¹² (Figure II-3).

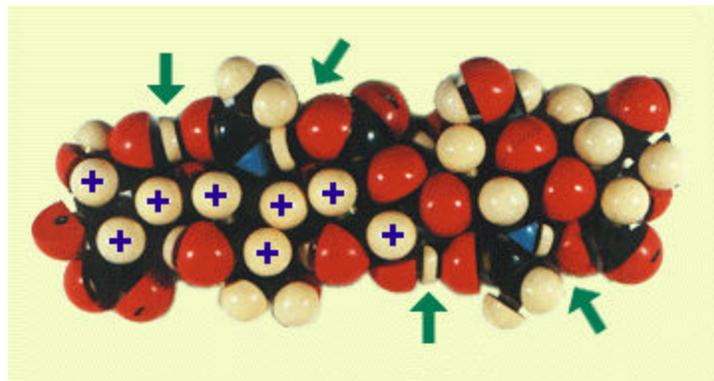


Figure II-3 : Modèle atomique représentant la structure du HA, on peut voir les 8 carbones qui forment un domaine hydrophobe (boules blanches marquées d'une croix bleue)¹¹.

Le fait que quasiment tous les groupements du HA soient impliqués dans des liaisons H implique qu'ils sont moins disponibles pour interagir avec d'autres molécules.

La structure secondaire favorise la formation de feuilletts β au niveau de la structure tertiaire : on voit apparaître une sorte de maillage lors de l'agrégation des molécules. La structure tertiaire dépend de

l'environnement du polysaccharide mais est généralement stabilisée par des liaisons hydrogène intermoléculaires.

Les analyses effectuées par RMN ^1H ont pu mettre en évidence deux types de comportement du polymère¹¹ : on observe une alternance de domaines flexibles et rigides. Les domaines rigides représentent entre 55 et 70 % de la molécule et sont constitués d'au moins 60 dimères. Si le polymère est suffisamment grand, on peut observer des boucles et des plis le long de la chaîne¹².

C. Propriétés du HA en solution

C'est un polyélectrolyte possédant un pKa apparent compris entre 3 et 4, chargé négativement dans l'eau et à pH physiologique. Il va ainsi pouvoir attirer des cations pour équilibrer les charges des groupements carboxylate. Les propriétés du HA en solution sont donc affectées par la présence de sels et leur concentration dans la solution. Par exemple, un HA de 500 kDa possède un rayon hydrodynamique trois fois plus grand dans l'eau que dans NaCl 0.5 M¹³.

A faible concentration, les molécules de HA se trouvent sous forme de pelote statistique. Chaque polymère occupe un large volume hydraté et des répulsions électrostatiques entre les molécules vont les empêcher d'interagir. Il existe de fait un volume exclu qui interdit l'interpénétration des molécules entre elles.

A forte concentration, les molécules vont s'enchevêtrer et la viscosité de la solution va être élevée. Cependant, les solutions de HA ne forment pas de gels car il n'y a pas de liaison entre les molécules.

Des études ont montré que les HA pouvaient s'associer entre eux par des interactions hydrophobes si les polymères ne sont pas déjà stabilisés par des liaisons hydrogène¹⁴.

La longueur de persistance du HA et son paramètre de flexibilité ont été déterminés en solution par Rinaudo *et coll.*^{15,16}. En présence de sels (absence de répulsion électrostatique) le paramètre de flexibilité est de 0,06 et la longueur de persistance est comprise entre 70 et 80 Å. Les chaînes de HA se contractent lorsque la force ionique augmente ou que le pH de la solution diminue. Cette longueur augmente jusqu'à 400 Å pour des solutions de faible force ionique lorsque les répulsions électrostatiques sont fortes¹⁷.

D. Rhéologie du HA

Les propriétés rhéologiques des solutions de HA, c'est-à-dire leur comportement si on leur applique une contrainte, sont dépendantes de nombreux facteurs tels que la masse molaire moyenne du polymère, la concentration, la température, le pH ou la force ionique du milieu⁸.

Le liquide synovial sain ne contient qu'environ 3 % de HA mais celui-ci possède une masse molaire élevée (quelques millions de Dalton) ce qui rend le liquide extrêmement visqueux. En revanche, la viscosité est fortement réduite dans le cas d'inflammations de l'articulation car la masse molaire du HA diminue⁸.

- Comportement à faible cisaillement

A faible concentration et/ou faible masse molaire, il n'y a pas d'enchevêtrement moléculaire et les différentes molécules de HA se comportent comme des entités séparées. Dans ce cas, une faible hausse de la concentration ou de la masse molaire entraîne une hausse proportionnelle de la viscosité (entre 1 et 10 mPas) et la solution possède un comportement Newtonien.

On commence à observer un enchevêtrement des molécules lorsque le produit de la concentration en HA par sa masse molaire engendre une viscosité de la solution supérieure à 10 mPas. Dans ce cas l'augmentation de la viscosité n'est plus proportionnelle à la concentration ou à la masse molaire et la solution se comporte comme un liquide non-Newtonien. Par exemple, un HA de 4 millions de Da possède une viscosité en solution 100 fois supérieure à un HA de 1 million de Da.

- Comportement à plus fort cisaillement

Si la contrainte appliquée à une solution de HA augmente, les chaînes de polymère qui étaient enchevêtrées ou en pelote vont petit à petit se déformer et s'étirer pour épouser le sens de la contrainte. Ceci résulte en une diminution de la viscosité avec l'augmentation de la contrainte appliquée. Si le cisaillement est suffisamment fort, les molécules sont complètement étirées et orientées selon les lignes de courant. Ainsi la viscosité est principalement fonction de la friction entre les chaînes, donc de la concentration, et devient pratiquement indépendante de la masse du HA. Ceci explique qu'une solution de HA à une concentration suffisante se comporte comme un gel en l'absence de contrainte, et comme un liquide sous la contrainte.

E. Propriétés biologiques et applications

- Rôle du HA dans le corps et particulièrement dans le cartilage

Le HA assure deux propriétés importantes dans le corps humain :

- Sa capacité à attirer et capter les molécules d'eau (jusqu'à 1000 fois son poids) permet d'hydrater les tissus au sein desquels il est présent
- Ses propriétés viscoélastiques vont donner une certaine élasticité aux tissus, amortir ou absorber les chocs. Il intervient aussi dans les premiers stades de la cicatrisation en comblant les espaces mis à nu, et va permettre la migration de certains types cellulaires (fibroblastes, monocytes).

En particulier au niveau de l'articulation, le HA présent dans le liquide synovial assure l'amortissement des chocs et, par ses propriétés viscoélastiques, le glissement des surfaces articulaires les unes par rapport aux autres. Il possède aussi des effets chondroprotecteurs : le HA stimule la production de TIMP-1 (inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases matricielles 1, protéine qui joue ici le rôle de facteur de croissance) par les chondrocytes et diminue la dégénérescence matricielle dû à l'IL-1 (interleukine 1, une cytokine pro-inflammatoire)¹⁸.

- Rôle dans les pathologies

Le HA peut être un marqueur de diagnostic pour certaines pathologies. Par exemple sa concentration dans le sérum augmente s'il y a inflammation dans le cas de polyarthrite rhumatoïde¹⁹. Au sein de l'articulation pathologique, on observe principalement une diminution de la masse molaire du HA accompagnée le plus souvent d'une diminution de sa concentration. Le polymère est dégradé par les enzymes et la balance entre synthèse et dégradation n'est plus maintenue. Ceci entraîne une perte des propriétés viscoélastiques du liquide synovial qui engendre douleurs, dégradation du cartilage et perte de mobilité.

Le HA est présent en grande quantité dans le stroma de la plupart des tumeurs. Cette couche de HA promeut la prolifération cellulaire et si l'on y trouve des oligomères de HA, elle va favoriser l'angiogénèse. Il est utilisé comme marqueur de pronostic défavorable pour les cancers du sein, des ovaires, de la prostate, les mésothéliomes entre autres. Cette accumulation de HA en périphérie des tumeurs n'est pas totalement caractérisée mais semble être le résultat d'une diminution de la dégradation de ce polymère plutôt que d'une augmentation de sa synthèse.

F. Applications biomédicales du HA

La compréhension du rôle du HA dans les tissus a permis le développement de différents processus de réparation tissulaire utilisant ce polymère. Ceci a été rendu possible par le développement de techniques permettant de purifier le HA. On parle ainsi de NIF-HANa, c'est-à-dire de Fractions Non Inflammatoires de HANa. Les premières applications biomédicales du HA décrites par Balazs *et coll.*²⁰ concernent la chirurgie ophtalmique et l'utilisation de gels de HA de haute masse moléculaire (Healon[®], Abbott Medical Optics, USA) pour la transplantation de cornée. Le HA est utilisé dans de nombreuses applications, soit à l'état natif soit préalablement modifié.

- Viscosupplémentation

Une des principales applications biomédicales du HA est la viscosupplémentation. Dans le cas de pathologies articulaires, l'intégrité du HA n'est pas préservée et ceci conduit à la destruction de l'articulation. La masse molaire du HA diminue dramatiquement, passant de plusieurs millions de Da à seulement quelques dizaines de kDa. On peut injecter des solutions visqueuses de hyaluronate de sodium (HANa) tel que le Hyalgan[®] (Fidia, Italie) ou des gels de HA réticulés de type Synvisc[®] (Biomatrix, USA). La viscosupplémentation consiste à injecter dans l'articulation pathologique une solution visqueuse de HA de haute masse molaire afin de rendre ses propriétés au liquide synovial, de diminuer la sensation de douleur et de protéger les surfaces articulaires¹⁸.

- Support matriciel/Biomatériaux

Des matrices de HA modifié sont utilisées pour la culture de cellules *in vitro*. Ces supports sont ensuite transplantés dans des articulations lésées afin de les recoloniser cellulièrement. On peut aussi ensemencher ces matrices avec des cellules souches et les différencier en chondrocytes¹⁹.

- Délivrance de principes actifs

Le HA sert de vecteur à de nombreux principes actifs. Sa biocompatibilité permet de prolonger le temps de résidence de ces molécules dans l'organisme. Il peut ainsi être administré par injection ou application topique¹² sous forme d'hydrogels contenant par exemple des anticancéreux²¹ ou des gènes²². Il va d'une part augmenter la solubilité des molécules encapsulées et d'autre part les libérer de façon progressive par diffusion ou érosion du gel.

L'utilisation du HA modifié facilite l'absorption de principes actifs après administration grâce à ses propriétés bioadhésives²³.

- Angiogénèse

Les oligomères de HA sont des promoteurs de l'angiogénèse. Ils stimulent la croissance des capillaires *in vivo* et induisent la prolifération de cellules endothéliales *in vitro* ainsi que leur migration cellulaire et leur association sous forme de tubes¹⁹.

- Implantation embryonnaire

Le HA est utilisé pour enrichir la matrice qui sert à la culture des embryons *in vitro* afin d'augmenter les capacités d'adhésion de l'embryon lors de la réimplantation (EmbryoGlue[®], PFC, USA)¹². Certaines études ont toutefois mis en doute le bénéfice apporté par l'ajout de HA²⁴.

- Cardiovasculaire

On peut augmenter la biocompatibilité des implants (stents, grafts vasculaires, ...) utilisés en les recouvrant de dérivés de HA. Cette couche limite l'adhésion des plaquettes et entraîne de fait une diminution des risques de thrombose. L'emploi de dérivés sulfatés de HA va permettre de mimer l'héparine et permet d'augmenter le temps de formation des caillots sanguins¹⁹.

- Effet antiadhésion

L'emploi de dérivés estérifiés du HA en chirurgie postopératoire permet d'éviter l'adhésion entre les couches de tissus qui vont entraver la cicatrisation et conduisent en général à une nouvelle intervention chirurgicale². Ces dérivés sont aussi utilisés notamment lors de la mise en place d'implants dentaires, pour limiter le développement de bactéries au niveau de la zone traitée¹⁹.

- Cosmétique

Le HA est devenu un argument marketing pour l'industrie cosmétique. Il est utilisé sous forme de crème aux vertus hydratantes censée augmenter les propriétés élastiques de la peau et ainsi permettre de réduire les rides bien que de tels effets ne soient pas prouvés scientifiquement pour une application locale. Il peut cependant aider à la protection de la peau contre les radicaux libres produits par les rayons UV, qui vont réagir et dégrader le HA¹².

Les injections sous cutanées de HA en revanche peuvent servir à effacer les rides, puisque sa capacité à retenir de grandes quantités d'eau permet d'augmenter artificiellement le volume du tissu. Ces injections sont plus efficaces que celles de collagène car elles diminuent les risques d'allergies et les effets durent plus longtemps (jusqu'à 24 mois). Il peut cependant y avoir un risque de réactions allergiques en fonction de la source de production du HA et de son degré de pureté.

- Réparation tissulaire

Dès les premières étapes de la cicatrisation, on trouve de grandes quantités de HA dans une matrice riche en fibrine ; ceci permet la migration de fibroblastes et de cellules endothéliales. Cette matrice va pouvoir supporter la formation de tissu granulaire et limiter l'apparition de cicatrices¹⁹.

Les processus biologiques impliquant le HA et ses nombreuses applications pour le traitement des pathologies montrent l'importance de la molécule au niveau biologique.

G. Synthèse du HA

Du fait de la difficulté à les purifier, les enzymes responsables de la synthèse du HA n'ont été découvertes et décrites qu'en 1999, soit 65 ans après la découverte du HA²⁵.

Les protéines de synthèse du HA sont divisées en deux groupes²⁶ :

Classe 1 : qui contient la grande majorité des HA synthases

Classe 2 : qui ne contient que les HA synthases de *Pasteurella multocida* (*pmHAS*)

La synthèse du HA chez les mammifères diffère de celle des autres polysaccharides. Pour les autres glycosaminoglycanes (kératane sulfate, dermatane, CS) la croissance de la chaîne se fait par l'extrémité non réductrice et nécessite une protéine support. La synthèse a alors lieu dans l'appareil de Golgi. Les

enzymes responsables de la synthèse du HA sont quant à elles situées sur la membrane. Ainsi l'addition des disaccharides se fait dans le plasma, tandis que la chaîne déjà formée est transloquée au fur et à mesure²⁷.

Les HA synthases sont différentes des autres enzymes car elles possèdent une double activité de glycosyltransférase sur la même protéine²⁵ et la chaîne de HA en croissance sert de substrat pour l'addition des saccharides suivants.

Les précurseurs utilisés pour la synthèse du HA sont l'UDP-N-acétylglucosamine (UDP-GlcNAc) et l'acide UDP-glucuronique (UDP-GlcUA). Le mécanisme de la synthèse est différent selon la classe d'enzyme :

Pour les enzymes de classe I :



Pour les enzymes de classe II :



Cette différence s'explique par le fait que la synthèse par les enzymes de classe I a lieu au niveau de l'extrémité réductrice alors que pour les enzymes de classe II elle se fait par l'extrémité non réductrice.

La synthèse du HA par les enzymes de classe I est un procédé processif *i.e.* la chaîne de HA reste attachée à l'enzyme jusqu'à la fin de la synthèse²⁵.

Chez les mammifères, il existe trois enzymes responsables de la synthèse du HA : Has1, Has2 et Has3 codées par les gènes HAS1, HAS2 et HAS3 (situés chez l'homme sur les chromosomes 19, 8 et 16 respectivement). Les enzymes possèdent sensiblement les mêmes propriétés, toutefois il a été montré que contrairement à Has1 et Has3, l'absence de Has2 est létal chez les embryons de souris²⁸.

Chez les bactéries, les trois enzymes sont notées hasA, hasB, hasC et possèdent des rôles différents :

- HasA est l'équivalent des Has de mammifères. Elle va synthétiser la chaîne de HA à partir des précurseurs tandis que les deux autres vont synthétiser les précurseurs.
- HasB est une UDP-déhydrogénase et va transformer l'UDP-glucose en acide UDP-glucuronique.

- HasC est une UDP-glucose pyrophosphorylase et convertit le glucose-1-P en UDP-glucose.

La production industrielle de HA se fait principalement selon deux méthodes :

- l'extraction du polymère dans les tissus, entre autre à partir des crêtes de coq (après broyage, traitement chimique puis purification)
- par fermentation bactérienne : des bactéries génétiquement modifiées expriment des filaments de HA. Les rendements obtenus par cette méthode sont plus importants que ceux obtenus par la méthode d'extraction (Figure II-4).

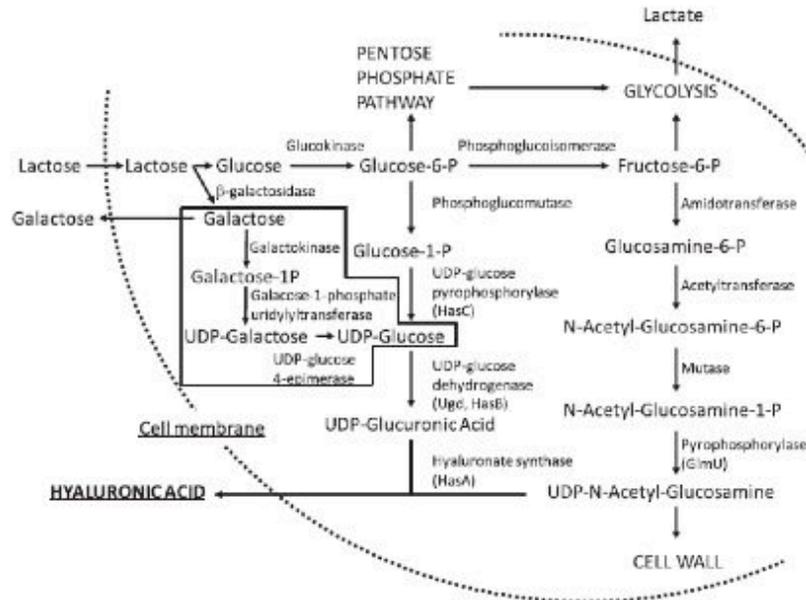


Figure II-4 : Schéma de la synthèse du HA par la bactérie *streptococcus thermophilus* YIT 2084. Le lactose internalisé par la cellule est converti en glucose et en galactose qui peuvent ensuite intervenir dans la synthèse du HA²⁹.

On peut ainsi obtenir du HA de masse molaire variant de 10^4 à 10^6 g/mol. La production de HA reste un procédé coûteux. Les rendements sont en général faibles et la purification doit être opérée avec soin en vue d'une utilisation biomédicale du produit.

H. Régulation du HA

La synthèse du HA (en culture) est affectée par certains facteurs de croissance comme TGF- β 1 (transforming growth factor β 1), EGF (epidermal growth factor), et des cytokines pro inflammatoires telles que l'IL1- α et β . *In vitro*, la synthèse de HA est améliorée par addition de PDGF et TGF et EGF.

La régulation de la dégradation se fait par des molécules de la famille des inter- α -inhibiteurs qui sont des inhibiteurs de hyaluronidases. Il semblerait qu'ils soient activés en cas de choc, septicémie, blessure.

Le HA est impliqué dans la prolifération, la migration et la réparation cellulaire. On le retrouve en grande quantité à la périphérie de certaines tumeurs³⁰. De grandes quantités de HA sont un pronostic défavorable dans le cas de cancer du sein, colorectal et d'autres tumeurs solides³⁰.

I. Dégradation du HA dans l'organisme

Le HA est une molécule fragile qui peut être dégradée par divers processus chimiques (pH³¹, radicaux libres, irradiation) et par des processus biologiques (dégradation enzymatique, élimination par le système lymphatique).

- Les enzymes

Les enzymes responsables de la dégradation du HA sont connues depuis les années 1950 mais de la même manière que pour les HA synthèses, les difficultés rencontrées pour les isoler et les purifier ont limité les travaux de recherche.

Meyer, en 1971, a proposé un classement des différentes enzymes en fonction de leur mécanisme et des produits obtenus :

- 1) Les hyaluronidases provenant de mammifères. Ce sont des endo- β -acétyl-hexosaminidases (EC 3.2.1.35) qui dégradent le HA en oligosaccharides (principalement en tétrasaccharides)³². Elles clivent la liaison β -1,4-glycosidique et possèdent une activité hydrolytique ainsi qu'une activité de transglycosidase³³. Ces enzymes peuvent aussi dégrader la chondroïtine sulfate. On les retrouve principalement au niveau des testicules, dans les lysosomes ou le venin d'abeilles.
- 2) Les hyaluronate 3-glycanohydrolases (EC 3.2.1.36) proviennent de crustacés et de sangsues. Elles dégradent le HA par attaque de la liaison β -1,3-glycosidique et on obtient ainsi des oligosaccharides (tétra et hexa principalement) contenant un motif acide glucuronique à l'extrémité réductrice³³.

3) Le dernier groupe regroupe les enzymes d'origine bactérienne (EC 4.2.2.1). Ces hyaluronate lyases entraînent une β -élimination qui conduit à la formation de 2-acétamido-2-déoxy-3-O-(β -D-gluco-4-ène-pyranosyluronic acid)-D-glucose. Elles ont été notamment isolées chez *streptococcus* et *strepomyces*³². Ces hyaluronate lyases diffèrent des autres par leur mode de dégradation ; elles ne clivent pas la chaîne de HA de manière aléatoire mais à partir de l'extrémité réductrice ce qui aboutit principalement à la formation de disaccharides.

- Dégradation chez l'homme

L'élimination du HA au niveau du corps humain peut se faire de deux façons :

- 1) La migration des molécules de HA vers le système lymphatique puis l'élimination par le foie et les reins. Cependant, le HA peut pénétrer dans le système lymphatique lorsque sa masse molaire n'est que de quelques millions de $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$. On estime que de cette manière un tiers du HA total présent dans le corps humain est éliminé chaque jour.
- 2) L'internalisation puis la dégradation par des enzymes au sein des cellules.

Les hyaluronidases chez l'homme sont codées par six gènes répartis sur deux chromosomes : HYAL1, HYAL2 et HYAL3 sur le chromosome 3 et HYAL4, PHYAL1 (pseudogène) et PH-20 (ou SPAM-1 : Sperm Adhesion Molecule 1) sur le chromosome 7³⁴. L'homologie de séquence entre les gènes présents sur le même chromosome fait penser que comme pour les HA synthases, il y a eu duplication d'un gène parent.

Les enzymes Hyal1 et Hyal2 sont les principales responsables de la dégradation du HA et de fait les plus décrites dans la littérature. On les trouve majoritairement au niveau des tissus somatiques (foie, rate, reins). Hyal2 est une enzyme extracellulaire qui est ancrée à la membrane plasmique via GPI (GlycosylPhosphatidyInositol) ; elle clive les longues chaînes de HA en oligomères d'environ 20 kDa soit 50 disaccharides. Le HA peut ensuite être internalisé et dégradé dans les lysosomes par Hyal1 principalement en tétrasaccharides³².

J. Les récepteurs du HA

L'importance du HA dans le corps humain ainsi que son implication dans de nombreux processus biologiques (normaux ou pathologiques) nécessitent que celui-ci puisse interagir avec les différentes cellules de l'organisme. C'est pourquoi on trouve de nombreux récepteurs du HA à la surface des cellules mais aussi au niveau intracellulaire et, parfois, libres dans les fluides corporels. Nous ne détaillerons dans ce manuscrit que quatre des récepteurs cellulaires du HA : le CD44 et RHAMM qui sont présents notamment dans les articulations et au niveau des tumeurs et LYVE-1 et HARE qui sont responsables de l'élimination du HA au sein de l'organisme.

1) Le CD44

Le CD44 est LE récepteur du HA. On le retrouve à la surface de la majorité des cellules : chondrocytes, kératinocytes, cellules endothéliales, cellules hématopoïétiques, fibroblastes, lymphocytes T et B, monocytes et des macrophages entre autres³⁵.

Le CD44 est une glycoprotéine transmembranaire « single pass » de type I³⁵ codée par un gène de 50 à 60 kb situé chez l'homme au niveau du bras court du chromosome 11. Celui-ci est composé de vingt exons, dont neuf sont utilisés pour l'isoforme la plus courante (exons 1-5, 16-18 et 20)³⁶ notée en général CD44s (standard) ou encore CD44H car elle a été décrite au niveau des cellules hématopoïétiques.

Cette protéine a été étudiée séparément par différents groupes et a donc été appelée différemment jusqu'au 3^{ème} International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens en 1986 où elle a été désignée sous le terme CD44 (Cluster of Differentiation 44)³⁷.

Cette protéine peut se trouver sous diverses formes dans les organismes. Les différentes isoformes du CD44 sont dues à l'épissage des RNAs et à des modifications post-translotionnelles³⁵. Les mRNAs du CD44s conduisent à l'expression d'une protéine d'environ 37 kDa qui va ensuite subir des modifications post-translotionnelles (principalement addition d'oligosaccharides par liaison N- et O-) pour arriver à une protéine d'environ 85 kDa. La protéine peut peser jusqu'à 250 kDa selon les isoformes et donc les différents épissages subits. Le CD44 appartient à la famille des hyaladhérines et plus précisément au sous-groupe des hyaladhérines présentant un module de liaison au même titre que les protéoglycanes : agrécane, versican, neurocan, brevican, ou encore le récepteur LYVE-1³⁷.

- Description de la protéine

Le CD44 est composé de quatre domaines distincts : deux domaines extracellulaires, un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique³⁸ (Figure II-5).

Le domaine extracellulaire est constitué de 248 acides aminés pour le CD44s et il se compose de deux parties. Le domaine distal, qui est le lieu de fixation du HA, correspond à la région amino terminale de la protéine. On observe une homologie de cette partie de la molécule au niveau des différentes espèces ainsi qu'avec d'autres molécules interagissant avec le HA (link protéin, agrecan, TSG6)³⁶. Un cluster d'acides aminés basiques semble être essentiel pour l'interaction entre le CD44 et le HA: Arg41, Tyr42 et Arg78 et Tyr79³⁹. Il est englobé dans un domaine d'environ 100 acides aminés au sein duquel se trouvent également trois ponts disulfure grâce à six cystéines et appelé « link module ». Celui-ci est présent sur de nombreux récepteurs du HA. Le domaine extracellulaire proximal est quant à lui le siège de nombreuses modifications post-translationnelles en particulier des liaisons avec des GAGs (liaison avec des CS ou des héparanes) ou des O- glycosylations³⁸ et les mRNAs du CD44 sont souvent épissés à cet endroit^{36,40}. Cette région n'est pas conservée d'une espèce à l'autre.

La partie extracellulaire est codée sur le gène par les exons 1 à 16.

Le domaine transmembranaire composé de vingt et un acides aminés ne possède pas de spécificité. Il ressemble aux domaines transmembranaires d'autres protéines « single pass » et l'on observe peu de variations de cette région entre les différentes espèces. Il est codé par l'exon 18 sur le gène.

La partie cytoplasmique est composée de soixante douze acides aminés relativement identiques entre les espèces ; on y retrouve des associations d'acides aminés pouvant interagir avec des protéines du cytosquelette d'actine ou participer à la transmission de signaux au niveau intracellulaire. Il existe cependant une forme de CD44 nommée « tail less » dont la partie intracellulaire est beaucoup plus petite que pour les autres. Cette forme de CD44 apparaît lorsque l'exon 19 est exprimé à la place de l'exon 20 (à noter que les exons 19 et 20 ne peuvent pas être exprimés en même temps). Dans ce cas, la partie cytoplasmique possède cinq acides aminés au lieu de soixante douze.

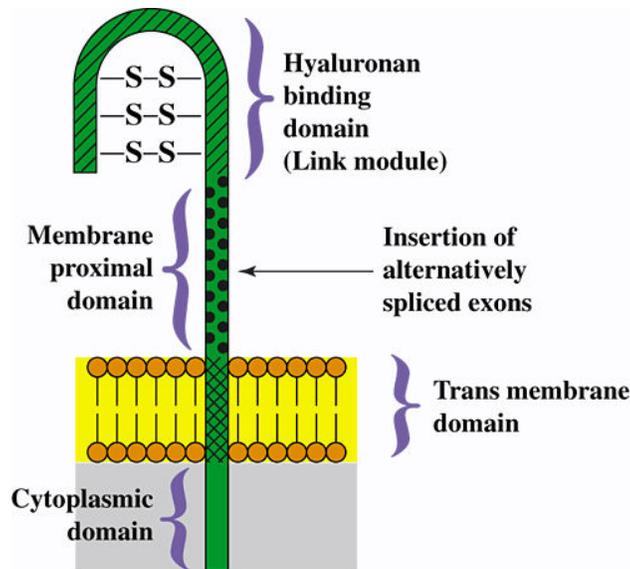


Figure II-5 : Schéma du CD44 avec les différents domaines : domaine distal, domaine proximal, transmembranaire et cytoplasmique de haut en bas⁴¹.

- Rôle avec le HA

Le CD44 peut lier les molécules de HA dès lors que la chaîne de l'acide hyaluronique est plus longue qu'un hexasaccharide. Dans le cas de HA de haute masse molaire, l'interaction peut se faire avec plusieurs récepteurs⁴² en même temps (agrégats de CD44 en surface des cellules) ce qui en augmente la force d'attraction. Ceci permet aux cellules de retenir la matrice extracellulaire à leur périphérie via le complexe CD44-HA. Le HA peut aussi être internalisé après s'être fixé au CD44. Cette étape est nécessaire à l'internalisation du HA car il ne s'agit pas d'une simple pinocytose ; en effet l'internalisation est bloquée si les cellules sont traitées par des anticorps anti-CD44³⁷.

Malgré les nombreuses études faites sur le CD44 et son affinité pour le HA, certaines questions demeurent sans réponses. Ainsi on ne sait pas expliquer quels sont les facteurs qui vont favoriser une fixation du HA en surface de la cellule plutôt que son internalisation mais il semble toutefois logique de penser que si le HA est lié à d'autres molécules, il est plus difficile de l'internaliser que s'il est libre dans le milieu extracellulaire. De la même façon, lors du processus d'internalisation du HA, on estime que le CD44 est internalisé aussi, puis se repositionne ensuite à la surface de la cellule mais aucune étude n'a pu prouver ce mécanisme à ce jour.

- Autres rôles du CD44

Le CD44 est le récepteur du HA mais aussi une « integral membrane protein ». Il sert de port d'attache pour les métalloprotéinases matricielles (comme MMP-9, -7 et MT1-MMP), d'activateur de c-Met (proto oncogène) et peut fonctionner comme un facteur de transcription nucléaire. Il participe également au réarrangement et à la transduction du signal du cytosquelette d'actine et joue un rôle dans la migration cellulaire (angiogénèse, tumeurs, morphogénèse, ...) ³⁷.

Le CD44 peut aussi être impliqué dans la migration cellulaire (rôle principal de RHAMM) notamment dans le cas de tumeurs ³⁸ ainsi que dans la différenciation. Les interactions non covalentes avec le HA déclenchent différents mécanismes notamment au niveau de la réponse inflammatoire, l'apoptose, la migration des lymphocytes ou encore dans la reproduction ⁴³.

Le CD44 assure aussi de nombreuses interactions cellule-matrice, notamment à la surface des chondrocytes. Il permet de stabiliser la matrice extracellulaire, la fixation du HA et va assurer l'homéostasie du cartilage. Au niveau intracellulaire, le CD44s interagit avec les filaments d'actine grâce à l'ankyrine ⁴⁴.

- Régulation de l'expression du CD44

Malgré de nombreux travaux, les mécanismes concernant l'expression du CD44 sont toujours difficilement connus. Le CD44 est up-régulé par certaines cytokines pro-inflammatoires telle que l'IL-1 et des facteurs de croissance comme EGF, TGF- β ou BMP-7. L'IL-1 augmente l'expression du CD44 des chondrocytes ce qui se traduit par une hausse de la capacité à lier le HA (et donc à l'internaliser et/ou le dégrader) ⁴⁵. Des cellules traitées avec BMP7 ont montré une up-régulation de l'expression de CD44 qui peut aider à retenir la matrice ³⁷.

2) RHAMM

Le récepteur cellulaire le plus important du HA après le CD44 est sans doute RHAMM (Receptor for HA Mediated Motility). Il a été initialement découvert puis cloné par Eva Turley ⁴⁶. Il est codé par le gène HMMR situé sur le chromosome 5 chez l'homme ⁴⁷. Cette protéine également appelée CD168 (Cluster of Differentiation 168) fait partie de la famille des hyaladhérines. Contrairement au CD44, RHAMM est présent dans de multiples compartiments cellulaires, associé à la membrane cellulaire, mais

n'est pas une protéine transmembranaire. Il lie le HA via une région riche en acides aminés basiques et qui ne ressemble pas au module de liaison⁴⁸. Le domaine de liaison du HA sur RHAMM est composé de deux faisceaux d'hélices contenant des résidus basiques « clés » qui vont recouvrir et entourer le HA⁴⁹. De nombreuses autres hyaladhérines utilisent le même système pour lier le HA, on les appelle hyaladhérines itinérantes. RHAMM est exprimé dans la plupart des types cellulaires tels que les fibroblastes, les cellules endothéliales, certaines cellules non adhérentes comme les lymphocytes B et T ainsi que de nombreuses cellules tumorales. On peut le trouver sur la membrane des cellules ou à l'intérieur de celles-ci, au niveau du noyau et du cytosquelette d'actine par exemple⁴⁸.

RHAMM, à la surface des cellules, lie le HA avec une grande affinité ainsi que des GAGs sulfatés comme l'héparane sulfate. La forme intracellulaire est associée à la stabilité des fuseaux formés lors de la mitose. RHAMM possède une structure en hélice (coiled-coil) alternée avec des parties linéaires (Figure II-6). Elle est composée de cinq domaines distincts dont les domaines 2 et 5 qui sont indispensables pour la motilité des cellules et l'activation des cycles cellulaires⁵⁰. Le domaine 5 est celui grâce auquel le HA peut se fixer et est responsable des interactions avec erk1 au niveau intracellulaire. Tout comme pour le CD44, les ARNs précurseurs de RHAMM peuvent être épissés et on trouve ainsi des récepteurs de différents poids moléculaires, entre 59 et 95 kDa⁵¹. Contrairement au CD44, RHAMM ne possède pas de domaine transmembranaire⁵¹. Le domaine de liaison au HA se situe au niveau C-terminal. Il s'agit de deux clusters de neuf acides aminés proches dans leur composition notés : B(X₇)B où les acides aminés désignés par B sont l'arginine ou la lysine³⁰. D'après les études menées, le groupe des sept autres acides aminés intercalés (X₇) ne doit pas contenir d'acide aminé acide mais doit contenir au moins un acide aminé basique pour pouvoir interagir avec le HA⁵¹. Le rôle principal de RHAMM est la médiation de l'adhésion et de la motilité des cellules après association avec les chaînes de HA⁵¹. Ainsi, cette protéine est impliquée dans les processus de réparation des blessures et dans la prolifération des tumeurs car la quantité de HA présente y est supérieure à celle des tissus sains. Son expression à la surface des cellules est quasi inexistante si le tissu est sain mais elle augmente considérablement lors de la réparation d'un tissu lésé⁴⁸. Lorsque RHAMM se trouve à la surface de la membrane des cellules en présence de CD44, il ne joue qu'un rôle mineur au niveau des processus inflammatoires. Par contre en l'absence de CD44, RHAMM va assurer cette fonction et peut augmenter les processus inflammatoires. Une étude a d'ailleurs montré que dans ce cas la protéine était responsable de l'augmentation de la destruction de l'articulation⁴⁸.

Deux types de comportements ont été décrits concernant la fixation des cellules grâce à RHAMM sur des chaînes de HA : si le polysaccharide est de grande masse molaire, la reconnaissance avec la protéine va plutôt entraîner la migration de la cellule le long du HA. Par contre la reconnaissance avec des

oligomères de HA tend à promouvoir la prolifération cellulaire (croissance de cellules endothéliales) ainsi que des mécanismes de phosphorylation de la tyrosine⁵¹. Lorsqu'il se trouve à l'intérieur de la cellule, RHAMM est impliqué dans d'autres processus tels que l'activation de cascades de signalisation en s'associant à des protéines de type erk1 ou mek1, la phosphorylation de protéines via des tyrosines kinases comme Src⁴⁸. RHAMM est aussi impliqué dans la division cellulaire, il fait partie de la famille des MAP protéines (protéines associées aux microtubules); le récepteur va pouvoir s'associer de manière réversible aux microtubules afin de stabiliser l'assemblage des fuseaux et permettre aux centrosomes de s'éloigner l'un de l'autre.



Figure II-6 : Schéma de la protéine RHAMM-P1 (une des isoformes de RHAMM). Les domaines hélicoïdaux sont représentés en rouge⁴⁹.

3) HARE et LYVE-1

HARE et LYVE-1 sont deux récepteurs du HA responsables de son endocytose et de sa dégradation.

HARE (HA associated receptor for endocytosis) est aussi appelé Stabilin-2. Il a été découvert au niveau des cellules endothéliales du foie, mais on le retrouve aussi au niveau des ganglions lymphatiques et au niveau de la rate⁵¹. Le gène codant pour la protéine (STAB2) est situé chez l'homme au niveau du chromosome 12⁵². HARE est une protéine transmembranaire de type I, comme le CD44, et fait partie de la famille des fasciclins (glycoprotéine de surface liée à des lipides et de forme alpha hélicoïdale).

On le trouve sous deux formes différentes au niveau des cellules, une forme « courte » de 175 à 190 kDa et une forme « longue » de 315 kDa. La différence entre les deux formes ne provient pas de l'épissage de l'ARN mais plutôt d'un clivage protéolytique de la protéine de 315 kDa. La forme courte correspond à la partie C-terminale de la forme longue⁵³. La forme longue de HARE est composée d'environ 2550 acides aminés dont la grande majorité (2458) correspond à la partie extracellulaire. La partie cytoplasmique est constituée de 72 acides aminés⁵². Le site de reconnaissance du HA porté par la protéine est situé à proximité de la membrane et est similaire à celui du CD44⁵³.

En plus de se lier au HA, HARE possède une affinité pour d'autres glycosaminoglycanes tels que la chondroïtine sulfate, l'héparine ou le dermatane sulfate⁵³. Une fois les GAGs fixés à cette protéine, ils sont internalisés puis dégradés dans des lysosomes. Le récepteur se replace ensuite en position initiale.

LYVE-1 (Lymphatic vessel endothelial HA receptor) a été découvert par David G Jackson⁵⁴ dans l'endothélium des vaisseaux lymphatiques et des sinus. C'est la principale protéine responsable de l'absorption du HA au niveau lymphatique. On le retrouve aussi au niveau des cellules endothéliales du foie et de la rate, endroits où la dégradation du HA de haut poids moléculaire a lieu (contrairement au CD44, LYVE-1 (Figure II-7) a tendance à se lier et donc à dégrader les HA de haut poids moléculaire).

LYVE-1 est une glycoprotéine transmembranaire de type I composée de 322 résidus, qui peut se lier au HA immobilisé ou soluble.

La protéine possède 43 % d'homologie avec le CD44 et cette similitude se retrouve principalement au niveau du module de liaison. LYVE-1, tout comme le CD44, possède un domaine cytoplasmique d'environ soixante dix acides aminés et un domaine transmembranaire d'une vingtaine d'acides aminés. La différence entre les deux récepteurs se fait au niveau de la partie extracellulaire qui est plus courte pour LYVE-1 et qui ne possède que deux sites de N-glycosylation au lieu de cinq pour le CD44⁵⁵. De plus, il est intéressant de noter que l'on retrouve le récepteur LYVE-1 au niveau de cellules où le CD44 est absent et inversement. Ceci accredit l'idée que LYVE-1 et le CD44 proviennent d'un gène de départ commun mais qui a évolué différemment⁵⁵ (Figure II-7).

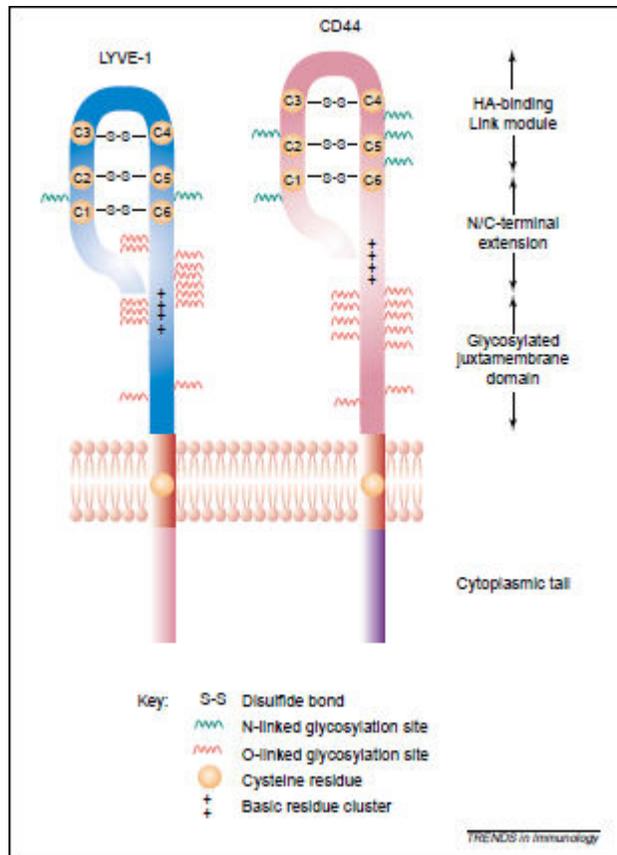


Figure II-7 : Représentation schématique de LYVE-1 et CD44⁵⁶.

K. Les modifications chimiques du HA

Le hyaluronane (acide hyaluronique et hyaluronate de sodium) est un composé qui possède ses propres caractéristiques physico-chimiques. L'intérêt croissant pour ce polysaccharide a incité les chercheurs à l'utiliser au niveau médical pour la vectorisation de principes actifs ou la viscosupplémentation. Pour cela, il a fallu développer différentes voies de synthèse afin d'obtenir des dérivés du hyaluronate ayant les propriétés souhaitées pour une application définie.

Le motif dissaccharidique constitutif du HA possède trois fonctions chimiques potentiellement modifiables : le groupement carboxylique du motif glucuronique, les fonctions alcool et, dans une moindre mesure, la fonction amide de la N-acétyl glucosamine (Figure II-8).

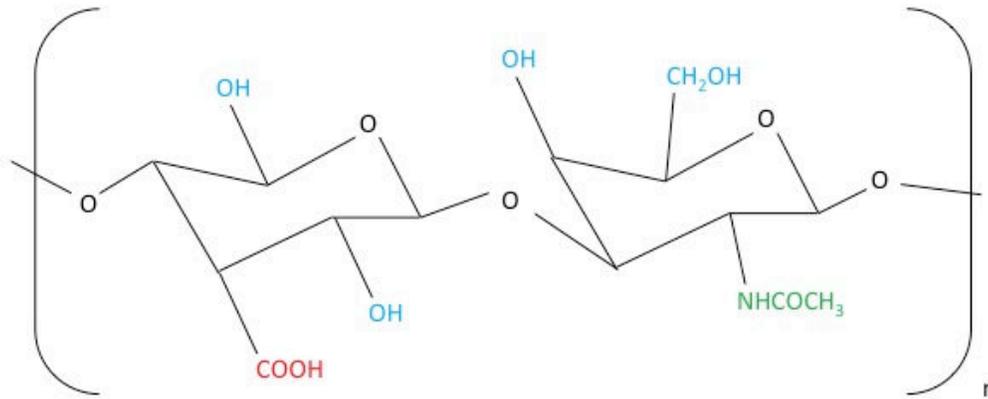


Figure II-8 : Schéma d'un motif disaccharidique du HA. Les groupements susceptibles de réagir sont colorés : en bleu les groupements hydroxyles, en vert le groupement acétamide et en rouge le groupement carboxylique.

Une modification du HA peut conférer à la molécule des propriétés physico-chimiques et/ou biologiques totalement différentes. Cependant, l'inconvénient majeur de ces modifications est qu'elles entraînent la dégradation du HA avec perte de masse molaire³¹ et des risques d'hydrolyse des chaînes en changeant le pH⁵⁷.

Il existe deux grands types de modifications (Figure II-9):

- La conjugaison qui lie le HA à une autre molécule par liaison covalente
- La réticulation qui consiste à former un pont entre plusieurs molécules de HA

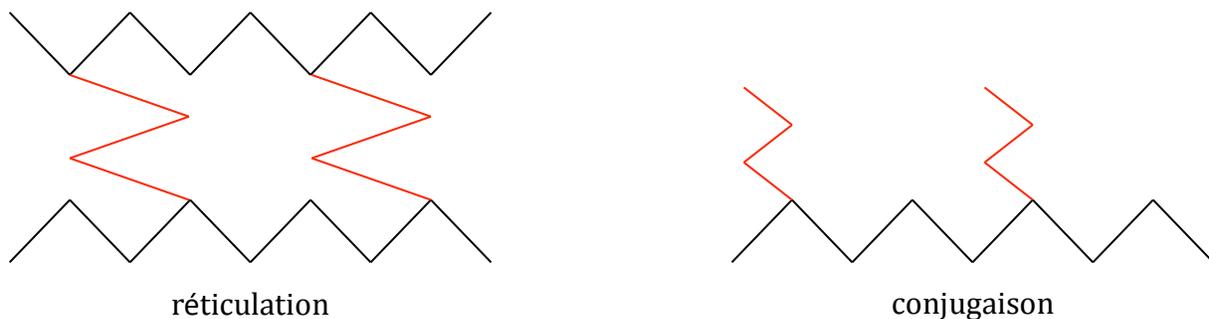


Figure II-9 : Schéma représentant les différentes modifications possibles. Les chaînes de HA sont représentées en noir et les molécules greffées en rouge.

1) Modification du motif amide

Il existe très peu de références concernant la modification du motif amide.

L'hydrazinolyse du groupement N-acétyl du HA conduit à des glucosamines libres utilisables pour d'autres réactions de couplage. Cependant, elle a lieu en général en milieu basique et à haute température (100 °C), ce qui entraîne dans le même temps une diminution drastique de la masse moléculaire par attaque du squelette^{58,59}.

Les rares réactions impliquant le motif amide consistent en une déacétylation du groupement afin d'obtenir un groupement amine, qui peut ensuite réagir avec un acide pour une réaction d'amidation⁶⁰. La déacétylation a lieu à 55 °C pendant environ une semaine avec ajout de sulfate d'hydrazine. Ces conditions induisent une diminution drastique de la masse molaire⁶⁰. Il a été montré que ces traitements (et d'autres dans des conditions plus douces) dégradent le HA par une β élimination du résidu glucuronique⁶¹.

2) Modification du groupement hydroxyle

Il existe de nombreuses références concernant la modification des fonctions alcool du HA :

- Éthérisation

L'éthérisation a été une des premières réactions menées sur le HA à être publiée puisque Laurent, Hellsing et Gelotte ont étudié, dès 1964, la formation d'éthers en utilisant des époxydes afin de réticuler le HA⁶¹.

La réaction consiste en général en l'ouverture de l'époxyde par attaque du groupement hydroxyle du HA⁶². Ces réactions ont lieu à pH très basique (en général supérieur ou égal à 13) afin de déprotoner les groupements hydroxyle et donc favoriser la réaction sur ceux-ci, plutôt que sur le carboxylate.

Un des composés les plus utilisés est le butanediol-diglycidyl ether (BBDE). Il permet de lier deux molécules de HA pour former en général des gels.

L'éthérisation a aussi été réalisée avec des divinylsulfones (DVS) et de l'éthylène sulfide. La synthèse d'hydrogels à partir de DVS se fait dans des conditions de pH similaires, mais à température ambiante et avec des temps de réaction réduits⁶³. Les hydrogels obtenus sont biocompatibles bien que la DVS soit toxique. Pour l'éthylène sulfide, le pH de la réaction est moins élevé⁶⁴.

- Estérification

L'estérification des groupements hydroxyle du HA est une réaction assez facile. De l'anhydride méthacrylique a ainsi été greffé sur du HA en milieu basique à froid afin de former des hydrogels⁶⁵. Des oligomères de PLA ont pu être greffés sur des polymères de HA dans le DMSO selon le même mécanisme⁶⁶.

- Hémiacétalisation

L'hémiacétalisation du HA pour former des hydrogels a été réalisée à l'aide de glutaraldéhyde. Cette réaction a lieu à pH acide qui permet l'activation de l'aldéhyde et catalyse la réaction. Cependant la liaison formée peut facilement être hydrolysée en milieu acide et ainsi libérer du GTA qui est toxique⁶³.

- Oxydation

L'oxydation des groupements hydroxyle du résidu D-glucuronique par du périodate de sodium entraîne la formation d'un dialdéhyde par ouverture du sucre sur lesquels Polarek *et coll.* ont ensuite greffé des peptides⁶¹.

La maîtrise des conditions opératoires lors de la modification des groupements hydroxyle est extrêmement importante car la réaction peut avoir lieu potentiellement sur quatre sites par unité disaccharidique.

3) Modification du groupement carboxyle

- Amidation

L'amidation du groupement carboxylique du HA est une réaction importante. Des travaux ont été publiés dès 1971 par Danishefsky et Siskovic⁶¹. Elle consiste à coupler une amine après activation de l'acide carboxylique du HA par de l'EDC (N-(3-diméthylaminopropyl)-N'-éthylcarbodiimide) ce qui permet de réaliser la synthèse dans l'eau et avec le HA sous sa forme de sel. Le contrôle du pH est essentiel pour limiter la formation de produits secondaires⁶⁷. L'emploi d'un biscarbodiimide permet de synthétiser des hydrogels de HA en s'affranchissant des produits secondaires⁶⁸.

- Estérification

Les réactions d'estérification du groupement carboxylique du HA ont été largement étudiées au sein du LCPM. Ces modifications s'inspirent directement des travaux de De La Valle *et coll.*⁶⁹ et consistent à faire réagir des composés alkylbromés^{31,70} ou des poly(éthylène glycol) fonctionnalisés par des groupements tosylate⁷¹ sur du HA sous forme de sel de tétrabutylammonium.

Contrairement aux modifications des groupements hydroxyle, il y a moins de précautions à prendre lors de la modification des carboxylates car il n'y en a qu'un par disaccharide. Les conditions de synthèse conduisent généralement à une répartition statistique des modifications le long de la chaîne de HA.

II. Synthèse des dérivés amphiphiles du HA : HAC6

Notre objectif était donc de synthétiser des dérivés du HA (HAC6) possédant des propriétés tensio-actives pour stabiliser une émulsion. *In fine* ces composés recouvriront des particules élaborées par la technique d'émulsion/évaporation de solvant organique.

Pour cela les dérivés du HA synthétisés doivent répondre à plusieurs critères :

- Ils doivent conserver au maximum leur structure primaire durant les différentes étapes de synthèse pour que la reconnaissance et l'interaction avec les récepteurs CD44 soient toujours possibles et efficaces.
- Ils doivent être suffisamment tensio-actifs pour pouvoir stabiliser les émulsions mais ne pas posséder des propriétés associatives qui les feraient s'associer entre eux et donc former des gels physiques.

Les nombreux travaux réalisés au LCPM concernant la modification de polymères et leur utilisation comme gels ou comme tensio-actifs nous ont permis de limiter notre champ d'étude à des HA estérifiés par des chaînes alkyle à six carbones. Ainsi, les composés obtenus permettent d'obtenir des solutions de faible viscosité. Les chaînes de HAC6 peuvent alors se positionner plus rapidement à l'interface eau/phase organique lors de l'émulsion. Ce temps de diffusion des molécules à l'interface est l'étape clé de la formulation des nanoparticules. Afin d'encapsuler des principes actifs hydrophiles, les particules sont préparées par double émulsion/évaporation de solvant. Comme nous le verrons dans le chapitre III de ce manuscrit, la deuxième émulsion doit être obtenue le plus vite possible pour ne pas déstabiliser la première et permettre d'encapsuler le maximum de principes actifs.

Notre stratégie de recherche était de préparer des lots de HAC6 selon les conditions déterminées lors des travaux précédents afin de se concentrer sur la formulation de particules encapsulant différentes molécules et d'évaluer leurs effets biologiques. Ainsi seuls les dérivés en C6 ont été étudiés. De la même manière, nous avons tenté de modifier environ 40 % des groupements carboxylate pour comparer nos résultats à ceux précédemment obtenus.

A. Protocole de synthèse des HAC6

Pour ces travaux, nous avons utilisé deux lots de hyaluronate de sodium (HANa) extraits de crêtes de coqs, de masse molaire différentes, afin d'étudier l'influence de celle-ci sur la stabilisation des émulsions et sur les interactions cellule/nanoparticules. Nous avons ainsi utilisé un HANa fourni par la société Bioiberica (Barcelone, Espagne) et un autre lot provenant de Acros (Geel, Belgique). Les masses molaires mesurées par SEC-MALLS lors de leur réception sont les suivantes :

Bioiberica: $M_n = 350\ 000\ \text{g/mol}$ $M_w = 410\ 000\ \text{g/mol}$

Acros: $M_n = 720\ 000\ \text{g/mol}$ $M_w = 745\ 000\ \text{g/mol}$

Pour déterminer ces masses molaires, les polysaccharides ont été solubilisés dans une solution aqueuse de NaNO_3 à 0,1 M. L'incrément d'indice de réfraction (dn/dc) du HANa employé est de 0,145.

Le protocole de synthèse des HAC6 (Figure II-10) est inspiré des brevets de Della Valle *et coll.*^{69,72,73} qui décrivent l'obtention de dérivés amphiphiles de HA et d'alginate par estérification des carboxylates par des chaînes alkyle halogénées en phase homogène (la réaction a lieu dans un solvant aprotique polaire tel que le DMSO ou le DMF). Le polysaccharide est préalablement modifié pour obtenir des groupements ammonium quaternaire hydrophobes comme contre-ions d'une partie des fonctions carboxyliques ; puis l'ajout d'un halogéno-alcane permet d'obtenir des composés estérifiés possédant des propriétés amphiphiles. Les conditions expérimentales sont données dans le chapitre V de ce manuscrit. Ce type de synthèse a fait l'objet de nombreux travaux au LCPM : principalement la synthèse d'esters de HA et d'alginate grâce à l'ajout de chaînes alkyle à douze ou dix huit carbones⁷⁴. Pour poursuivre des travaux antérieurs⁷⁰, nous avons utilisé ce protocole et greffé des chaînes alkyle composées de six atomes de carbone sur des HA.

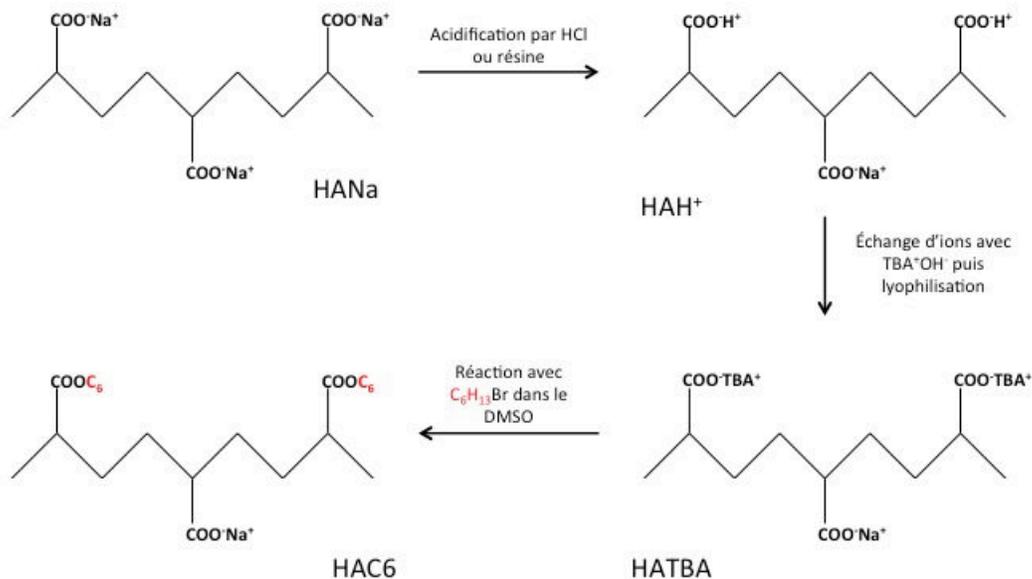


Figure II-10: Schéma réactionnel de la synthèse de HAC6 (seules les fonctions carboxyliques du HA sont montrées car elles sont les seules à réagir lors de cette synthèse).

- Mise au point et amélioration de la synthèse

Nous avons poursuivi les travaux développés par Laroui *et al.*⁷⁰. Grâce à la synthèse des dérivés du HA, il a ensuite pu les utiliser pour stabiliser des émulsions lors de la préparation de particules. Comme la synthèse entraîne une dégradation du squelette du HANa et donc une diminution de sa masse molaire, nous avons aussi utilisé un HANa de plus haute masse molaire afin de comparer les propriétés tensio-actives des dérivés HAC6 à taux de substitution équivalent.

Parallèlement, une méthode d'acidification plus douce a récemment été développée au LCPM : elle consiste en l'acidification du HA grâce à une résine échangeuse de cation.

- Nomenclature des composés obtenus

Nous avons adopté la nomenclature suivante afin d'identifier les différents HAC6 synthétisés :



Avec :

x désignant le lot de HANa utilisé pour la synthèse (« Bio » pour du HANa de chez Bioiberica et « A » pour celui de chez Acros).

y indiquant le taux de substitution en chaînes alkyle exprimé en moles de C₆ pour 100 moles de motifs disaccharidiques.

Le lot de HAC6 dont l'étape d'acidification s'est faite au moyen de la résine est noté : résHABioC6-xx%

B. Stabilité du squelette de HA au cours de la synthèse

- Rappel des résultats déjà obtenus au LCPM sur la dégradation du HA au cours de la synthèse

L'étape déterminante lors de la synthèse de dérivés amphiphiles du HA est l'étape d'acidification des groupements carboxylate. Comme décrit sur la figure II-10, le polymère était initialement acidifié en solution par HCl. Malheureusement cette étape n'est pas suffisamment sélective et entraîne une dégradation plus ou moins importante du squelette du polymère. Cette dégradation est d'autant plus marquée que la concentration en HCl et/ou le temps de réaction sont importants.

- Résultats obtenus au cours de ce travail

Le contrôle du bon déroulement de la synthèse passe par la détermination du taux d'acidification des molécules ainsi que les mesures des masses molaires ; plus précisément la perte en masse molaire du polysaccharide sera évaluée.

1) L'acidification du HANa (étape 1 de la figure II-10)

Afin d'essayer de limiter la dégradation des chaînes et d'avoir un lot le plus homogène possible, le HANa initial a préalablement été solubilisé dans un mélange eau/éthanol, refroidi au moyen d'un bain de glace avant d'ajouter l'HCl. Nous avons fixé la concentration en HCl à 0,06 mol.L⁻¹ et le temps de réaction à 15 minutes pour notre protocole de synthèse (voir chapitre V pour les détails expérimentaux). Les taux d'acidification obtenus pour chaque synthèse sont donnés dans le tableau II-2. La détermination du taux d'acidification s'est faite à l'aide d'un appareil de type Autotitrator 736 GP Titrino (Metrohm, Suisse). Pour cela, environ 10 mg de HAH⁺ sont mis en solution dans 12,5 mL d'eau MilliQ puis la

titration a lieu par ajout de NaOH (1 M). La détermination du point équivalent permet alors de connaître la part des carboxyles du HA qui ont été acidifiées.

type de HA utilisé		taux d'acidification
	synthèse 1	57 %
Bioiberica	synthèse 2	59 %
	synthèse 3	56 %
	synthèse 4 (résine)	84 %
Acros	synthèse 1	55 %

Tableau II-2 : Taux d'acidification du HA selon les différentes synthèses.

Comme on peut le voir dans le tableau II-2, l'acidification du HANA par réaction avec HCl a conduit à des taux d'acidification compris entre 55 et 60 %, indépendamment de la masse molaire initiale du polymère. Bien que cette acidification ait eu lieu dans un bain de glace, ces taux correspondent aux résultats précédemment obtenus au laboratoire⁷⁴. Il est difficile par cette méthode d'obtenir des taux d'acidification plus élevés car si l'on augmente le temps de réaction ou la quantité de HCl ajoutée, cela entraîne une dégradation trop importante du polysaccharide.

L'utilisation de la résine DOWEX 50WX8-400, en revanche, augmente considérablement le taux d'acidification avec plus de 80% des fonctions carboxylate acidifiées.

2) Suivi des masses molaires pendant l'acidification

La détermination des masses molaires des polymères s'effectue essentiellement par chromatographie d'exclusion stérique (SEC). Dans le cas des polysaccharides elle se fait surtout en éluant aqueux. D'autres méthodes peuvent également être envisagées tel que l'électrophorèse capillaire pour la caractérisation d'oligomères de HA.

Au sein du LCPM, la mesure des masses molaires se fait par chromatographie d'exclusion stérique couplée à un détecteur à diffusion de la lumière (MALLS). Le MALLS présente l'avantage de ne pas nécessiter d'étalonnage préalable des colonnes.

Grâce à cette technique, il nous a été possible de déterminer pour chaque lot les masses molaires moyennes du HA natif ainsi que du HA-TBA. Après l'obtention du HA-TBA, celui-ci est reconverti sous forme HANa pour pouvoir être analysé en SEC-MALLS et comparer les valeurs déterminés à celles du HANa initial correspondant. Il n'est malheureusement pas possible de caractériser les HAC6 obtenus en terme de masse molaire car leurs propriétés amphiphiles vont fausser les temps de rétention : s'ils sont injectés en l'état dans la colonne ils vont s'y adsorber. De la même façon, on ne peut pas envisager d'hydrolyser la liaison ester sans risquer de dégrader au moins en partie le squelette de HA et donc de minimiser la taille des composés.

Les valeurs des masses molaires déterminées lors de chaque synthèse pour le HANa et le HATBA (reconverti en HANa) sont présentées dans le tableau II-3 :

HANa	HANa natif		HATBA	HATBA reconverti en HANa		% perte en masse molaire	
	Mn	Mw		Mn	Mw	Mn	Mw
Bioiberica	350,000	410,000	Synthèse 1	195,000	255,000	44.29 %	37.80 %
	350,000	410,000	Synthèse 2	315,000	380,000	10.00 %	7.32 %
	245,000	320,000	Synthèse 3	170,000	220,000	30.61 %	31.25 %
	135,000	215,000	Synthèse 4 (résine)	110,000	160,000	18.52 %	25.58 %
Acros	720,000	745,000	Synthèse 1	285,000	340,000	60.42 %	54.36 %

Tableau II-3 : Evolution des masses molaires moyennes du HA avant et après avoir subi le protocole de synthèse (Figure II-10).

Les résultats obtenus nous donnent plusieurs informations sur le polysaccharide et la synthèse de ses dérivés :

- On constate tout d'abord que le HANa provenant de chez Bioiberica n'est pas un produit stable dans le temps. Le même lot de HANa a été utilisé pour préparer les différentes synthèses (synthèses 1 à 4 dans le tableau II-3) et l'on observe une diminution de la masse molaire de 61,5 % et 47,5 %, respectivement pour Mn et Mw au fil de cette thèse. Aussi, et bien que le produit de départ soit conservé à l'abri de la lumière et à -18 °C, une analyse SEC-MALLS du produit

de départ est effectuée avant chaque synthèse. Le suivi d'une éventuelle diminution de la masse molaire du HANa provenant de la société Acros n'a pas été effectué car la totalité du produit a été utilisée pour la synthèse. Toutefois, on peut logiquement penser qu'il se dégrade aussi au cours du temps.

- La modification du HANa (acidification puis transformation en HATBA) entraîne une diminution de la masse molaire (comparaison des masses molaires entre le HANa natif et le HA-TBA reconverti en HANa). Cette diminution est prévisible et a déjà été expliquée précédemment³¹. Néanmoins cette perte de masse molaire n'est pas la même selon les synthèses et ne semble pas suivre un schéma particulier.

La perte de masse du HA provenant de chez Acros lors de la synthèse est de plus de 50 %, bien plus que pour le HA de plus faible masse molaire provenant de Bioibérica (perte de 45 %). Il est difficile d'émettre des hypothèses pour ce lot car une seule synthèse a été réalisée avec du HANa de haute masse molaire. La seule différence au niveau du protocole par rapport aux autres synthèses est que ce HANa Acros a été préalablement complètement solubilisé dans de l'eau avant d'ajouter l'éthanol lors de l'étape d'acidification.

Le HANa acidifié au moyen de la résine est moins dégradé que les autres HA provenant du même lot de départ.

3) Conclusions sur la stabilité du polymère lors de l'acidification

Le HANa est une molécule sensible et délicate à manipuler. Il se dégrade lentement au cours du temps malgré une conservation au sec et à l'abri de la lumière.

De plus, le protocole de synthèse que nous avons suivi induit aussi une diminution de la masse molaire du polymère. L'étape d'acidification dégrade le polysaccharide, c'est pourquoi un contrôle des paramètres de cette étape est indispensable et notamment le temps de réaction. Celui-ci a été fixé à 15 minutes pour assurer un taux d'acidification suffisant et limiter la dégradation du HA. La lyophilisation peut aussi jouer un rôle au niveau de la dégradation du HA : celle-ci entraîne une surconcentration de la solution au fur et à mesure de la sublimation de l'eau. Dès lors, s'il reste des ions H^+ ou OH^- présents dans la solution aqueuse à l'issue de l'étape de neutralisation du HA en HATBA, ceux-ci vont former des microdomaines acides ou basiques susceptibles de dégrader le polymère⁷⁵. Cette étape peut avoir plus d'impact sur la dégradation du HA car elle dure plusieurs heures contre seulement 15 minutes pour l'acidification.

Concernant l'acidification, si la méthode classique est bien maîtrisée au laboratoire et entraîne une acidification jusqu'à 60 % des groupements carboxylate, l'acidification par la résine permet d'augmenter ce taux à plus de 80 % et de limiter la perte en masse molaire du polysaccharide. D'une manière générale, on ne peut pas lier taux d'acidification et perte en masse.

4) Etude par RMN¹H de la pureté des polymères obtenus et détermination de leur taux de substitution

Lors des études précédentes sur des dérivés du HA estérifiés par de longues chaînes carbonées (C12 et C18), la détermination du taux de substitution était réalisée par chromatographie en phase gazeuse (CPG). Dans ce cas, l'analyse était faite après hydrolyse des fonctions ester par la soude puis les alcools obtenus étaient extraits par du toluène puis dosés par rapport à une référence interne après avoir effectué une droite de calibration.

Cette technique fonctionne très bien pour les longues chaînes aliphatiques car plus le nombre d'atomes de carbone est élevé, plus le composé est hydrophobe et donc il est facile de récupérer la totalité des alcools formés par extraction par le toluène. L'analyse par CPG est donc simple et rapide à mettre en œuvre pour une grande précision. Par contre, dans le cas de petites chaînes carbonées et plus précisément pour les chaînes en C6, il existe un coefficient de partage non négligeable entre l'eau et le toluène (que nous avons déterminé expérimentalement à 0,6). Dès lors, la détermination des taux de substitution par CPG devenait aléatoire.

L'analyse des taux de substitution par RMN quant à elle n'était jusqu'ici pas utilisée du fait du comportement en solution des dérivés de HA. Les protons de ces molécules possèdent des temps de relaxation longs et hétérogènes et on obtient des spectres avec des massifs élargis et des signaux qui se superposent^{76,77}. Dans le cas des HAC6 nous avons donc développé une méthode de détermination simple et précise par RMN ¹H. Lorsque les chaînes carbonées sont liées au polymère, il est impossible de les doser correctement car les temps de relaxation sont longs. Mais si elles sont libres en solution, les signaux correspondant à leurs protons sont bien résolus (pas d'interférence avec les signaux des protons du polymère). Nous avons donc adapté le protocole d'hydrolyse et utilisé de la soude deutérée (NaOD) à la place de la soude. Par RMN ¹H, on peut déterminer le taux de substitution et, dans le même temps, la pureté des produits obtenus.

L'analyse par RMN ¹H des HAC6 obtenus nous permet de vérifier après la synthèse s'il reste des traces de solvant (DMSO, acétone) et aussi de savoir si tous les ions TBA ont été échangés.

Le spectre RMN ^1H d'un HA présente des massifs caractéristiques (Figure II-11) :

- Un massif non résolu entre 3,15 ppm et 4,4 ppm regroupant les protons du squelette saccharidique.
- Un pic à 1,78 ppm correspondant au proton du groupement amide de la N-acétyl glucosamine.

Cette analyse rapide nous permet de s'assurer que les solvants intervenus lors de la synthèse sont absents. Pour que le HAC6 soit considéré comme pur, le spectre RMN ^1H ne doit pas posséder de pic à 3,1 ppm correspondant aux ions TBA^+ , ni de pics à 2,7 et 1,9 ppm caractéristiques du DMSO et de l'acétone, respectivement.

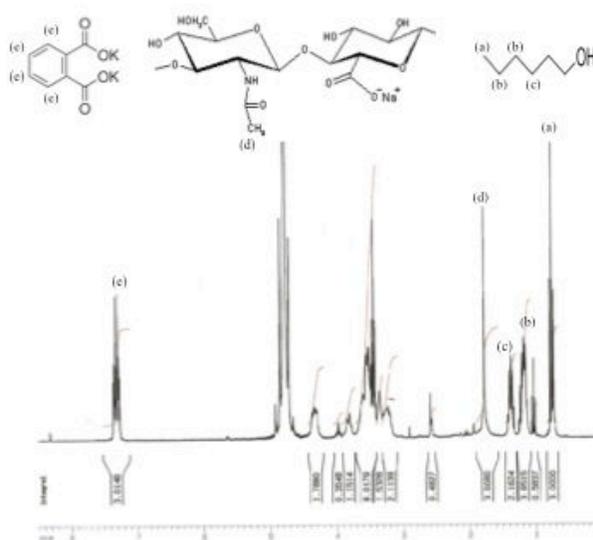


Figure II-11 : Spectre RMN ^1H d'un hyaluronate modifié par des chaînes alkyle (C6) (HABioC6-17% concentration de 20 mg.mL^{-1} dans D_2O), avec (a) (b) et (c) les signaux des protons de l'éthanol, (d) celui des protons du méthyl du groupement acétamide et (e) les signaux des protons du phtalate de potassium. Le massif entre 3 et 5 ppm correspond aux signaux des protons du squelette de HA.

La quantité d'hexanol libérée lors de l'hydrolyse de la liaison ester est mesurée par rapport à une référence interne de phtalate de potassium dissout dans la solution de soude deutérée. Pour chaque synthèse, on désirait modifier 40 % des fonctions carboxylique totales (COOTBA + COONa) or on sait que seulement environ 65 % de ces fonctions sont réellement sous forme COOTBA et donc susceptibles d'être estérifiées.

Le taux de substitution (τ) est estimé à partir du spectre RMN ^1H par la relation :

$$\tau = \frac{\left[\frac{A(\text{C6})}{11}\right] / \left[\frac{A(\text{ph})}{4}\right]}{\left[\frac{A(\text{C6})}{11}\right] + \left[\frac{m(\text{HANa})}{M(\text{HANa})}\right]} * 100 \text{ (voir chapitre V)}$$

Les taux de substitution obtenus pour les différents lots de polymère synthétisés sont donnés dans le tableau II-4 :

type de HA utilisé		taux d'acidification	taux de substitution en C6	nomenclature
	synthèse 1	57 %	17 %	HABioC6-17%
Bioiberica	synthèse 2	59 %	31 %	HABioC6-31%
	synthèse 3	56 %	24 %	HABioC6-24%
	synthèse 4 (résine)	84 %	21 %	résHABioC6-21%
Acros	synthèse 1	55 %	19 %	HAAC6-19%

Tableau II-4: Comparatif entre le taux de substitution visé 40 % et le taux de substitution réel obtenu pour chaque synthèse réalisée. Le taux de substitution en C6 correspond au nombre de chaînes C6 pour 100 unités disaccharidiques.

Les résultats nous montrent que les taux de substitution obtenus sont plus faibles que l'objectif visé (qui était de 40 %) pour chaque synthèse acidifiée de manière classique.

On peut également constater pour les synthèses réalisées avec du HA de chez Bioiberica et acidifié par HCl que le taux de substitution varie fortement, du simple au double. Cette variation est peut être liée à la diminution de la masse molaire car plus le squelette est dégradé, plus le taux de substitution est faible.

5) Conclusion sur la synthèse des HAC6

La synthèse de dérivés amphiphiles de HA, molécule essentielle pour la suite de nos travaux est rendue difficile par une succession de facteurs.

Le HANA natif est un mélange de molécules de différentes masses molaires qui se dégradent lentement au cours du temps.

Si les taux d'acidification obtenus sont relativement identiques par « acidification classique », on peut les augmenter en utilisant une résine échangeuse de cations (60 % vs 80 %) en minimisant la perte de masse.

Le protocole de synthèse des HAC6 par acidification avec HCl entraîne une dégradation importante du polymère qui n'est toutefois pas liée au taux d'acidification. Cette dégradation semble difficilement maîtrisable et influence le taux d'estérification.

C. Propriétés physico-chimiques en solution aqueuse des HAC6

La caractérisation en terme de pouvoir tensio-actif des HAC6 a été effectuée par tensiométrie superficielle et interfaciale.

1) Principe de mesure

Lorsque deux liquides non miscibles sont en contact, l'interface entre les deux liquides tend à avoir la surface la plus petite possible afin de diminuer l'énergie du système. Il est possible de diminuer la tension à l'interface en ajoutant des tensio-actifs au système. Si l'on ajoute du tensio-actif dans un mélange contenant une phase aqueuse et une phase huileuse non miscibles, celui-ci va se placer à l'interface entre les liquides. La tension à l'interface va diminuer de manière exponentielle au fur et à mesure que la concentration en tensio-actifs augmente jusqu'à tendre vers un minimum lorsque l'interface est saturée en tensio-actifs. On a alors atteint la concentration critique micellaire (CMC) ou concentration d'agrégation critique dans le cas de copolymères amphiphiles. Si la concentration en tensio-actifs est supérieure à la CMC, ils vont s'associer sous forme de micelles au sein de la phase dans laquelle ils sont le plus solubles et la tension à l'interface ne diminue plus. La diminution de la tension interfaciale en fonction de la concentration en tensio-actif est schématisée par la figure II-12.

Lorsque le tensio-actif utilisé est un polymère qui possède plusieurs groupements susceptibles de diminuer la tension interfaciale, chacun des groupes, une fois localisé à l'interface, va influencer le comportement des groupements adjacents sur la molécule. En d'autres termes, la cinétique

d'adsorption/désorption d'un groupement d'un polymère amphiphile va être influencée par l'adsorption ou non d'autres groupements de cette molécule. Ainsi l'adsorption de ce groupement est favorisée au détriment de la désorption s'il y a déjà plusieurs points d'ancrage de la molécule à l'interface. La désorption sera d'autant plus difficile que le polymère amphiphile est rigide.

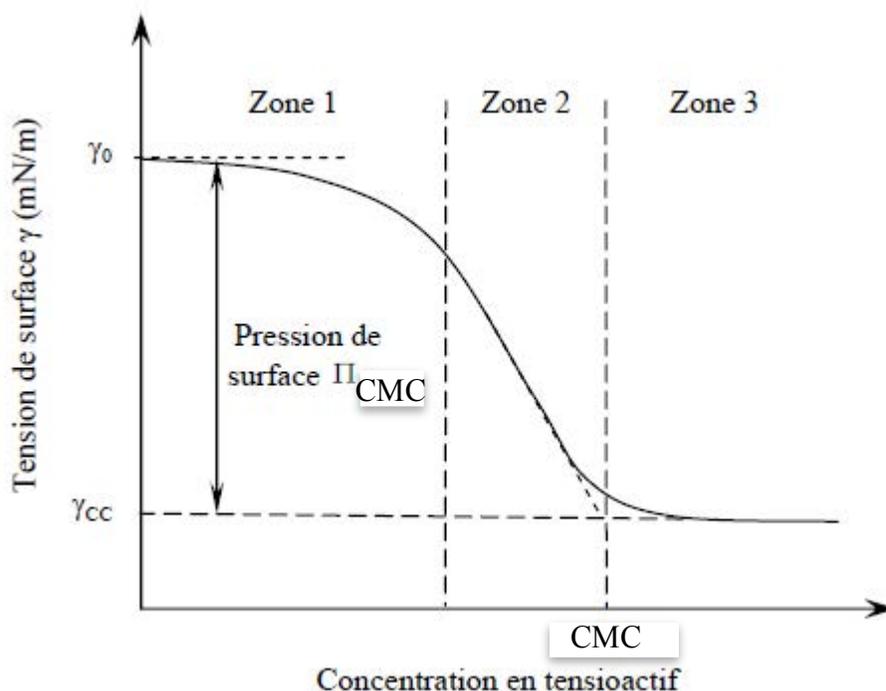


Figure II-12 : Schéma représentant l'évolution de la tension interfaciale d'un système composé de 2 phases non miscibles en fonction de la concentration en tensio-actif. La zone 1 correspond à des concentrations faibles en tensio-actif, les molécules sont dispersées à l'interface. Dans la zone 2, les tensio-actifs sont de plus en plus nombreux à l'interface et on arrive à la CMC en fin de zone 2 c'est-à-dire que les tensio-actifs saturent l'interface.

Enfin la zone 3, au-delà de la CMC, la tension interfaciale ne diminue plus malgré l'ajout de tensio-actifs.

La suite de nos travaux concerne l'utilisation des HAC6 synthétisés préalablement comme tensio-actifs. La présence des chaînes alkyle sur le HA confère aux dérivés HAC6 obtenus des propriétés tensio-actives qui vont leur permettre de s'adsorber rapidement à l'interface eau/dichlorométhane. Nous nous sommes tournés vers la méthode de l'anneau de Nouÿ afin de déterminer le pouvoir tensio-actif de nos composés (Figure II-13).

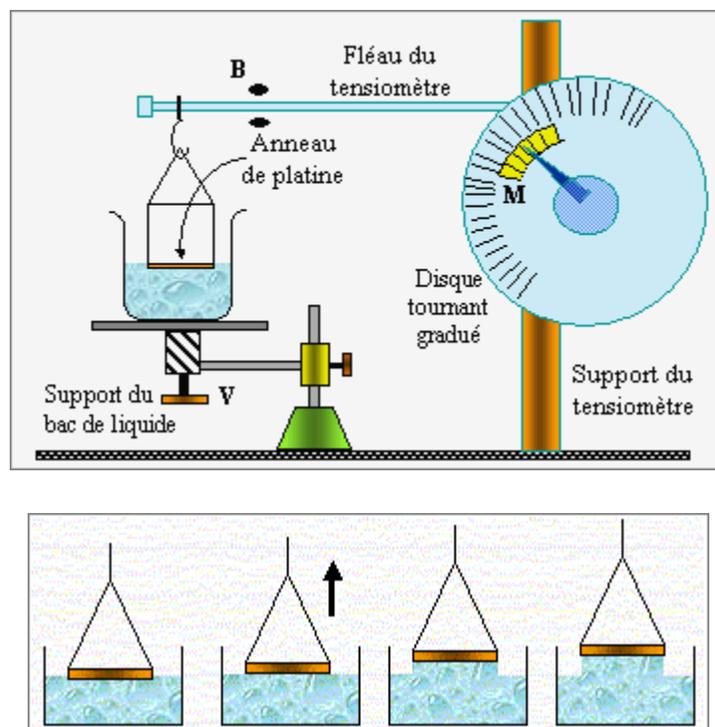


Figure II-13 : Principe de mesure de la tension interfaciale au moyen d'un tensiomètre utilisant la méthode de l'anneau de Noüy⁷⁸.

Cette méthode consiste à mesurer la force de traction s'exerçant sur un anneau plongeant dans le liquide. Les forces s'exerçant sur l'anneau étant les forces de gravité et superficielle, il est possible de relier la tension interfaciale à cette force de traction.

2) Résultats

Ces analyses nous permettent de comparer les produits obtenus en fonction de leur différents taux de substitution et nous renseignent sur la capacité du HAC6 à stabiliser l'interface créée entre l'eau et le dichlorométhane lors de la formulation d'émulsions. Les différents lots de HAC6 préparés ont été caractérisés en termes de propriétés tensio-actives. Leur capacité à s'adsorber à l'interface entre deux phases afin de diminuer l'énergie nécessaire à son maintien a ainsi été estimée.

Pour des raisons de facilité de mise en œuvre et afin d'optimiser la reproductibilité des expériences, les mesures de tension interfaciale et superficielle ont été réalisées à 25 °C. L'appareil utilisé pour déterminer les tensions superficielle et interfaciale n'est pas équipé d'un bain thermostaté permettant de refroidir l'enceinte de mesure, il n'est donc pas possible de travailler à 4 °C, température à laquelle l'étape de sonication est menée dans le cadre du procédé d'élaboration des nanoparticules par

émulsion/évaporation. Les mesures de tension superficielle et interfaciale pour les différents HANa et HAC6 ont été réalisées sur une gamme de concentration allant de 0,01 à 5 g/L.

3) Tension superficielle

Le graphe présenté dans la figure II-14 montre l'évolution de la tension superficielle des solutions de HAC6 et de HANa dans l'eau en fonction de la concentration en polymère.

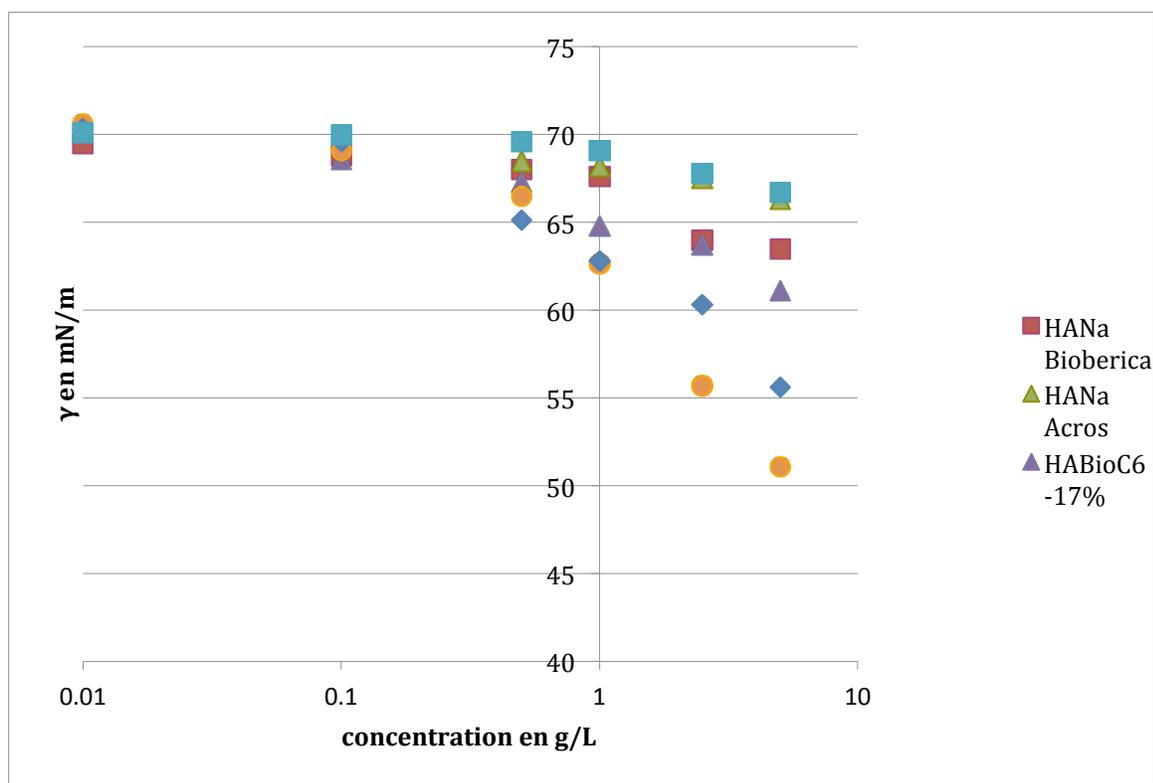


Figure II-14 : Evolution de la tension superficielle (γ) en fonction de la concentration en HAC6 ou HANa dans l'eau à 25 °C.

D'après les résultats obtenus, l'abaissement de la tension superficielle est faible jusqu'à 0,5 g/L de polymère en solution. En dessous de 0,5 g/L, la valeur de la tension superficielle est très proche de la valeur du système eau/air : 72 mN/m.

Au-delà de 0,5 g/L, la différence est plus marquée et on peut observer trois types de comportements à 5 g/L:

- Les HANa Acros et HAAC6-19% abaissent la tension seulement jusqu'à 66 mN/m.
- les HANa Bio et HABioC6-17% abaissent la tension superficielle à 63,5 et 61,1 mN/m respectivement.
- Les solutions de HABioC6-24% et HABioC6-31% abaissent la tension superficielle à 51,1 et 55,6 mN/m.

De manière générale, les différents composés n'abaissent que peu la tension superficielle. Ceci s'explique par le fait que le squelette de HA est principalement hydrophile et que les segments hydrophobes de C6 n'ont pas une affinité suffisante avec l'air pour diminuer les forces s'exerçant à la surface. Toutefois, on peut noter que les HAC6 les plus substitués (24 et 31 %) possèdent des propriétés tensio-actives plus marquées que les autres. La masse molaire des composés semble jouer un rôle sur l'abaissement de la tension superficielle. En effet, à partir de 0,5 g/L et à taux de substitution comparable, le HABioC6-17% possède des propriétés tensio-actives plus marquées que le HAAC6-19%. Une masse molaire trop importante du polymère tend à diminuer les propriétés tensio-actives. Le même comportement est observé pour les HANa bien que l'explication concernant leurs propriétés tensio-actives, même faibles, soit plus délicate en raison de l'absence du caractère amphiphile de ces molécules. Nous n'avons pas trouvé d'étude publiée expliquant ce phénomène.

4) Tensiométrie interfaciale

Le graphe de la figure II-15 montre l'évolution de la tension interfaciale du système eau/dichlorométhane en fonction de la concentration en polymère dans la phase aqueuse.

On constate que les HANa ainsi que le HABioC6-17% ne possèdent pratiquement pas de propriétés tensio-actives puisque même à 5 g/L la valeur de la tension à l'interface n'est que de 24 et 24,5 mN/m pour les HANa Bioiberica et Acros respectivement et de 23 mN/m pour le HABioC6-17%. On pourra cependant constater que le HABioC6-17% peut quand même être utilisé comme stabilisant d'émulsions (cf chapitre III).

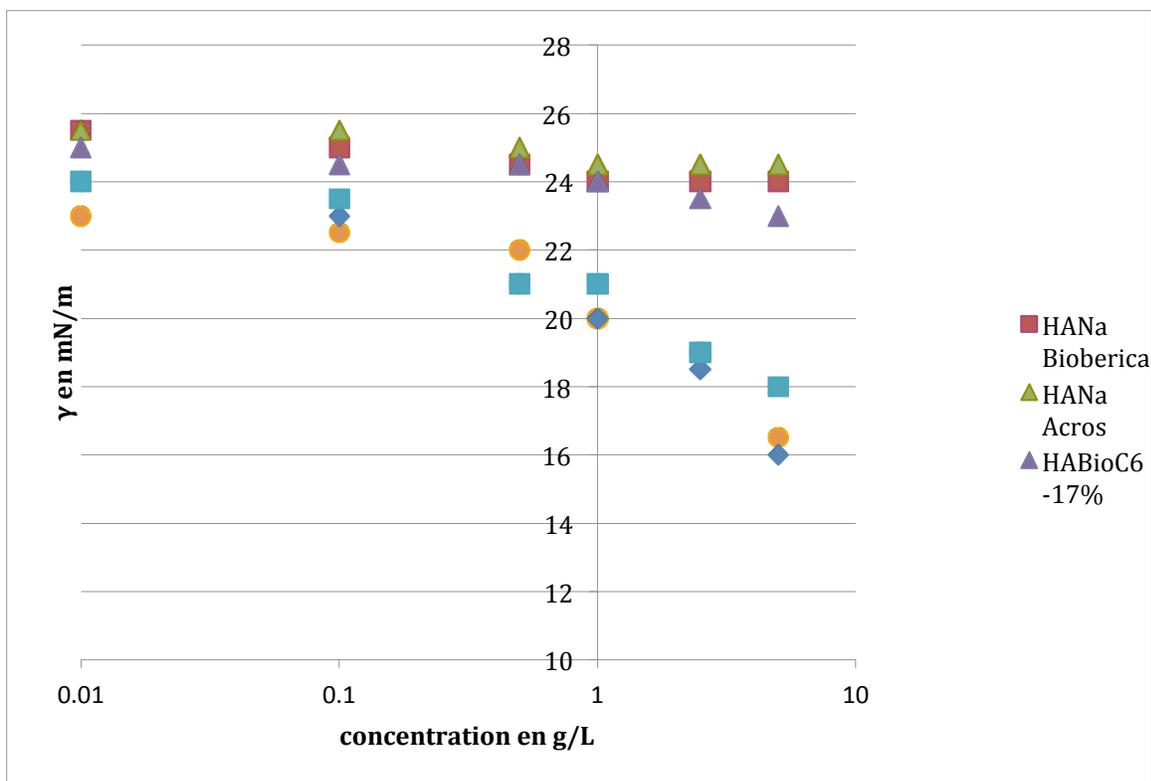


Figure II-15 : Evolution de la tension interfaciale (γ) du système (eau + polymère)/dichlorométhane en fonction de la concentration en HAC6 ou HANa dans l'eau à 25°C.

Les autres lots (5 g/L) permettent d'abaisser la tension interfaciale à 18 ; 16,5 et 16 mN/m respectivement pour le HAAC6-19%, le HABioC6-24% et le HABioC6-31%.

L'abaissement de la tension interfaciale, contrairement à la tension superficielle, est visible dès les faibles concentrations pour les HAC6. Mis à part le lot HABioC6-17%, les HAC6 possèdent des propriétés tensio-actives marquées par rapport aux HANa ; plus le taux de substitution est élevé, plus l'abaissement de la tension est important. Contrairement au cas de la tension superficielle, on n'observe pas de lien entre l'abaissement de la tension interfaciale du système et la masse molaire du polymère. Cette diminution de la tension interfaciale pour les HAC6 est plus marquée que la diminution de la tension superficielle. Ceci s'explique par l'affinité plus forte des groupements hexyle pour le dichlorométhane que pour l'air. Dans ce cas, le dérivé HAC6 va se positionner plus facilement à l'interface.

5) Conclusion sur les propriétés tensio-actives des HAC6

Les dérivés hydrophobisés du HA présentent des propriétés tensio-actives comparées aux HANa mais ces propriétés restent peu marquées si l'on considère d'autres molécules. Par exemple le SPANTM80 abaisse la tension interfaciale du système eau/dichlorométhane à 5 mN/m dès 1 g/L. Des dextrans modifiés (DexC10₁₆₄), synthétisés au LCPM, possèdent même des propriétés tensio-actives meilleures que le SPANTM80⁷⁹.

Ces faibles propriétés tensio-actives du HAC6 sont dues à la structure extrêmement rigide du polysaccharide, celle-ci limite sa déformation et l'empêche d'épouser les déformations pouvant apparaître à l'interface. En effet, la longueur de persistance pour le HA (distance pendant laquelle une chaîne de polymère suit la même direction) a été déterminée à 400 Å en solution à faible force ionique comparativement à 26 Å pour le dextrane⁸⁰. On comprend donc facilement que malgré la perte de masse consécutive au procédé de synthèse employé, les HAC6 restent des molécules relativement rigides et donc que leur adsorption à l'interface eau/air ou eau/dichlorométhane est faible.

Conclusions du chapitre

Ce chapitre nous a permis de comprendre l'importance du HA dans le corps humain et son implication dans de nombreux mécanismes biologiques. C'est pour cette raison que nous avons décidé de recouvrir des nanoparticules par des dérivés amphiphiles de HA, pour favoriser la reconnaissance de ces vecteurs au sein de l'articulation par les chondrocytes et ainsi permettre une libération des principes actifs encapsulés dans ces particules au voisinage de ces cellules.

Nous avons présenté les résultats de nos synthèses visant à conférer des propriétés tensio-actives au HA natif. Le taux de modification a volontairement été limité pour éviter la formation d'hydrogels en solution aqueuse. Ainsi nous nous sommes basés sur les travaux publiés précédemment au laboratoire et nous avons limité notre étude aux HA estérifiés par des groupements hexyle (C6) avec un taux de substitution visé inférieur à 40 % par motif disaccharidique.

Les conditions opératoires ont limité la synthèse de chaque lot de HAC6 à 10 grammes et nous ont obligé à préparer plusieurs lots. Ceci nous a permis de mettre en évidence une diminution de la masse molaire du HA natif au cours du temps et donc un manque de reproductibilité des synthèses. Parallèlement une méthode de détermination simple et fiable du taux de substitution par RMN ^1H a pu être développée.

Les études de tensiométrie des dérivés amphiphiles de HA synthétisés ont mis en évidence de faibles propriétés amphiphiles. Le polysaccharide est extrêmement rigide et donc son adsorption spontanée à une interface n'est pas favorisée. Néanmoins nous avons pu utiliser les différents lots de HAC6 lors de la formulation de particules de PLA et de PLGA selon la méthode de double émulsion/évaporation de solvant ; ceci sera décrit dans le chapitre suivant.

Le point le plus important qu'il conviendra d'améliorer est le procédé d'extraction du HA natif de façon à obtenir des lots de polymère moins polymoléculaires. On peut de cette façon envisager que la synthèse des HAC6 sera plus reproductible.

Le nouveau protocole de synthèse des dérivés amphiphiles de HA, c'est-à-dire l'acidification du polymère par une résine échangeuse de cations, semble une bonne alternative à l'acidification « classique », principalement parce qu'il limite fortement la dégradation du squelette du HA.

Enfin, la synthèse de HA hydrophobisé dont les propriétés amphiphiles sont légèrement plus marquées (par exemple en greffant des chaînes octyle sur le HA) doit être explorée, car ceci devrait favoriser l'adsorption du HA modifié à la surface des particules polymères. Toutefois, il faut espérer que nous ne soyons pas limités en terme de solubilité en phase aqueuse de ces nouveaux composés.

Références Bibliographiques

1. Meyer, K. & Palmer, J. W. The Polysaccharide of the Vitreous Humor. *J. Biol. Chem.* **107**, 629–634 (1934).
2. Meyer, K. The Biological Significance of Hyaluronic Acid and Hyaluronidase. *Physiol Rev* **27**, 335–359 (1947).
3. Scott, J. E., Thomlinson, A. M. & Prehm, P. Supramolecular organization in streptococcal pericellular capsules is based on hyaluronan tertiary structures. *Exp. Cell Res.* **285**, 1–8 (2003).
4. Fraser, J. R., Laurent, T. C. & Laurent, U. B. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J. Intern. Med.* **242**, 27–33 (1997).
5. Laurent, T. C. & Fraser, J. R. Hyaluronan. *FASEB J.* **6**, 2397–2404 (1992).
6. RAPPORT, M. M., LINKER, A. & MEYER, K. The hydrolysis of hyaluronic acid by pneumococcal hyaluronidase. *J. Biol. Chem.* **192**, 283–291 (1951).
7. Prehm, P. Hyaluronate is synthesized at plasma membranes. *Biochem. J.* **220**, 597–600 (1984).
8. Laurent, T. C. *The chemistry, biology and medical applications of hyaluronan and its derivatives.* (Portland Press: 1998).
9. Scott, J. E., Cummings, C., Brass, A. & Chen, Y. Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solution, investigated by rotary shadowing-electron microscopy and computer simulation. Hyaluronan is a very efficient network-forming polymer. *Biochem. J.* **274 (Pt 3)**, 699–705 (1991).
10. Hargittai, I. & Hargittai, M. Molecular structure of hyaluronan: an introduction. *Structural Chemistry* **19**, 697–717 (2008).
11. <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA02/HA02E.html>.
12. Brown, M. B. & Jones, S. A. Hyaluronic acid: a unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin. *J Eur Acad Dermatol Venereol* **19**, 308–318 (2005).
13. Hardingham, T. Chapter 1 - Solution Properties of Hyaluronan. *Chemistry and Biology of Hyaluronan* 1–19 (2004). Edition Elsevier Science (ISBN 978-0080443829)
14. Mikelsaar, R. H. & Scott, J. E. Molecular modelling of secondary and tertiary structures of hyaluronan, compared with electron microscopy and NMR data. Possible sheets and tubular structures in aqueous solution. *Glycoconj. J.* **11**, 65–71 (1994).
15. Roue, I., Rinaudo, M., Milas, M. & Frollini, E. Viscometric behaviour of polyelectrolytes in the presence of low salt concentration. *Polymer* **39**, 5441–5445 (1998).
16. Rinaudo, M., Milas, M., Jouon, N. & Borsali, R. On some original properties of dilute polyelectrolyte solutions at low salt content : sodium hyaluronate example. *Polymer* **34**, 3710–3715 (1993)
17. Ghosh, S., Li, X., Reed, C. E. & Reed, W. F. Apparent persistence lengths and diffusion behavior of high molecular weight hyaluronate. *Biopolymers* **30**, 1101–1112 (1990).
18. Necas, J., Bartosikova, L., Brauner, P. & Kolar, J. Hyaluronic acid (hyaluronane): a review. *Veterinarni Medicina* **53**, 397–411 (2008)
19. Leach, J. B. & Schmidt, C. E. HYALURONAN, *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*, 1421 (2008). Edition Informa healthcare (ISBN 978-1420078022)
20. Balazs, E. A. Chapter 20 - Viscoelastic Properties of Hyaluronan and Its Therapeutic Use. *Chemistry and Biology of Hyaluronan* 415–455 (2004). Edition Elsevier Science (ISBN 978-0080443829)
21. Bajaj, G., Kim, M. R., Mohammed, S. I. & Yeo, Y. Hyaluronic acid-based hydrogel for regional delivery of paclitaxel to intraperitoneal tumors. *J Control Release* **158**, 386–392 (2012).
22. Segura, T. *Engineering Substrate-mediated Gene Delivery: A Novel DNA Delivery Strategy.* (Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy, Northwestern University: 2004).

23. Jin, Y.-J., Ubonvan, T. & Kim, D.-D. Hyaluronic Acid in Drug Delivery Systems. *Journal of Pharmaceutical Investigation* **40**, 33–43 (2010).
24. Hazlett, W. D., Meyer, L. R., Nasta, T. E., Mangan, P. A. & Karande, V. C. Impact of EmbryoGlue as the embryo transfer medium. *Fertil. Steril.* **90**, 214–216 (2008).
25. Weigel, P. H. Chapter 25 - The Hyaluronan Synthases. *Chemistry and Biology of Hyaluronan* 553–567 (2004). Edition Elsevier Science (ISBN 978-0080443829)
26. DeAngelis, P. L. Hyaluronan synthases: fascinating glycosyltransferases from vertebrates, bacterial pathogens, and algal viruses. *Cellular and Molecular Life Sciences* **56**, 670–682 (1999).
27. *Regulation of Hyaluronan Biosynthesis*. (2002) Edition Uppsala University Press (ISBN 9789155453039)
28. Moffatt, P. *et al.* Hyaluronan production by means of Has2 gene expression in chondrocytes is essential for long bone development. *Developmental Dynamics* **240**, 404–412 (2011).
29. Izawa, N., Serata, M., Sone, T., Omasa, T. & Ohtake, H. Hyaluronic acid production by recombinant *Streptococcus thermophilus*. *J. Biosci. Bioeng.* **111**, 665–670 (2011).
30. Toole, B. P. Hyaluronan in morphogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* **12**, 79–87 (2001).
31. Pelletier, S., Hubert, P., Lapique, F., Payan, E. & Dellacherie, E. Amphiphilic derivatives of sodium alginate and hyaluronate: synthesis and physico-chemical properties of aqueous dilute solutions. *Carbohydrate polymers* **43**, 343–349 (2000)
32. Stern, R. Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway. *European Journal of Cell Biology* **83**, 317–325 (2004).
33. El-Safory, N. S., Fazary, A. E. & Lee, C. K. Hyaluronidases, a group of glycosidases: Current and future perspectives. **81**, 165-181 (2010).
34. Bastow, E. R. *et al.* Hyaluronan synthesis and degradation in cartilage and bone. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 395–413 (2008).
35. Puré, E. & Assoian, R. K. Rheostatic signaling by CD44 and hyaluronan. *Cell Signal* **21**, 651–655 (2009).
36. Knudson, W. & Peterson, R. S. Chapter 5 - The Hyaluronan Receptor: CD44. *Chemistry and Biology of Hyaluronan* 83–123 (2004). Edition Elsevier Science (ISBN 978-0080443829)
37. Lepperdinger, G., Fehrer, C. & Reitinger, S. Chapter 4 - Biodegradation of Hyaluronan. *Chemistry and Biology of Hyaluronan* 71–82 (2004). Edition Elsevier Science (ISBN 978-0080443829)
38. Isacke, C. M. & Yarwood, H. The hyaluronan receptor, CD44. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **34**, 718–721 (2002).
39. Bajorath, J., Greenfield, B., Munro, S. B., Day, A. J. & Aruffo, A. Identification of CD44 Residues Important for Hyaluronan Binding and Delineation of the Binding Site. *J. Biol. Chem.* **273**, 338–343 (1998).
40. <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA10/HA10E.html>.
41. <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA08/HA08E.html>.
42. Lesley, J., Hascall, V. C., Tammi, M. & Hyman, R. Hyaluronan Binding by Cell Surface CD44. *J. Biol. Chem.* **275**, 26967–26975 (2000).
43. Rodriguez Hurtado, I. *et al.* Immunolocalization of the hyaluronan receptor CD44 in the reproductive tract of the mare. *Theriogenology* **75**, 276–286 (2011).
44. Knudson, C. B. Hyaluronan and CD44: Strategic players for cell–matrix interactions during chondrogenesis and matrix assembly. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews* **69**, 174–196 (2003).
45. Knudson, W., Chow, G. & Knudson, C. B. CD44-mediated uptake and degradation of hyaluronan. *Matrix Biol.* **21**, 15–23 (2002).
46. Turley, E. A. Purification of a hyaluronate-binding protein fraction that modifies cell social behavior. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **108**, 1016–1024 (1982).
47. HMMR hyaluronan-mediated motility receptor (RHAMM) [*Homo sapiens*]

Gene ID: 3161, updated on 7-Oct-2012

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=3161>)

48. Tölg, C., Hamilton, S. R. & Turley, E. A. Chapter 6 - The Role of the Hyaluronan Receptor RHAMM in Wound Repair and Tumorigenesis. *Chemistry and Biology of Hyaluronan* 125–151 (2004). Edition Elsevier Science (ISBN 978-0080443829)
49. Day, A. J. & Prestwich, G. D. Hyaluronan-binding Proteins: Tying Up the Giant. *J. Biol. Chem.* **277**, 4585–4588 (2002).
50. <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA11/HA11E.html>.
51. Day, R. M. & Mascarenhas, M. M. Chapter 7 - Signal Transduction Associated with Hyaluronan. *Chemistry and Biology of Hyaluronan* 153–188 (2004). Edition Elsevier Science (ISBN 978-0080443829)
52. Harris, E. N., Weigel, J. A. & Weigel, P. H. The Human Hyaluronan Receptor for Endocytosis (HARE/Stabilin-2) Is a Systemic Clearance Receptor for Heparin. *J Biol Chem* **283**, 17341–17350 (2008).
53. Harris, E. N. & Weigel, P. H. The ligand-binding profile of HARE: hyaluronan and chondroitin sulfates A, C, and D bind to overlapping sites distinct from the sites for heparin, acetylated low-density lipoprotein, dermatan sulfate, and CS-E. *Glycobiology* **18**, 638–648 (2008).
54. Banerji, S. *et al.* LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan. *J. Cell Biol.* **144**, 789–801 (1999).
55. <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA28/HA28E.html>.
56. Jackson, D. G., Prevo, R., Clasper, S. & Banerji, S. LYVE-1, the lymphatic system and tumor lymphangiogenesis. *Trends in Immunology* **22**, 317–321 (2001).
57. Maleki, A., Kjøniksen, A.-L. & Nyström, B. Effect of pH on the Behavior of Hyaluronic Acid in Dilute and Semidilute Aqueous Solutions. *Macromolecular Symposia* **274**, 131–140 (2008).
58. Dahl, L. B., Laurent, T. C. & Smedsrød, B. Preparation of biologically intact radioiodinated hyaluronan of high specific radioactivity: coupling of 125I-tyramine-cellobiose to amino groups after partial N-deacetylation. *Anal. Biochem.* **175**, 397–407 (1988).
59. Oerther, S. *et al.* High interaction alginate-hyaluronate associations by hyaluronate deacetylation for the preparation of efficient biomaterials. *Biopolymers* **54**, 273–281 (2000).
60. Bellini, D. & Topai, A. WO200001733. (2000).
61. Schanté, C. E., Zuber, G., Herlin, C. & Vandamme, T. F. Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications. *Carbohydrate Polymers* **85**, 469–489 (2011).
62. Piron, E. & Tholin, R. WO2002006350. (2002).
63. Collins, M. N. & Birkinshaw, C. Comparison of the effectiveness of four different crosslinking agents with hyaluronic acid hydrogel films for tissue-culture applications. *Journal of Applied Polymer Science* **104**, 3183 – 3191 (2007).
64. Serban, M. A., Yang, G. & Prestwich, G. D. Synthesis, Characterization and Chondroprotective Properties of a Hyaluronan Thioethyl Ether Derivative. *Biomaterials* **29**, 1388–1399 (2008).
65. Seidlits, S. K. *et al.* The effects of hyaluronic acid hydrogels with tunable mechanical properties on neural progenitor cell differentiation. *Biomaterials* **31**, 3930–3940 (2010).
66. Pravata, L. *et al.* New amphiphilic lactic acid oligomer-hyaluronan conjugates: synthesis and physicochemical characterization. *Biomacromolecules* **9**, 340–348 (2008).
67. Schneider, A. *et al.* Layer-by-layer films from hyaluronan and amine-modified hyaluronan. *Langmuir* **23**, 2655–2662 (2007).
68. Kuo, J. W., Swann, D. A. & Prestwich, G. D. Chemical modification of hyaluronic acid by carbodiimides. *Bioconjugate Chem.* **2**, 232–241 (1991).
69. Della Valle, F. & Romeo, A. Esters of hyaluronic acid, Patent 89108630.8. (1989).
70. Laroui, H. *et al.* Hyaluronate-Covered Nanoparticles for the Therapeutic Targeting of Cartilage. *Biomacromolecules* **8**, 3879–3885 (2007).

71. Huin-Amargier, C., Marchal, P., Payan, E., Netter, P. & Dellacherie, E. New physically and chemically crosslinked hyaluronate (HA)-based hydrogels for cartilage repair. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **76A**, 416–424 (2006).
72. Della Valle, F., Crescenzi, V. & Robert, L. Gellan esters, Patent 92400352.8: Europe. (1992).
73. Della Valle, F. & Romeo, A. Polysaccharide esters and their salts, patent 4,965,353: USA. (1990).
74. Rastello De Boisseson, M. *et al.* Physical alginate hydrogels based on hydrophobic and ionic interactions : bead formation, structure and stability. *Journal of Colloid and Interface Science* **271** (1), 131–139 (2004).
75. Tokita, Y., Ohshima, K. & Okamoto, A. Degradation of hyaluronic acid during freeze drying. *Polymer degradation and stability* **55**, 159–164 (1997)
76. Darke, A., Finer, E. G., Moorhouse, R. & 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.* **99**, 477–486 (1975).
77. Vårum, K. M., Anthonsen, M. W., Grasdalen, H. & Smidsrød, 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.* **211**, 17–23 (1991).
78. http://wwwens.uqac.ca/chimie/Chimie_physique/Chapitres/chap_4.htm.
79. Covis, R. *Synthèse de polysaccharides amphiphiles à partir de dextrane et application à la stabilisation d'émulsions directes et inverses*. (Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Lorraine 2011).
80. Khorramian, B. A. & Stivala, S. S. Assessment of branching in hydrolysates of *S. salivarius* levan and *L. mesenteroides* dextran from small-angle X-ray scattering. *Carbohydrate Research* **108**, 1–11 (1982).

Chapitre III : Formulation et caractérisation de nanoparticules polymères recouvertes de HAC6

Nous avons démontré dans le chapitre précédent qu'il est possible de préparer des dérivés amphiphiles de HA. Plus particulièrement, dans notre cas, des chaînes hexyle ont été reliées au HA par des liaisons ester. Ces composés possèdent des propriétés tensio-actives peu marquées en comparaison avec d'autres polysaccharides modifiés synthétisés préalablement au LCPM¹, mais elles sont toutefois suffisantes pour stabiliser des émulsions.

Les dérivés HAC6 produits sont destinés à être utilisés lors de la formulation de nanoparticules polymères pour la vectorisation de molécules d'intérêt au sein d'articulations pathologiques. Ceci nous impose certaines contraintes :

- Chaque constituant des particules doit être biocompatible et biodégradable ou bioassimilable.
 - Les particules ne doivent pas contenir de solvant organique après leur préparation et être stérilisables.
 - La taille de ces nano-objets doit leur permettre une internalisation par les cellules.
- Les constituants des particules

Le matériau sélectionné comme cœur des particules est l'acide poly(lactique-*co*-glycolique) (PLGA). C'est un copolyester hydrophobe, biocompatible et approuvé par la FDA (cf chapitre I). Ces copolymères sont largement utilisés^{2,3} et de nombreuses données sont disponibles concernant leurs caractéristiques. Un des avantages du PLGA est sa dégradation qui n'engendre pas de toxicité au niveau du corps humain car après hydrolyse on obtient de l'acide lactique et de l'acide glycolique principalement.

Le recouvrement des nanoparticules de PLGA par des HAC6 devrait permettre d'atteindre une reconnaissance spécifique des particules par les chondrocytes.

Le stabilisant interne que nous avons utilisé pour la préparation de l'émulsion primaire est l'albumine de sérum bovin (BSA). Cette protéine amphiphile est largement employée comme stabilisant d'émulsions^{4,5}.

Bien qu'il n'existe pas de médicament capable de soigner ou réparer les pathologies articulaires et notamment l'arthrose, certaines molécules semblent pouvoir jouer un rôle dans la limitation de la progression de la maladie. Par exemple, certains polysaccharides dont le HA ou la chondroïtine sulfate (CS) (Figure III-1) font l'objet d'une attention particulière en raison de leurs effets chondroprotecteurs notamment⁶⁻⁸. C'est pourquoi nous avons cherché à encapsuler une quantité suffisante de ces molécules dans les particules pour qu'une fois injectées au niveau d'articulations pathologiques, la libération de ces molécules d'intérêt à proximité ou dans les chondrocytes déclenche une réponse biologique favorable.

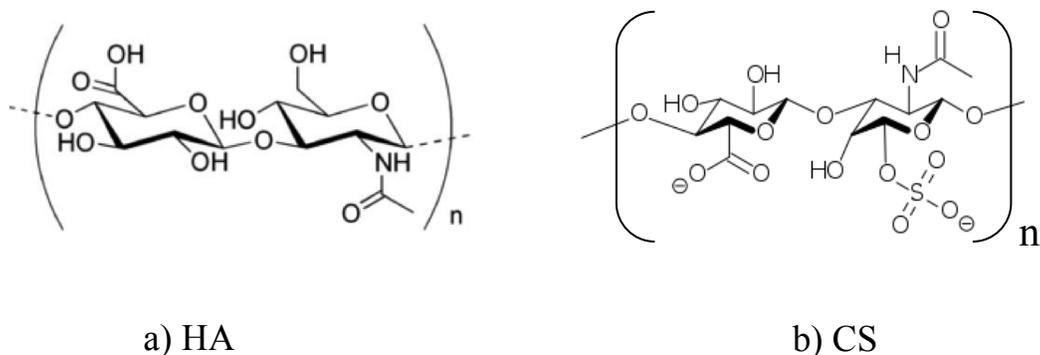


Figure III-1 : Structure moléculaire d'une unité de répétition du HA et de la CS.

- Taille des particules

Bien qu'il n'y ait pas d'objectif précis quant au diamètre des particules, celles-ci doivent être suffisamment petites pour être internalisées facilement par les chondrocytes (environ 40 μm de diamètre cf chapitre I). Les particules doivent dans le même temps pouvoir encapsuler une quantité suffisante de principe actif pour engendrer une réponse biologique quantifiable.

I. Objectifs

Ce chapitre III est consacré à l'élaboration de nanoparticules de PLGA recouvertes par du HAC6. Nous avons tout d'abord optimisé les conditions de formulation afin d'obtenir des particules submicroniques, faciles à stocker et à redisperser dans le cadre de leur utilisation au niveau biologique. Différents paramètres ont été optimisés afin de tenter de standardiser le procédé et ainsi obtenir des lots de particules reproductibles.

Par la suite, nous nous sommes intéressés à encapsuler différentes molécules d'intérêt. Dans un premier temps, des molécules fluorescentes pourraient nous permettre :

- de vérifier *in vitro* qu'une internalisation des nanoparticules par des chondrocytes est possible
- de localiser les particules *in vivo* après injection dans des articulations de rat
- d'ajuster, si besoin, les paramètres de formulation des particules. Dans un deuxième temps, des polysaccharides (HA et CS) ont été encapsulés comme molécules d'intérêt.

Ces travaux ont été réalisés lot par lot, c'est-à-dire que pour chaque condition de formulation de particules, des tests biologiques ont été effectués afin d'identifier d'éventuels écueils et d'y apporter des solutions si nécessaire.

II. Procédé d'émulsion/évaporation de solvant organique

Le procédé que nous avons choisi pour préparer les nanoparticules est la technique d'émulsion/évaporation de solvant organique. Cette méthode est simple à mettre en place, largement documentée et permet de préparer des émulsions simples ou doubles⁹⁻¹¹. L'émulsion est réalisée par sonication au moyen d'une sonde à ultrasons. Le LCPM est également équipé d'un microfluidiseur qui permet de préparer des particules par entrechoquement de la solution aqueuse et de la solution organique, dans une chambre de mélange. La pression à l'intérieur de cette chambre détermine la quantité d'énergie apportée au système et influence la taille finale de l'émulsion. Toutefois cette méthode n'a pas été utilisée dans le cadre de ces travaux, car il a été démontré¹² qu'elle dégrade fortement les HAC6.

La technique de sonication est dite de haute énergie et entraîne des échauffements locaux importants si le temps d'utilisation est long. C'est pourquoi le système doit être refroidi par un bain de glace pour dissiper la chaleur dégagée qui risque d'endommager certains principes actifs fragiles.

Des phénomènes de déstabilisation des émulsions (décrits au chapitre V) peuvent survenir une fois l'émulsion formée. Ils peuvent être évités si le solvant de la phase dispersée est rapidement éliminé. Dans notre cas, la phase dispersée contient aussi un polymère : le PLGA qui est insoluble dans l'eau. Lors de l'évaporation du solvant organique, le PLGA va alors précipiter dans la phase aqueuse pour conduire au final à la formation de particules solides. L'évaporation du solvant organique est donc une des étapes clés de la formulation. Elle doit être suffisamment rapide pour limiter les phénomènes de déstabilisation des émulsions et minimiser la diffusion de la phase aqueuse interne (et donc des molécules encapsulées) vers la phase aqueuse dispersante.

III. Techniques de mesure de la taille des particules

La taille des particules obtenues a été estimée grâce au granulomètre à diffraction laser que possède le LCPM : un Mastersizer MS2000[®] (Malvern Instrument Ltd, Worcestershire, UK). Cet appareil permet de déterminer la taille de particules comprises entre 0,1 et 3 000 μm de diamètre. Le traitement des résultats obtenus est basé sur la théorie de Mie (cf chapitre V). Les particules obtenues ont également été visualisées par Microscopie Electronique à Balayage.

A. Granulomètre à diffraction laser

Le Mastersizer (Figure III-2) permet d'observer la taille des particules présentes dans un échantillon en utilisant la théorie de Mie « à l'envers ». Lorsque les indices de réfraction du milieu de dispersion et des particules sont connus, l'appareil peut déterminer le diamètre des particules d'après l'analyse de l'image de diffraction obtenue. L'analyse est entièrement automatisée via des procédures standard (SOP) pour éliminer les variabilités dues à l'opérateur. Le Mastersizer est conçu pour mesurer la distribution en taille des particules d'un échantillon.

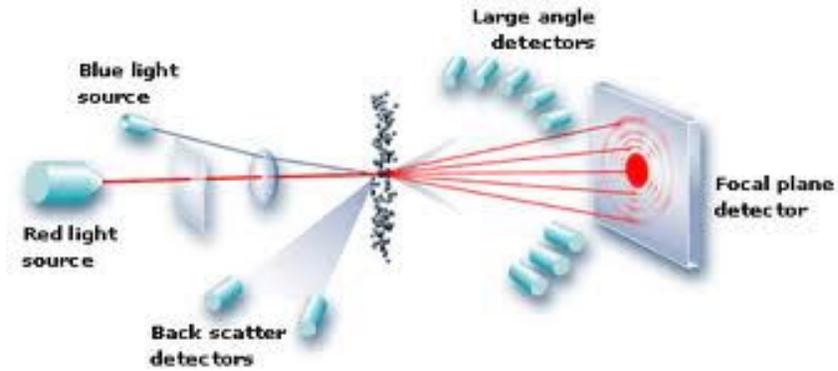


Figure III-2 : Schéma représentatif du mode de fonctionnement du Mastersizer¹³.

L'appareil est équipé de deux sources laser :

- Un laser rouge (hélium-néon) pour la diffusion avant, la diffusion latérale et la rétrodiffusion
- Un laser bleu (diode) pour la diffusion avant aux grands angles et la rétrodiffusion. Il émet un faisceau optique de petite longueur d'onde et permet d'augmenter la sensibilité de l'appareil vis-à-vis des particules submicroniques.

Le traitement du signal détecté permet d'obtenir différentes données concernant l'échantillon analysé. La figure III-3 représente un diffractogramme type obtenu par le Mastersizer pour une suspension de particules formulées par double émulsion puis évaporation du solvant organique.

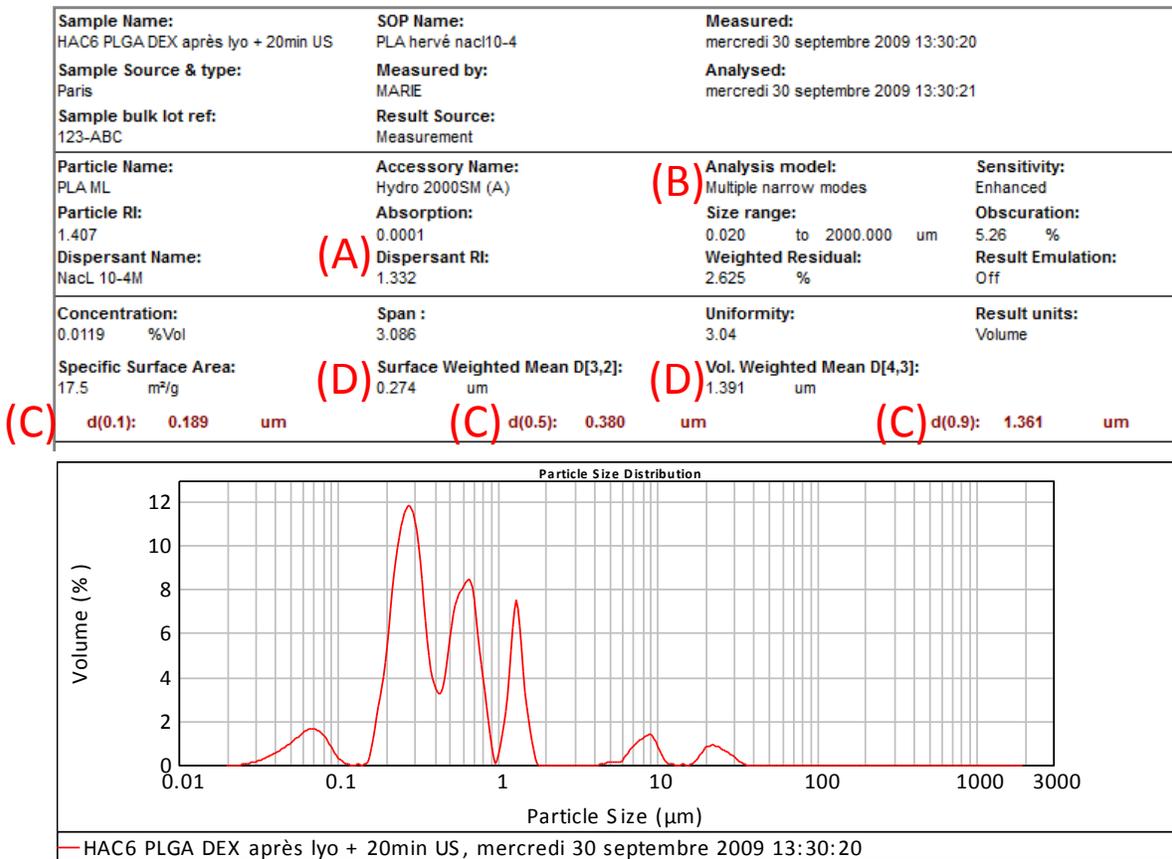


Figure III-3 : Diffractogramme obtenu dans le cas d'un lot de particules formulées par double émulsion avec du HABioC6-31% utilisé comme stabilisant de la phase aqueuse externe.

Chaque rapport de mesure renseigne sur les conditions d'analyse ; on peut ainsi connaître :

- Les caractéristiques du matériau utilisé et du milieu dispersant (indice de réfraction, absorption).
(A)
- Le type de traitement du signal. Pour notre étude nous avons choisi le mode « Multiple narrow modes » qui facilite la visualisation d'échantillons possédant de multiples classes de particules.
(B)
- d(0.1) : représente le diamètre des particules en dessous duquel se trouve 10% du volume total des particules. **(C)**
- d(0.5) : représente le diamètre des particules en dessous duquel se trouve 50% du volume total de l'échantillon. **(C)**
- d(0.9) : représente le diamètre des particules en dessous duquel se trouve 90% du volume total de l'échantillon. **(C)**

- $D[3,2]$: diamètre moyen en surface. C'est le diamètre d'une sphère dont le rapport volume/surface spécifique est identique à la moyenne des rapports volume/surface spécifique de toutes les particules présentes dans l'échantillon. Ce diamètre est aussi appelé diamètre de Sauter. Il est généralement utilisé pour caractériser des aérosols ou des sprays. **(D)**
- $D[4,3]$: c'est le diamètre moyen en volume, appelé aussi diamètre de De Brouckere. Le volume d'une sphère de ce diamètre est égal à la moyenne des volumes des particules de l'échantillon. Le $D[4,3]$ est sensible à la présence de grosses particules. **(D)**

Dans les tableaux qui seront présentés dans la suite de ce manuscrit, tous ces diamètres seront indiqués, mais nous nous focaliserons plus particulièrement sur le $d(0,5)$, tout en examinant le $d(0,9)$, $D[3,2]$ et le $D[4,3]$.

- Pourquoi ne pas utiliser l'HPPS dans le cadre de cette thèse ?

Une autre technique d'analyse était utilisée précédemment, il s'agit de la spectroscopie à corrélation de photons (PCS). L'appareil utilisé, un HPPS (High Performance Particle Sizer, Malvern Instruments), permet de mesurer les diamètres des particules par rétrodiffusion de la lumière. L'analyse repose sur le fait que des particules en suspension sont constamment soumises au mouvement Brownien dont l'intensité est inversement proportionnelle à la viscosité du milieu et à la taille des particules. L'HPPS mesure les variations du mouvement Brownien dans le temps, via les variations de la diffusion de la lumière autour d'une valeur moyenne. On obtient au final les rayons hydrodynamiques des particules présentes en suspension. Cependant, le traitement informatique des données obtenues donne une valeur moyenne de la taille des particules et, par conséquent, n'est pas adapté dans notre cas puisque notre protocole de formulation de nanoparticules conduit à l'obtention de plusieurs classes de particules.

B. Mesure des diamètres des particules par microscopie électronique à balayage (MEB)

La microscopie à balayage est utilisée en complément de la diffraction de la lumière. On peut ainsi balayer l'échantillon et observer qualitativement les différentes classes de population.

Cette technique d'analyse repose sur les interactions électron-matière. Un canon à électron va émettre un faisceau d'électrons en direction de l'échantillon. Ces électrons dits primaires vont entrer en collision avec les atomes de l'échantillon et céder une partie de leur énergie à des électrons des atomes et ainsi les éjecter, on parle alors d'électrons secondaires. Ceux-ci vont être recueillis par des détecteurs et leur

quantité permet de donner des informations sur la topologie de l'échantillon (la variation de la surface de l'échantillon modifie la quantité d'électrons secondaires éjectés).

Les échantillons isolants (échantillons biologiques, polymères, etc.) doivent en plus être métallisés, c'est-à-dire recouverts d'une fine couche de carbone ou d'or.

Les expériences ont été réalisées au moyen d'un appareil JEOL JSM localisé au LRGP (UPR 3349).

IV. Optimisation des conditions de formulation et de stockage des particules

A. Variation de la concentration en HAC6 dans la phase aqueuse externe

Les résultats présentés dans le chapitre précédent ont montré que les lots de HAC6 synthétisés ne possèdent pas de propriétés tensio-actives très marquées.

Nous avons donc préparé des émulsions (simple et double) avec une concentration en HAC6 dans la phase aqueuse externe variant de 0,5 à 5 g/L selon les protocoles décrits dans le chapitre V. L'objectif étant de déterminer la concentration minimale en HAC6 nécessaire pour stabiliser efficacement les émulsions finales et obtenir des particules dont la taille permet une encapsulation suffisante de molécules d'intérêt, tout en présentant de bonnes caractéristiques au niveau biologique (facilité de redispersion, non toxicité, interaction avec les chondrocytes,...).

1) Cas des émulsions simples

Des émulsions simples huile dans eau (o/w) ont été préparées avec les différents lots de HAC6 utilisés comme stabilisant. La phase organique est constituée de PLGA (50/50) à une concentration de 25 g/L dans du dichlorométhane. Bien que la plupart des publications consacrées à la formulation d'émulsions simples préconisent un rapport entre la phase dispersante et la phase dispersée de 10/1 (v/v), nous avons utilisé un rapport de 2/1 (v/v) pour des raisons pratiques :

- Ceci nous permet de prédire les tailles de gouttelettes qui seront obtenues dans le cas de l'émulsion double. En effet, dans le cas des émulsions doubles, le volume total émulsionnable est limité et le ratio phase aqueuse externe/phase organique des émulsions doubles est de 2/1.
- La quantité de HAC6 pour chaque lot est limitée.

L'interprétation des résultats que nous avons obtenus par diffraction de la lumière est différente des analyses d'un microscope où l'on se contente de faire du comptage. Pour la diffraction de la lumière, le

logiciel d'analyse va classer les particules selon leur distribution en volume ramenée à leur diamètre. Lorsque le diamètre d'une sphère est doublé, le volume de la particule correspondante est multiplié par 8 (soit 2^3). Ainsi, une particule de diamètre important aura autant de « poids » qu'une multitude de petites particules. L'interprétation des résultats obtenus peut donc être rendue délicate par la présence de quelques grosses particules dans la suspension analysée, d'où l'importance d'observer les diffractogrammes pour chaque lot étudié.

Comme nous l'avons signifié précédemment, nous avons fait varier la concentration en HAC6 de 0,5 à 5 g/L pour déterminer quelle concentration permet de stabiliser les émulsions o/w. Des émulsions simples ont été préparées avec les différents lots de HAC6. Après évaporation du solvant organique, nous avons mesuré le diamètre des particules obtenues. Les résultats sont présentés dans le tableau III-1.

HAAC6-19% (g/L)	d(0,1) (nm)	d(0,5) (nm)	d(0,9) (nm)	D[3,2] (nm)	D[4,3] (nm)
0,5	1 255	194 294	489 993	6 180	231 101
1	1 165	342 389	804 221	6 055	392 366
2,5	527	460 785	1 022 987	1 906	475 665
5	190	180 263	804 332	624	281 849

HABioC6- 17% (g/L)	d(0,1) (nm)	d(0,5) (nm)	d(0,9) (nm)	D[3,2] (nm)	D[4,3] (nm)
0,5	220	360	700	354	433
1	203	300	641	305	365
2,5	195	291	605	290	341
5	147	232	480	223	268

HABioC6- 24% (g/L)	d(0,1) (nm)	d(0,5) (nm)	d(0,9) (nm)	D[3,2] (nm)	D[4,3] (nm)
0,5	80	217	98 223	177	37 562
1	ND	ND	ND	ND	ND
2,5	85	258	86 105	199	25 646
5	249	511	1 051	431	551

HABioC6- 31% (g/L)	d(0,1) (nm)	d(0,5) (nm)	d(0,9) (nm)	D[3,2] (nm)	D[4,3] (nm)
0,5	96	314	444 013	229	87 538
1	152	230	601	226	278
2,5	101	170	252	154	174
5	79	169	15 606	149	16 320

Tableau III-1 : Evolution des tailles des particules préparées par simple émulsion o/w puis évaporation du solvant en fonction de la concentration en HAC6 dans la phase aqueuse externe.

Dans le cas du HAAC6-19%, synthétisé à partir du HANA de haute masse molaire, on peut constater que quelle que soit la concentration utilisée, il ne permet pas de stabiliser correctement des émulsions o/w simples. Par conséquent, après évaporation du solvant, le diamètre des particules obtenues n'est pas compatible avec nos objectifs biologiques. Plusieurs explications peuvent expliquer ces résultats :

- la haute masse molaire de ce HAC6 rend les solutions aqueuses visqueuses. L'adsorption à l'interface eau/(PLGA + dichlorométhane) de ce HAC6 n'est peut-être pas suffisamment rapide par rapport au temps de sonication
- parallèlement, l'adsorption d'une molécule de HAAC6-19% peut empêcher l'adsorption d'autres molécules identiques.

Au final, ce HAAC6-19% n'est pas apte à stabiliser correctement les émulsions formées.

Pour les lots HABioC6, il est possible de stabiliser des émulsions simples o/w (et donc les particules résultantes) d'un diamètre inférieur à 0,5 μm . On peut de plus remarquer que la taille des particules tend à diminuer lorsque la concentration en HAC6 augmente.

2) Cas des émulsions doubles

Les émulsions doubles sont préparées selon le protocole décrit dans le chapitre V. La présence d'un tensio-actif dans la phase aqueuse interne est nécessaire pour stabiliser la première émulsion o/w. Nous avons choisi d'utiliser la BSA pour jouer ce rôle, car c'est une molécule amphiphile régulièrement utilisée comme agent stabilisant lors de la préparation d'émulsions multiples. Lors de précédents travaux concernant les particules polymères recouvertes de HAC6¹², la BSA était utilisée à raison de 50 g/L dans la phase aqueuse interne. Nous avons pu vérifier qu'une concentration de 25 g/L était suffisante pour stabiliser l'émulsion o/w primaire, sans modifier la distribution en taille des particules finales (Figure III-4). Cette réduction de la quantité de BSA nécessaire pour la stabilisation est intéressante pour l'évaluation biologique des particules puisque l'introduction de corps étrangers dans l'organisme peut provoquer une réaction immunitaire. Il est donc essentiel de limiter au maximum les concentrations de chaque molécule nécessaire à la formulation des particules.

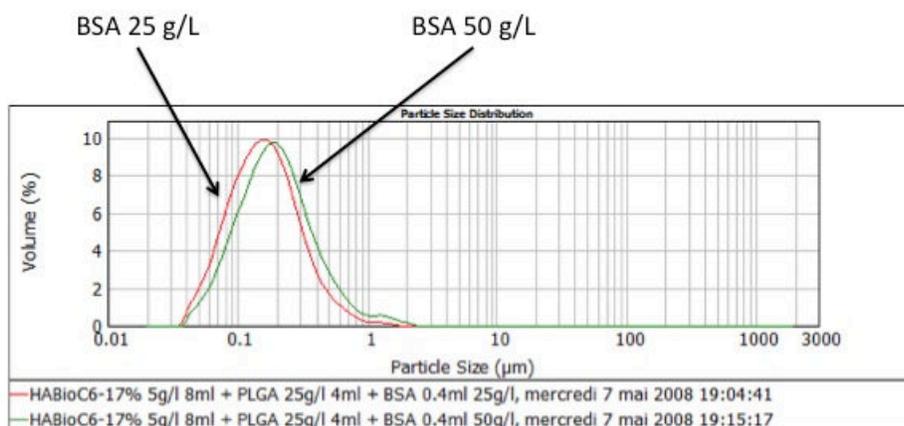


Figure III-4 : Evolution de la taille des nanoparticules recouvertes de HABioC6-17% obtenues par double émulsion/évaporation de solvant en fonction de la concentration en BSA dans la phase aqueuse interne : 25 g/L (en rouge) et 50 g/L (en vert).

Les résultats des mesures par diffraction de la lumière sur le diamètre des particules préparées par double émulsion sont donnés dans le tableau III-2 :

HAAC6-19% (g/L)	d(0,1) (nm)	d(0,5) (nm)	d(0,9) (nm)	D[3,2] (nm)	D[4,3] (nm)
0,5	6 156	23 996	269 441	14 657	78 515
1	262	21 305	469 259	1 008	127 536
2,5	97	2 779	115 145	289	38 375
5	104	8 508	119 350	339	52 898

HABioC6- 17% (g/L)	d(0,1) (nm)	d(0,5) (nm)	d(0,9) (nm)	D[3,2] (nm)	D[4,3] (nm)
0,5	22 474	45 424	85 716	37 984	53 055
1	193	513	82 376	461	42 245
2,5	162	238	554	236	418
5	144	203	314	203	444

HABioC6- 24% (g/L)	d(0,1) (nm)	d(0,5) (nm)	d(0,9) (nm)	D[3,2] (nm)	D[4,3] (nm)
0,5	221	549 595	1 021 600	3 744	539 965
1	201	8 317	770 665	546	236 984
2,5	131	415	121 128	305	32 426
5	187	294	1 152	309	457

HABioC6- 31% (g/L)	d(0,1) (nm)	d(0,5) (nm)	d(0,9) (nm)	D[3,2] (nm)	D[4,3] (nm)
0,5	24 642	51 612	172 308	44 423	111 164
1	13 930	51 051	636 695	31 341	194 782
2,5	85	155	288	141	3 217
5	80	143	228	127	291

Tableau III-2 : Evolution des diamètres des particules préparées par double émulsion (après évaporation du solvant organique) en fonction de la concentration en HAC6 dans la phase aqueuse externe.

L'analyse par MEB des nanoparticules obtenues par double émulsion nous a permis de confirmer les résultats obtenus par diffraction de la lumière et rassemblés dans le tableau III-2. La figure III-5 montre des clichés de particules formulées par double émulsion/évaporation de solvant, en fonction de la concentration en HAC6 utilisée (HABioC6-24%) :

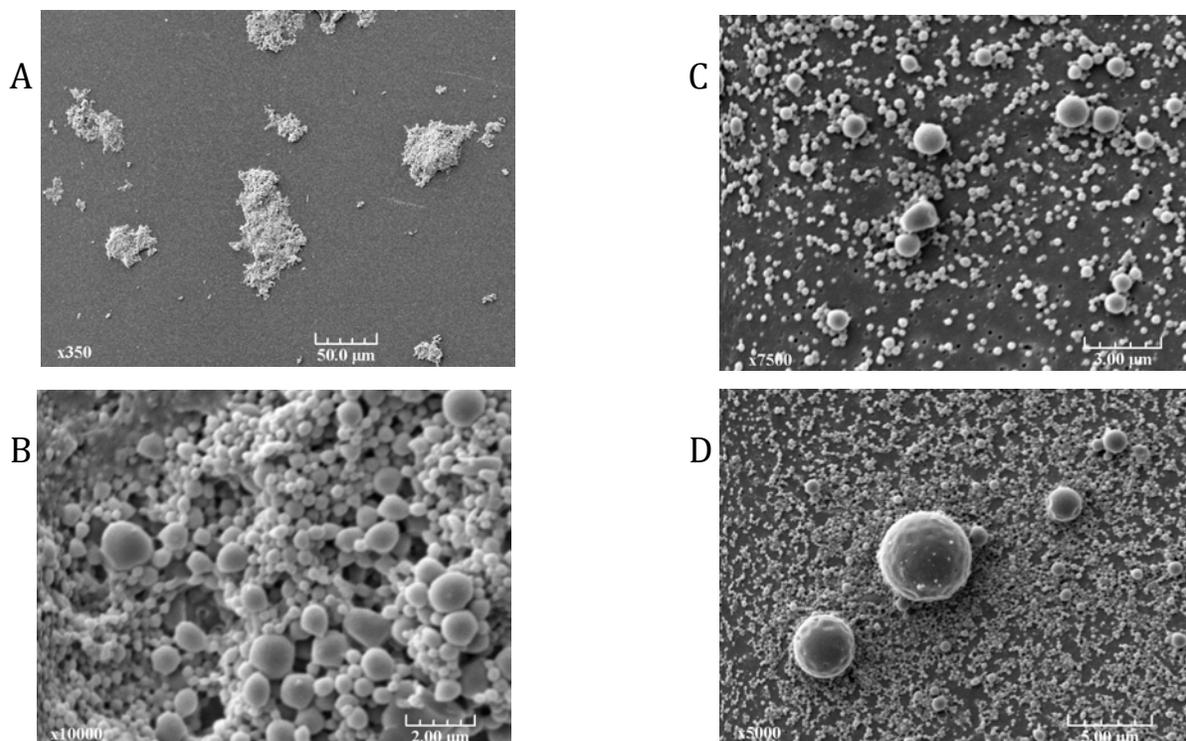


Figure III-5 : Observation en microscopie électronique à balayage de nanoparticules de PLGA recouvertes de HABioC6-24% à différentes concentrations, préparées par double émulsion (BSA à 25 g/L dans la phase aqueuse interne). Les concentrations en HABioC6-24% sont de 0,5 ; 1 ; 2,5 et 5 g/L pour les clichés A, B, C et D, respectivement.

A partir du tableau III-2, on remarque qu'aucune particule d'un diamètre inférieur au μm ne peut être observée avec le HAAC6-19% utilisé comme stabilisant de l'émulsion secondaire, ce qui conforte les résultats que nous avons observés pour les émulsions simples. Dans le cas des dérivés HAC6 obtenus à partir du HA Bioiberica, si les concentrations en HAC6 dans la phase aqueuse externe sont inférieures à 2,5 g/L il n'est pas possible de stabiliser correctement des émulsions doubles. On observe alors par MEB des agrégats de plusieurs dizaines de micromètres. Ainsi les particules obtenues après évaporation de solvant n'ont pas un diamètre suffisamment faible pour envisager une utilisation biologique. Par contre, lorsque les phases aqueuses externes présentent des concentrations de 2,5 et 5 g/L, les émulsions doubles sont bien mieux stabilisées et des particules de diamètres inférieurs à 500 nm peuvent être produites ; ce qui répond aux contraintes imposées par la biologie. De plus, on peut remarquer que le diamètre des particules pour un même dérivé HAC6 employé tend à diminuer lorsque la concentration en HAC6 augmente.

Des essais de formulation de particules en employant des concentrations supérieures à 5 g/L de HAC6 dans la phase aqueuse externe n'ont pas permis d'atteindre des diamètres corrects. La solution aqueuse externe devient trop visqueuse en raison de la forte concentration en polysaccharide.

A la vue des résultats obtenus, nous avons retenu la concentration de 5 g/L de HAC6 dans la phase aqueuse externe pour la suite de notre étude et nous avons uniquement utilisé les lots de HAC6 synthétisés à partir du HANA Bioibérica.

B. Purification des nanoparticules

Une fois le solvant de la phase organique évaporé, on obtient une suspension de particules en solution aqueuse qu'il faut purifier. En effet, dans la phase aqueuse dispersante, on retrouve des molécules qui ne sont pas intervenues dans la formulation (HAC6, BSA, ...). Cette purification se fait par centrifugation. On peut ainsi discriminer les particules des molécules grâce à leur différence de masse. Les particules vont être concentrées par sédimentation alors que les molécules solubles dans l'eau restent dans le surnageant et peuvent facilement être éliminées. Après chaque centrifugation et élimination du surnageant, un volume connu d'eau MilliQ est ajouté au culot puis les particules sont redispersées par agitation pendant 5 minutes au vortex et relavées par centrifugation.

Dans un premier temps, il a fallu déterminer la vitesse optimale de centrifugation, c'est-à-dire la vitesse pour laquelle on peut facilement séparer les particules du reste de la suspension, tout en préservant leur intégrité et en évitant leur agrégation.

L'optimisation des conditions de lavage s'est faite par centrifugation (2 séries de lavage) sur des particules préparées par double émulsion avec du HABioC6-31% utilisé comme stabilisant externe.

vitesse de centrifugation	d(0,1) (nm)	d(0,5) (nm)	d(0,9) (nm)	D[3,2] (nm)	D[4,3] (nm)
10 000 (rpm)	136	152	172	152	153
9 000 (rpm)	143	154	167	154	155
8 000 (rpm)	122	160	201	155	162
7 000 (rpm)	118	190	263	178	208
6 000 (rpm)	135	211	302	196	215
5 000 (rpm)	117	208	353	182	226

Tableau III-3 : Evolution des tailles de particules présentes dans les surnageants en fonction de la vitesse de centrifugation. Le HABioC6-31% a été utilisé à 5 g/L comme stabilisant de la phase externe.

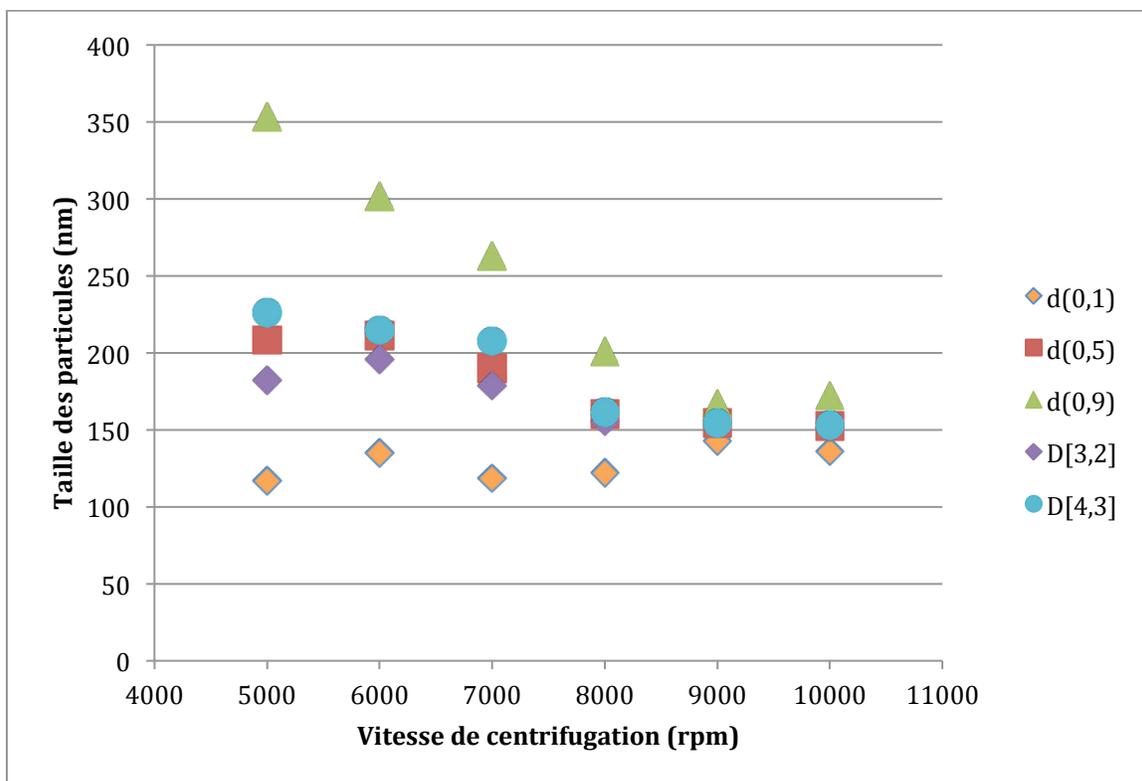


Figure III-6 : Représentation graphique de l'évolution de la taille en nanomètre des particules, mesurée dans les surnageants en fonction de la vitesse de centrifugation en rpm. Le HABioC6-31% a été utilisé à 5 g/L comme stabilisant de la phase externe.

On s'aperçoit que la taille des particules présentes dans le surnageant diminue lorsque la vitesse de centrifugation augmente (Tableau III-3). A partir de la Figure III-6, on peut conclure qu'au delà de 8 000 rpm l'appareil ne détecte plus d'objets d'un diamètre supérieur à 200 nm présents dans le surnageant. La moyenne des $d(0,5)$ reste stable à 160 nm. Il est cependant important de noter que lors des mesures de la taille des particules dans les surnageants, la valeur de l'obscurité était très faible (inférieure à 0,5 %) pour un volume de suspension injecté d'environ 15 mL. En d'autres termes, il n'y a que très peu de particules présentes dans le surnageant. Pour rappel, lors de la mesure de tailles des particules en suspension (après évaporation du solvant organique), entre 2 et 3 mL de suspension sont suffisants pour obtenir une obscurité du laser de 5 %.

Les tailles des particules présentes dans le culot ont été mesurées après chaque cycle de lavage (centrifugation + redispersion) et sont difficiles à interpréter (Tableau III-4). En effet, la présence d'agrégats de particules va considérablement influencer les valeurs obtenues par le Mastersizer, ceci est

particulièrement vrai pour le d(0,9) et le D[4,3]. En revanche, on peut constater en observant le tableau III-5 que ces « agrégats » ne sont plus visibles après lyophilisation.

vitesse de centrifugation (rpm) (1er lavage)	d(0,1) (nm)	d(0,5) (nm)	d(0,9) (nm)	D[3,2] (nm)	D[4,3] (nm)
10 000	170	263	778	276	410
9 000	170	261	780	275	408
8 000	175	264	801	280	417
7 000	175	266	1 153	286	2 156
6 000	180	272	1 108	289	1 382
5 000	183	274	718	290	1 082

vitesse de centrifugation (rpm) (2ème lavage)	d(0,1) (nm)	d(0,5) (nm)	d(0,9) (nm)	D[3,2] (nm)	D[4,3] (nm)
10 000	180	283	953	891	703
9 000	181	279	858	295	435
8 000	187	285	1 075	302	444
7 000	188	285	739	301	1 139
6 000	190	286	718	302	1 113
5 000	196	298	944	318	1 432

Tableau III-4 : Evolution des tailles des particules contenues dans le culot de centrifugation en fonction de la vitesse de centrifugation. Les particules sont redispersées pendant 5 minutes au vortex après chaque centrifugation.

Le HABioC6-31% a été utilisé à 5 g/L comme stabilisant de la phase externe.

vitesse de centrifugation (rpm)	d(0,1) (nm)	d(0,5) (nm)	d(0,9) (nm)	D[3,2] (nm)	D[4,3] (nm)
10 000	180	296	1 246	307	1 551
9 000	183	299	1 245	311	1 485
8 000	190	304	859	313	452
7 000	163	410	41 994	342	12 157
6 000	201	342	1 286	310	1 981
5 000	222	504	52 844	461	13 910

Tableau III-5 : Evolution des tailles des particules obtenues en fonction de la vitesse de centrifugation après lyophilisation, redispersion et sonication 20 minutes au bain à ultrasons. Le HABioC6-31% a été utilisé à 5 g/L comme stabilisant de la phase externe.

Il a donc été décidé à la vue de ces résultats que les centrifugations seraient effectuées à une vitesse de 9 000 rpm (12085 g). Cette vitesse représente un bon compromis car elle permet de séparer les particules des molécules présentes en solution tout en limitant les risques d'agrégation induits par une vitesse trop importante.

C. Stockage des particules

Le stockage des particules est un problème majeur de l'industrie. Bien souvent le délai entre la formulation des particules et leur utilisation est de plusieurs jours voire de quelques mois. Durant cette période, les lots de particules doivent conserver leurs propriétés c'est-à-dire principalement leur taille, ne pas s'agréger et ne pas se dégrader ni altérer les molécules qui peuvent y être encapsulées.

La conservation des particules en milieu aqueux (à l'état de suspension) à température ambiante est à proscrire car elle ne préserve pas l'intégrité des particules et conduit parfois à la libération des principes actifs (selon le principe actif encapsulé).

La congélation de la suspension fige certes le système mais tend à agréger les particules si l'étape de refroidissement est trop longue. Les particules sont sensibles aux cycles congélation/décongélation donc les lots congelés ne peuvent généralement être utilisés qu'une seule fois, sinon une agrégation des particules peut être observée.

La lyophilisation reste la meilleure des alternatives pour la conservation de particules, sous réserve que celles-ci ne s'agrègent pas pendant le processus. Elle permet de plus d'obtenir une poudre de particules sèches dont l'utilisation sera facilitée. On peut ainsi connaître la quantité exacte de particules à redisperser pour leur future injection, contrairement à la congélation.

- Utilisation de lyoprotecteurs

Nous avons étudié l'effet de l'ajout de lyoprotecteurs sur la redispersion de particules lyophilisées. Les lyoprotecteurs sont des molécules qui vont recouvrir les particules et ainsi prévenir leur agrégation lors de la lyophilisation. Lors de la sublimation de l'eau, les particules se retrouvent surconcentrées. Si leur surface n'est pas suffisamment recouverte de stabilisant, des interactions plus ou moins fortes vont avoir lieu entre elles ce qui conduit généralement à l'agrégation des particules. Ce phénomène est d'autant plus marqué si le matériau cœur des particules est hydrophobe. Dans ce dernier cas, les interactions sont

renforcées et la redispersion des particules devient impossible. Les lyoprotecteurs peuvent empêcher leur agrégation en se positionnant à la surface des particules et donc en limitant les interactions.

Deux types de lyoprotecteurs ont été utilisés dans le cadre de ces travaux : le tréhalose (disaccharide) et le mannitol (polyol) (Sigma Aldrich, USA)^{14,15} (Figure III-7).

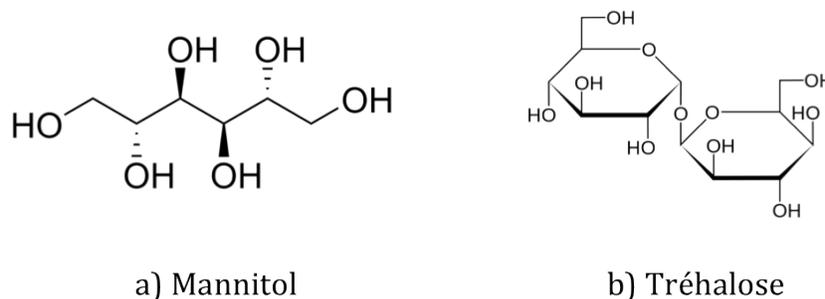


Figure III-7: Structure moléculaire du a) mannitol et du b) tréhalose.

Pour évaluer ces deux lyoprotecteurs, des particules ont été préparées par double émulsion en utilisant le HABioC6-31% comme stabilisant, dissout dans la phase aqueuse externe. Après caractérisation de leur taille, les suspensions de particules sont divisées en plusieurs lots pour mener les centrifugations/lavages. Ces lavages sont soit effectués avec de l'eau MilliQ, soit avec une solution aqueuse contenant les lyoprotecteurs. Dans le cas des lavages à l'eau, avant de lyophiliser les particules, celles ci sont réparties en trois lots auxquels on ajoute soit de l'eau soit une solution aqueuse de lyoprotecteurs.

On a ainsi avant lyophilisation 5 types d'expériences :

- 1) Un échantillon lavé à l'eau et lyophilisé dans de l'eau
- 2) Un échantillon lavé à l'eau et lyophilisé dans une solution de Tréhalose (5 g/L)
- 3) Un échantillon lavé à l'eau et lyophilisé dans une solution de Mannitol (5 g/L)
- 4) Un échantillon lavé et lyophilisé dans une solution de Tréhalose (5 g/L)
- 5) Un échantillon lavé et lyophilisé dans une solution de Mannitol (5 g/L)

Le Tableau III-6 nous permet de constater que les diamètres des particules obtenues sont sensiblement égaux quelles que soient les conditions de lavages/lyophilisation. Néanmoins ces diamètres sont plus faibles lorsque les lavages des particules ont été effectués dans l'eau. Cette expérience nous montre que l'ajout de cryoprotecteurs n'est pas nécessaire dans le cas de ces nanoparticules. Ce résultat diffère par

exemple des nano-objets pégylés pour lesquels l'ajout de lyoprotecteurs est généralement nécessaire. Dans notre cas, le HAC6 recouvre suffisamment la matrice de PLGA pour empêcher l'agrégation et assurer la redispersion des particules. Le non recours à des lyoprotecteurs va permettre de mener des expériences biologiques plus fiables car les quantités de particules utilisées seront des quantités vraies ; il n'y aura pas de surestimation de la concentration utilisée en raison de la présence de cryoprotecteurs.

HABioC6-31%/PLGA/BSA	d(0,1) (nm)	d(0.5) (nm)	d(0.9) (nm)	D[3.2] (nm)	D[4.3] (nm)
émulsion après évaporation	96	216	5 316	184	8 742
lavages et lyophilisation dans l'eau	189	312	1 267	326	1 186
lavages à l'eau puis mannitol avant lyophilisation	190	313	1 300	328	783
lavages à l'eau puis tréhalose avant lyophilisation	189	314	1 258	326	922
lavages avec mannitol puis lyophilisation	200	354	1 961	359	1 067
lavages avec tréhalose puis lyophilisation	195	351	6 714	365	2 227

Tableau III-6 : Récapitulatif des tailles de particules en fonction des conditions de lavages et de lyophilisation (à l'eau ou dans une solution contenant des cryoprotecteurs). Les particules sont stabilisées par du HABioC6-31% à 5 g/L, après lyophilisation, elles sont redispersées dans l'eau puis soniquées pendant 20 minutes dans un bain à ultrasons.

D. Conclusion sur la formulation de particules « vides » par double émulsion

Nous avons mis au point les conditions expérimentales qui conduisent à la formulation de particules de PLGA par la méthode d'émulsion/évaporation de solvant. Ces particules sont recouvertes de HAC6 produits en modifiant le HANa de chez Bioibérica. Nous avons déterminé que la quantité de HAC6 nécessaire à la stabilisation de particules de taille suffisamment petite pour envisager une utilisation biologique est de 5 g/L. Parallèlement, la concentration en BSA utilisée pour stabiliser l'émulsion interne a pu être diminuée de moitié, à 25 g/L (par rapport à nos travaux précédents) sans modifier les caractéristiques des particules. Hélas, ce procédé d'émulsion/évaporation de solvant ne nous permet pas d'obtenir des particules monodisperses. Leur taille varie entre 200 nm et 2 µm de diamètre.

Les particules ainsi formées peuvent être purifiées par centrifugation puis lyophilisées sans que l'on observe d'aggrégation et donc sans avoir recours à des lyoprotecteurs.

V. Encapsulation de molécules d'intérêt

Une fois les conditions optimales de préparation et de stockage des particules « vides » définies, nous avons cherché à encapsuler différentes molécules à savoir : une sonde fluorescente (DEX-FITC ou BSA-Cy3) permettant de visualiser les particules lors des tests biologiques, puis, une molécule d'intérêt (HA ou CS) pour observer d'éventuels effets bénéfiques sur des articulations pathologiques.

A. Les traceurs fluorescents

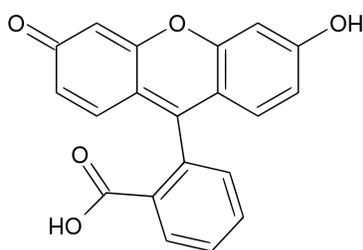
1) La fluorescéine

La fluorescéine est une sonde fluorescente très utilisée car elle peut être conjuguée avec une grande variété de molécules¹⁶¹⁷. Modifiée chimiquement pour porter un groupement isothiocyanate, on parle alors de FITC (isothiocyanate de fluorescéine) et on peut la coupler facilement avec d'autres molécules comme le dextrane par exemple. On obtient alors un traceur fluorescent nommé DEX-FITC (Figure III-8) qui permettra, dans notre cas, de visualiser les particules par fluorescence, grâce au substituant FITC.

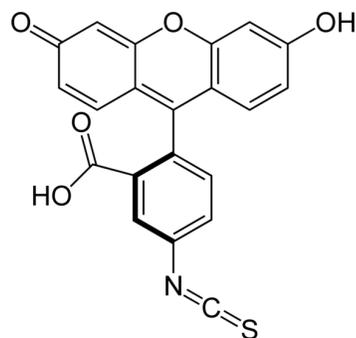
La longueur d'onde d'excitation de la FITC est de $\lambda_{ex}= 495$ nm pour un maximum d'émission à $\lambda_{em}= 521$ nm. Toutefois ce groupe fluorescéine est soumis comme la plupart des fluorochromes au photoblanchissement (photobleaching) ce qui rend difficile la quantification de la FITC encapsulée dans les particules. De plus, dans le cas précis de notre étude, sa longueur d'onde d'émission est proche de

l'autofluorescence du cartilage (qui émet de la fluorescence aux alentours de 520 nm). La visualisation des particules contenant du DEX-FITC dans les tissus biologiques sera malheureusement délicate.

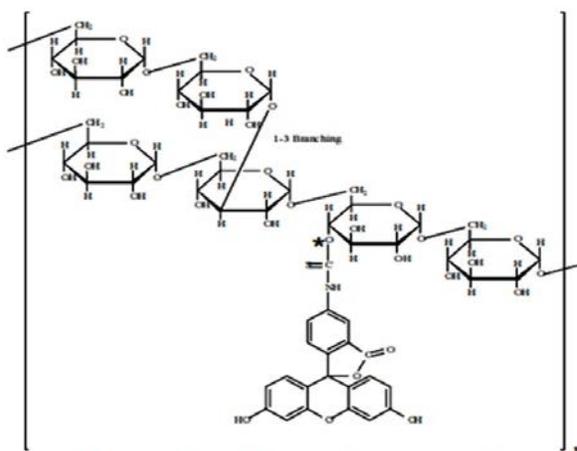
La masse molaire du DEX-FITC utilisé est de l'ordre de 500 000 g/mol. Il va en quelque sorte nous permettre de « mimer » l'encapsulation de polysaccharides de haute masse molaire tels que le HANA que nous utiliserons plus tard comme molécule d'intérêt. Ainsi il servira pour optimiser les conditions d'encapsulation.



a) Fluorescéine



b) Fluorescéine Isothiocyanate



c) Dextrane-Fluorescéine Isothiocyanate

Figure III-8 : Structures moléculaires de la Fluorescéine (a), de la Fluorescéine Isothiocyanate (b) et du DEX-FITC (c)¹⁸.

La formulation de particules encapsulant du DEX-FITC (solubilisé à une concentration de 5 g/L dans la phase aqueuse interne qui contient également 25 g/L de BSA) donne les résultats suivants rassemblés dans le tableau III-7 :

	D(0,1)	D(0.5)	D(0.9)	D[3.2]	D[4.3]
HABioC6- 17%	(144) 245	(203) 341	(314) 39 895	(203) 426	(444) 19 316
HABioC6- 31%	(80) 117	(143) 300	(228) 715	(127) 230	(291) 733

Tableau III-7 : Récapitulatif des tailles de particules obtenues pour l'encapsulation de DEX-FITC dans des particules de PLGA recouvertes de HAC6 (HABioC6-17% et HABioC6-31% à 5 g/L). **Les tailles indiquées entre parenthèses sont caractéristiques des particules « vides » obtenues dans les mêmes conditions.**

Les particules obtenues encapsulant le DEX-FITC possèdent une taille légèrement supérieure aux particules « vides » c'est-à-dire sans molécule autre que la BSA dans la phase aqueuse interne. Ceci est logique : la phase aqueuse interne contient plus de molécules et donc va former une émulsion interne plus volumineuse, ce qui tend à augmenter la taille de l'émulsion secondaire.

La quantification de la DEX-FITC réellement encapsulée n'a malheureusement pas pu être déterminée en raison de la sensibilité de la sonde vis-à-vis de son environnement. Nous avons en effet constaté lors des dosages de la quantité de DEX-FITC encapsulée dans les particules que le rendement de fluorescence est différent selon que la molécule de DEX-FITC ait été encapsulée en présence ou non de BSA. Sur la figure III-9, on peut facilement observer ces différences. Sur cette figure sont tracées des courbes de calibration de fluorescence de la DEX-FITC dans différentes solutions.

De plus, comme nous l'avons déjà dit, la longueur d'onde d'émission de la FITC se confond avec la longueur d'onde d'auto fluorescence du cartilage et rend difficile la localisation des particules. Toutefois, bien que les nanoparticules contenant du DEX-FITC ne puissent pas être utilisées lors des tests *in vivo*, des particules contenant du DEX-FITC ont pu être utilisées avec succès pour démontrer l'internalisation de ces particules par des synoviocytes et des chondrocytes *in vitro* (cf chapitre IV).

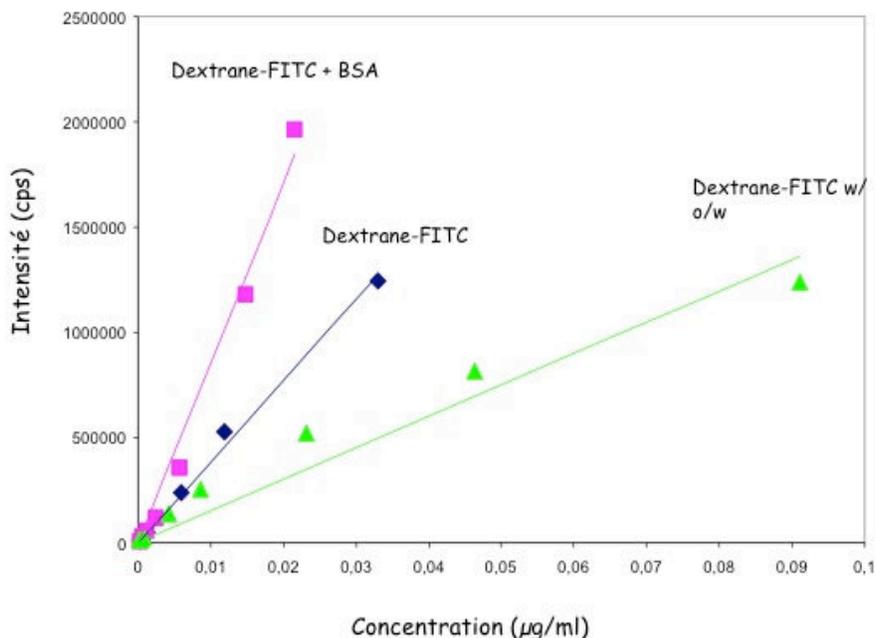


Figure III-9 : Droites d'étalonnage de l'intensité de fluorescence émise par le DEX-FITC (en coups par seconde) par rapport à la concentration ($\mu\text{g/mL}$). La solution de DEX-FITC dans l'eau est représentée en bleu, le mélange DEX-FITC + BSA (à 25 g/L) est en rose et la solution de DEX-FITC ayant subi le protocole de double émulsion est en vert.

En raison des limitations du DEX-FITC, nous avons décidé de changer de traceur fluorescent et d'utiliser de la Cyanine 3.

2) Cyanine 3

L'emploi du groupement fluorochrome cyanine 3 (Figure III-10) nous a permis de nous affranchir des limites induites par la FITC (longueur d'onde d'émission trop proche de celle du cartilage). En effet la cyanine 3 possède une longueur d'onde d'excitation de $\lambda_{\text{ex}} = 550 \text{ nm}$ pour un maximum d'émission vers $\lambda_{\text{em}} = 570 \text{ nm}$.

De la BSA-Cy3 (nanocs, USA) a été substituée à une partie de la BSA solubilisée dans la phase aqueuse interne et utilisée lors de la 1^{ère} émulsion o/w. La BSA étant la molécule amphiphile qui stabilise notre émulsion interne, nous avons postulé que la BSA-Cy3 possédait des caractéristiques identiques et qu'elle était par conséquent capable de se positionner à l'interface eau/huile de l'émulsion interne, contrairement au DEX-FITC que nous avons cherché à encapsuler. La BSA-Cy3 qui fluoresce dans le rouge nous servira à localiser les particules dans le cartilage.

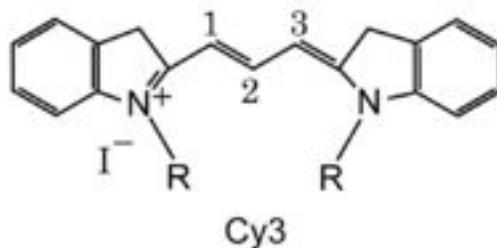


Figure III-10 : Structure moléculaire de la cyanine 3. Les groupements R peuvent être des chaînes aliphatiques si la cyanine 3 est utilisée seule ou des groupements réactifs (N-hydroxysuccinimide ou maleimide) permettant de coupler la cyanine 3 à une autre molécule.

Ainsi, nous avons réalisé différents tests en ajoutant des proportions variées de BSA-Cy3 à notre formulation. Ces tests devraient nous permettre de déterminer la dose suffisante de BSA-Cy3 à utiliser pour visualiser correctement les particules après injection dans l'articulation.

Nous avons ainsi remplacé 2 ; 5 et 10 % de BSA par de la BSA-Cy3 lors de la formulation de particules recouvertes par du HABioC6-24%. Les résultats concernant la taille des particules obtenues en fonction de la quantité de BSA-Cy3 ajoutée sont regroupés dans le tableau III-8 :

BSA-Cy3	D(0,1)	D(0,5)	D(0,9)	D[3,2]	D[4,3]
0 %	187	294	1 152	309	457
2 %	187	335	3 161	351	1 533
5 %	64	133	5 320	126	1 760
10 %	1 693	4 732	19 315	3 374	10 205

Tableau III-8 : Tailles de particules obtenues après ajout de différentes quantités de BSA-Cy3 dans la phase aqueuse interne. Utilisation de HABioC6-24% (5 g/L) dans la phase aqueuse externe.

La présence de BSA-Cy3 à 2 et 5 % ne perturbe pas la taille des particules. Mais on observe une augmentation marquée du diamètre des particules dès que 10 % de BSA-Cy3 sont employés. Il n'existe pas à notre connaissance de publications concernant les différences de comportement entre la BSA et la BSA-Cy3, toutefois il est raisonnable de penser que l'ajout du groupement Cy3 va modifier l'adsorption

de la molécule à l'interface eau/dichlorométhane lors de la préparation de l'émulsion interne, et donc au final la taille des particules obtenues.

Nous avons déterminé, après visualisation en microscopie de fluorescence, que 5 % de BSA-Cy3 étaient suffisants pour assurer une bonne détection des particules *in vivo* et *in vitro* (Figure III-11). L'objectif était de trouver la plus petite quantité de Cy3 utilisable pour limiter les interférences. En effet, si l'on veut encapsuler dans le même temps des principes actifs avec une sonde fluorescente, on veut pouvoir comparer les particules marquées avec des particules chargées seulement en molécules d'intérêt et pour cela il faut que leurs différences soient réduites au minimum.

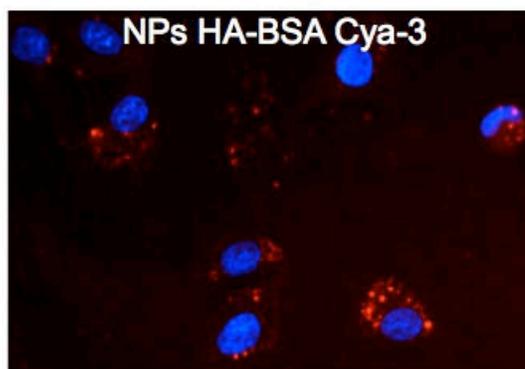


Figure III-11 : Cliché obtenu après internalisation de particules recouvertes de HAC6 et contenant de la BSA-Cy3 (5%). Les cellules sont des chondrocytes de rat (P2) et ont été mises en contact avec les particules pendant 72 heures. Les particules apparaissent en rouge et les noyaux des cellules sont marqués au DAPI (bleu).

B. Les molécules d'intérêt thérapeutique : le HA et la CS

Le HA et la CS sont des glycosaminoglycanes naturellement présents dans le cartilage (cf chapitre IV). Ces molécules jouent un rôle chondroprotecteur et sont de plus en plus utilisées et administrées dans le cas de pathologies de l'articulation, mais leur biodisponibilité reste faible. Leur encapsulation en quantité suffisante au sein des particules peut augmenter leur biodisponibilité et ainsi favoriser une éventuelle réponse biologique après injection des particules chargées dans des articulations pathologiques.

1) Principe du dosage du HA et de la CS par ECZ

Les dosages de la quantité de HA présent dans les nanoparticules (adsorbé à la surface des particules via le dérivé HAC6 et encapsulé à l'intérieur) et de CS encapsulée ont été réalisés par électrophorèse

capillaire de zone (ECZ). Il existe de nombreuses autres techniques de dosage de ces polysaccharides (HPLC, ELISA, MS, ...), mais l'ECZ a été étudiée au laboratoire LPPIA et a donné rapidement de bons résultats¹⁹.

Le dosage de ces polysaccharides par ECZ a lieu après hydrolyse enzymatique des polysaccharides. Ce dosage consiste à détecter les oligosaccharides ainsi obtenus. La dégradation enzymatique conduit à la formation d'une insaturation entre le C4 et le C5 du résidu guluronique pour le HA (Figure III-12) et la CS^{20,21}. Cette insaturation est détectée à une longueur d'onde $\lambda = 232$ nm.

Le lecteur est invité à lire le chapitre V pour prendre connaissance des protocoles expérimentaux employés pour mener à bien ces dosages.

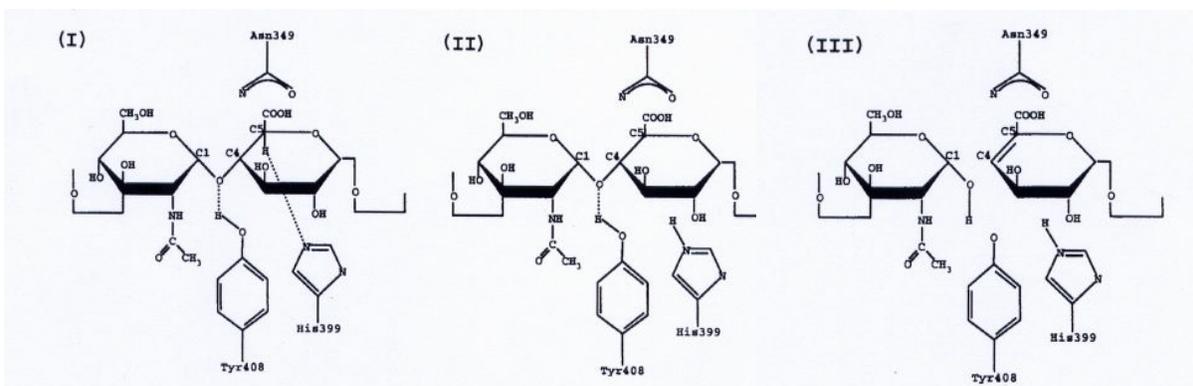


Figure III-12 : Dégradation enzymatique de l'acide hyaluronique (HA) par la hyaluronate lyase. (I) Interaction entre la fonction carboxylique du HA et l'asparagine 349 de l'enzyme, création d'une liaison hydrogène entre la tyrosine 408 et l'oxygène de la liaison glycosidique (O4) ; (II) Déprotonation 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.

2) Cas du HA en surface des particules

Payan *et al.*¹⁹ ont montré que le HA est dégradé par la hyaluronidase en tétrasaccharides et hexasaccharides. Les électrophérogrammes des dérivés du HA présentent donc 2 pics correspondants aux tétrasaccharides et aux hexasaccharides (Figure III-13).

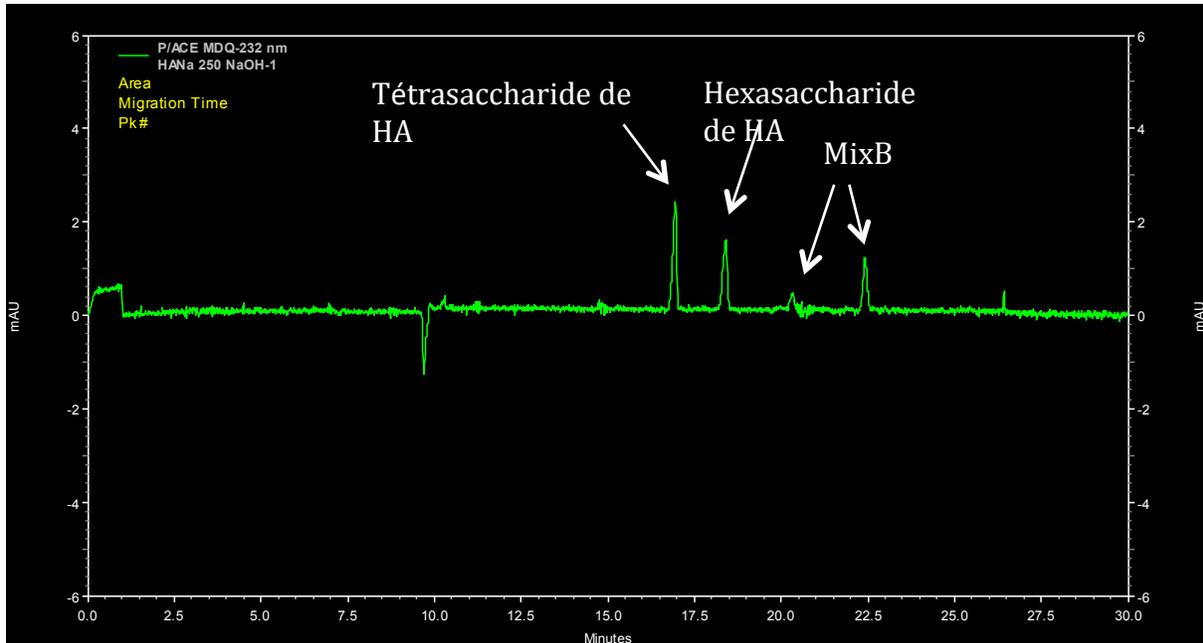


Figure III-13 : Electrophérogramme d'un point de gamme 250 µg/mL du HANa après digestion et ajout de MixB dans la solution.

Afin de déterminer la quantité de HAC6 adsorbé en surface des particules, une droite d'étalonnage a été réalisée avec du HAC6 digéré par la hyaluronidase, pour des concentrations comprises entre 0 et 250 µg/mL. Parallèlement, une suspension de particules est dégradée selon le protocole (1) décrit au chapitre V. Ce protocole nous permet d'hydrolyser la liaison ester du HAC6 et de libérer alors du HA qui était adsorbé en surface des particules sous forme de HAC6. Le surnageant contenant le HA libéré est ensuite mis au contact de la hyaluronidase. Lors de l'analyse des échantillons, une quantité connue de MixB (Beckman Coulter, USA) est rajoutée et joue le rôle d'étalon interne.

L'analyse des solutions étalons nous permet de tracer la droite d'étalonnage du HAC6 par rapport au MixB. On obtient :

$$y = 0,0087 * x$$

avec :

- y : le rapport entre les sommes des aires des pics correspondant au HA et ceux du MixB.
- x : la quantité de HA présente dans la solution.

Grâce à la droite d'étalonnage, on peut estimer la quantité de HA présente dans le surnageant des particules et donc la quantité de HAC6 adsorbée en surface des particules, par milligramme de particule (cf Chapitre V).

Des dosages de la quantité de HAC6 présente en surface de particules obtenues par double émulsion/évaporation de solvant ont été effectués à partir de deux lots différents de particules recouvertes de HABioC6-24%. Nous avons déterminé que la quantité de HAC6 en surface est de : 13,30 ($\pm 5,30$) μg de HABioC6-24% par milligramme de particule.

3) Particules contenant du HA

a) Evolution du diamètre des particules

L'encapsulation de HANA (Bioiberica) dans des particules par double émulsion entraîne une hausse importante de la taille des particules, même à faible concentration de HA dans la phase aqueuse interne. La figure III-14 représente les diffractogrammes obtenus lors de l'analyse de particules recouvertes de HABioC6-24% contenant ou non du HANA Bioiberica après lyophilisation puis resuspension et sonication. Dans le cas des particules encapsulant du HANA, 5 g/L de HANA ont été dissous dans la phase aqueuse interne.

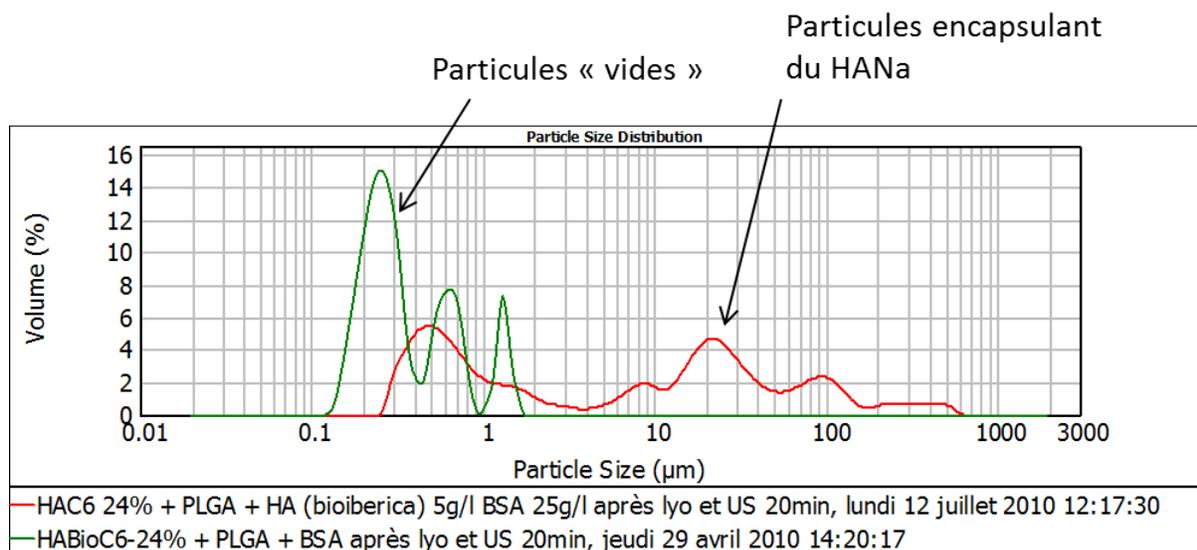


Figure III-14 : Diffractogramme obtenu après analyse de la taille des particules de HABioC6-24% « vides » (vert) ou encapsulant du HANA Bioiberica à raison de 5 g/L dans la phase aqueuse interne (rouge).

Les nombreuses tentatives pour encapsuler du HANa se sont révélées infructueuses. Même à faible concentration dans la phase aqueuse interne, nous n'avons pas pu obtenir des particules d'un diamètre suffisamment faible (inférieur à quelques microns) pour envisager une utilisation au niveau biologique de ces particules « chargées ». La forte masse molaire du HANa ainsi que sa rigidité rendent très difficile son encapsulation dans des particules submicroniques. De plus, il se peut qu'une partie du HANa soit non encapsulée, et donc présente dans la phase aqueuse externe. Cela pourrait favoriser l'agrégation des particules en créant des interactions avec le HAC6, ce qui conduirait à l'obtention de particules microniques plus grosses que les particules « vides ».

b) Dosage de la quantité totale de HA (HANa encapsulé + HAC6)

Les dosages par ECZ (en utilisant le protocole 2 décrit au chapitre V) de la quantité totale de HANa encapsulé dans les particules n'ont pas abouti. En effet, nous n'avons pas détecté de variation significative entre les dosages qui nous permettent d'estimer la quantité de HAC6 adsorbée en surface des particules et la quantité de HA total (lorsque des particules sont recouvertes de HAC6 et encapsulent du HANa). Nous avons été obligés de travailler avec de petites quantités de particules (10 mg environ) à chaque fois et il se peut que le protocole que nous avons établi ne soit pas adapté pour de si petites quantités (principalement la phase d'évaporation du THF). De plus, l'évaporation du THF fait précipiter le PLGA et il se peut que celui-ci piège une partie des HA présents dans la solution en précipitant. Une nouvelle méthode de dosage de la quantité de HANa encapsulé est en cours de développement. Elle doit permettre d'obtenir une meilleure sensibilité, et donc, faciliterait les analyses même sur de petites quantités de particules.

4) Particules contenant de la CS

a) Evolution du diamètre

L'encapsulation de chondroïtine sulfate dans les particules entraîne, tout comme pour le HANa, une hausse importante de leur taille même si de faibles concentrations de CS sont incorporées dans la phase aqueuse interne. La figure III-15 montre la distribution en taille des particules obtenues après lyophilisation puis redispersion de particules recouvertes de HABioC6-24% et contenant de la chondroïtine sulfate (0 ; 5 ; 10 et 25 g/L de CS dans la phase aqueuse interne).

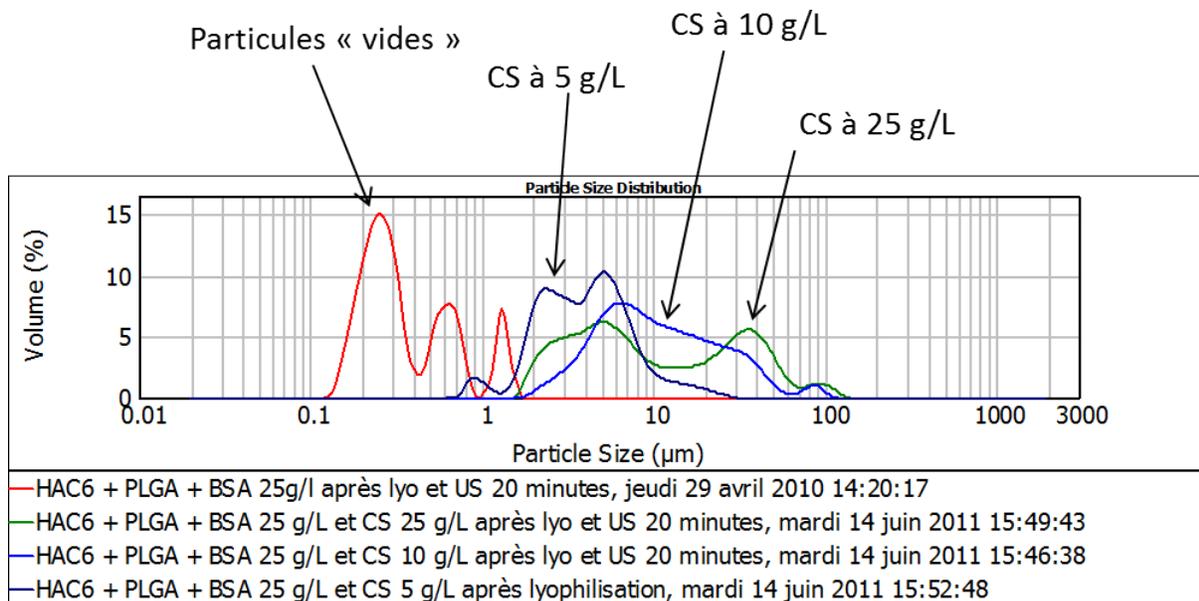


Figure III-15 : Diffractogrammes obtenus après analyse de la taille des particules de HABioC6-24% « vides » (rouge) ou encapsulant de la chondroïtine sulfate à 5 g/L (noir), 10 g/L (bleu) et 25 g/L (vert) dans la phase aqueuse interne.

On peut constater que la taille des particules augmente avec la quantité de CS dans la phase aqueuse. Toutefois, lorsque la concentration en CS dans la phase aqueuse interne est de 5 g/L, on obtient des particules dont le diamètre est inférieur à 10 µm. Une évaluation biologique de ces objets est donc possible.

b) Dosage de la quantité de CS encapsulée

La dégradation de la CS par la chondroïtinase ABC conduit à la formation de disaccharides de CS¹⁹. On observe donc un seul pic correspondant à la CS sur l'électrophérogramme (Figure III-16).

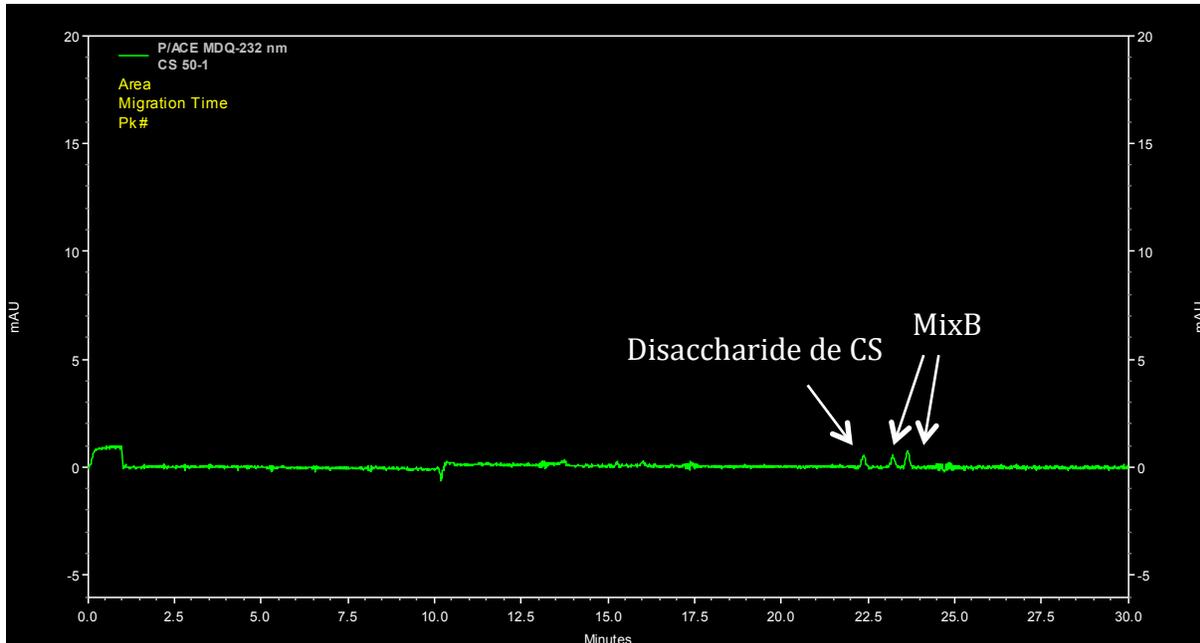


Figure III-16 : Electrophérogramme du point de gamme 50 (50 µg/mL) de la CS après dégradation enzymatique.

Tout comme lors de l'encapsulation du HANA, le dosage par ECZ de la quantité de chondroïtine sulfate encapsulée ne s'est pas révélé concluant. La quantité de CS libérée dans les surnageants est trop faible pour être détectée. La même méthode d'analyse que pour le HANA est en cours de développement pour diminuer le seuil de détection de ces composés.

C. Conclusion sur l'encapsulation de molécules d'intérêt

Les essais d'encapsulation du HA et de la CS sont peu concluants. Même dissous à faible concentration dans la phase aqueuse interne, ils entraînent une forte augmentation de la taille des particules. Cette évolution était prévisible pour le HANA qui est une molécule de haut poids moléculaire et peu flexible. Par contre, la CS possède un poids moléculaire inférieur à $100\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ et nous ne nous attendions pas à rencontrer de telles difficultés.

Le dosage de la quantité encapsulée de ces molécules d'intérêt n'a pas été possible en raison de la difficulté de préparer des lots de particules non agrégés et de la faible quantité de HA ou de CS encapsulée. Une nouvelle méthode de dosage de ces polysaccharides est à l'étude. Elle devrait permettre de doser directement de faibles quantités, sans avoir recours à la digestion enzymatique. On pourrait ainsi s'affranchir de toutes les étapes de préparation des échantillons pour l'ECZ qui peuvent fausser la quantification.

Conclusions du chapitre

Nous avons montré que malgré de faibles propriétés tensio-actives, les dérivés amphiphiles du HA (HAC6) peuvent être utilisés comme stabilisants pour la formulation d'émulsions.

Les particules préparées par double émulsion/évaporation de solvant en utilisant des HAC6 de faible masse molaire ne sont pas monodisperses, et on distingue plusieurs populations variant de 200 nm à 2 µm de diamètre. Ces particules sont lyophilisables et facilement redispersables sans ajout de lyoprotecteur supplémentaire et sans que l'on puisse constater d'augmentation de leur taille après lyophilisation. Le protocole de formulation défini permet d'obtenir, de manière reproductible, cette distribution en taille.

La quantité de HAC6 en surface des particules a pu être estimée par électrophorèse capillaire de zone. On trouve environ 13 µg de HAC6 par milligramme de particule. Cette valeur est faible, mais suffisante pour favoriser des interactions avec les chondrocytes comme nous le verrons dans le chapitre IV de ce manuscrit.

Nous avons pu encapsuler des molécules fluorescentes pour pouvoir utiliser les nanoparticules lors de tests biologiques. Toutefois, il ne nous a pas été permis de doser de manière précise les quantités encapsulées.

Concernant l'encapsulation de glycosaminoglycane (HANA et CS), même à faible concentration ils entraînent une forte hausse de la taille des particules. De plus les quantités encapsulées n'ont pas pu être détectées en électrophorèse capillaire de zone. Une nouvelle technique de dosage dite : Blyscan (Biocolor, UK) est à l'étude. Cette méthode est plus sensible que l'ECZ et semble mieux adaptée pour la détection de glycosaminoglycane.

Malgré toutes ces difficultés, les particules obtenues ont pu être testées au niveau biologique pour évaluer dans un premier temps leur biocompatibilité *in vitro*, ainsi que leur internalisation par les chondrocytes. Nous avons ensuite injecté des particules fluorescentes dans des articulations de rat sain pour étudier leur localisation *in vivo*.

Si le procédé d'émulsification au moyen d'une sonde à ultrasons permet d'obtenir des particules de faible diamètre, il n'est pas adapté à la préparation d'une quantité importante de particules. L'un des points d'amélioration majeur de cette partie est le passage à une production à plus grande échelle d'un lot homogène de nanoparticules.

L'optimisation des conditions d'encapsulation du HANa et de la CS doit être poursuivie afin d'obtenir des particules d'un diamètre plus faible. De la même manière, la détermination du taux d'encapsulation de ces molécules est à optimiser (quantité de particules utilisées plus importante, autre technique d'analyse, ...)

L'encapsulation de molécules hydrophobes est envisagée ; la formulation de particules par simple émulsion permet d'obtenir des diamètres de particules plus faibles, et donc, facilite l'internalisation par les cellules.

L'étude des cinétiques de libération des molécules encapsulées sera menée par la suite afin de caractériser totalement le système particule/principe actif formulé.

Références Bibliographiques

1. Aumelas, A., Serrero, A., Durand, A., Dellacherie, E. & Leonard, M. Nanoparticles of hydrophobically modified dextrans as potential drug carrier systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **59**, 74–80 (2007).
2. Astete, C. E. & Sabliov, C. M. Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. *J Biomater Sci Polym Ed* **17**, 247–289 (2006).
3. Sahana, D. K., Mittal, G., Bhardwaj, V. & Kumar, M. N. V. R. PLGA nanoparticles for oral delivery of hydrophobic drugs: influence of organic solvent on nanoparticle formation and release behavior in vitro and in vivo using estradiol as a model drug. *J Pharm Sci* **97**, 1530–1542 (2008).
4. Jason Coleman, A. L. Biodegradable Nanoparticles for Protein Delivery: Analysis of Preparation Conditions on Particle Morphology and Protein Loading, Activity and Sustained Release Properties. *Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition* **23**, 1129-1151 (2012)
5. A Nimrodh Ananth, S. C. G. K. D. PVA and BSA stabilized silver nanoparticles based surface-enhanced plasmon resonance probes for protein detection. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* **85**, 138–44 (2011).
6. Williams, J. M., Rayan, V., Sumner, D. R. & Thonar, E. J.-M. A. The use of intra-articular N-hyaluronate as a potential chondroprotective device in experimentally induced acute articular cartilage injury and repair in rabbits. *J. Orthop. Res.* **21**, 305–311 (2003).
7. Sen, C. *et al.* [The chondroprotective effect of intra-articular hyaluronic acid at early stages of osteoarthritis: an experimental study in rabbits]. *Acta Orthop Traumatol Turc* **38**, 348–352 (2004).
8. Hungerford, M. W. & Valaik, D. Chondroprotective agents: glucosamine and chondroitin. *Foot Ankle Clin* **8**, 201–219 (2003).
9. Nouvel, C. *Synthèse contrôlée de copolymères dextrane-g-poly lactide: de leur utilisation comme surfactifs biodégradables à la mise en œuvre de systèmes de vectorisation particuliers.* (Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, 2002).
10. Nouvel, C. *et al.* Biodegradable nanoparticles made from polylactide-grafted dextran copolymers. *Journal of Colloid And Interface Science* **330**, 337–343 (2009).
11. Leonard, M. *et al.* Chapter 23: Preparation of Polysaccharide-Covered polymeric Nanoparticles by Several Processes Involving Amphiphilic Polysaccharides. *Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Passivation, and Functionalization* (Edition OUP USA, 2008 , ISBN: 978-0841269699)
12. Laroui, H. *Nanosphères polymères à couverture de hyaluronate pour la délivrance ciblée de molécules actives dans le traitement des affections du cartilage.* (Doctorat de l'Université Nancy 1: 2007).
13. <http://bbs.instrument.com.cn/shtml/20081028/1553638/>.
14. Jeong, Y.-I. *et al.* Effect of cryoprotectants on the reconstitution of surfactant-free nanoparticles of poly(DL-lactide-co-glycolide). *J Microencapsul* **22**, 593–601 (2005).
15. Lee, M. K., Kim, M. Y., Kim, S. & Lee, J. Cryoprotectants for freeze drying of drug nano-suspensions: effect of freezing rate. *J Pharm Sci* **98**, 4808–4817 (2009).
16. Thorball, N. FITC-Dextran tracers in microcirculatory and permeability studies using combined fluorescence stereo microscopy, fluorescence light microscopy and electron microscopy. *Histochemistry and Cell Biology* **71**, 209–233 (1981).
17. Hermanson, G. T. *Bioconjugate Techniques.* (Edition Academic Press: 2008, ISBN 978-0123705013).
18. Safari, S. *et al.* Evaluation and optimization of chitosan derivatives-based gene delivery system via kidney epithelial cells. *Advanced Pharmaceutical Bulletin* **2**, 7 (2012).

19. Payan, E. *et al.* Separation and quantification by ion-association capillary zone electrophoresis of unsaturated disaccharide units of chondroitin sulfates and oligosaccharides derived from hyaluronan. *Anal. Chem.* **70**, 4780–4786 (1998).
20. Ponnuraj, K. & 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.* **299**, 885–895 (2000).
21. Yamagata, T., Saito, H., Habuchi, O. & Suzuki, S. Purification and Properties of Bacterial Chondroitinases and Chondrosulfatases. *J. Biol. Chem.* **243**, 1523–1535 (1968).

Chapitre IV : Description des articulations synoviales, des pathologies associées et évaluation biologique des particules synthétisées.

I. Les articulations

En anatomie, une articulation est définie comme la jonction entre deux ou plusieurs os. Les articulations sont divisées en trois groupes suivant la mobilité relative des os entre eux.

On distingue ainsi :

- Les synarthroses qui sont des articulations immobiles dont les os sont dépourvus de cartilage à leur extrémité et qui ne contiennent pas de membrane synoviale (suture crânienne).
- Les amphiarthroses, articulations peu mobiles sans membrane synoviale mais où l'on retrouve du cartilage sur les surfaces osseuses et des ligaments (symphyse pubienne).
- Les diarthroses, articulations les plus fréquemment rencontrées au niveau du corps humain, ce sont elles qui permettent le mouvement (genou).

Dans le cas des diarthroses (Figure IV-1), les surfaces des os sont recouvertes de cartilage articulaire et l'articulation est délimitée par une capsule constituée d'une enveloppe fibreuse dont la paroi interne est recouverte d'un tissu appelé membrane synoviale. Les os sont joints entre eux via des ligaments (tissus conjonctifs fibreux composés principalement de collagène). L'intérieur de l'articulation baigne dans un fluide sécrété par la membrane synoviale : le liquide synovial.

Au sein de l'articulation, on retrouve également des tendons qui sont le point d'ancrage des muscles sur l'os. Dans certains cas (genou notamment), l'articulation possède des ménisques, coussinets de cartilage fibreux insérés entre les surfaces osseuses, qui permettent d'améliorer la stabilité de l'articulation en épousant la forme des os et des bourses séreuses, cavités fermées constituées de tissu conjonctif et contenant du liquide synovial¹.

Les diarthroses sont donc du fait de leur capsule articulaire des systèmes isolés et stériles.

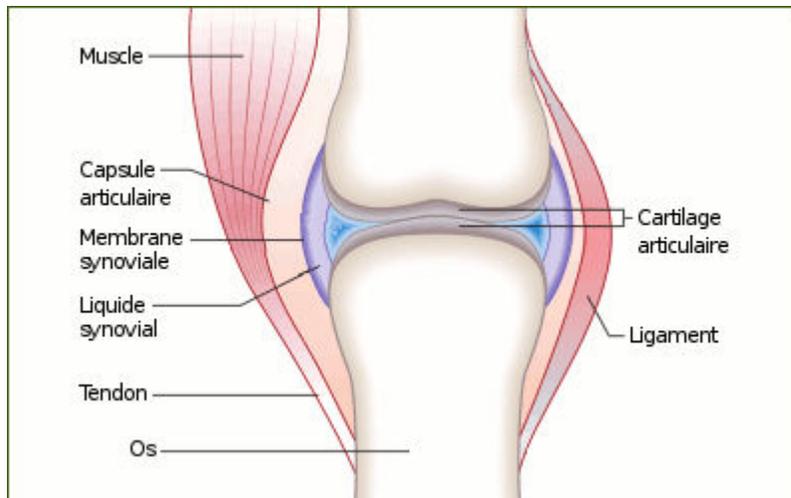


Figure IV-1: Schéma d'une diarthrose (<http://www.info-arthrite.fr/articulations.php>).

Pour la suite de cette étude, nous nous intéresserons seulement aux diarthroses dans la mesure où ce sont les articulations que nous avons étudiées et à partir desquelles nous avons obtenu les résultats qui seront présentés dans les pages de ce manuscrit.

II. Les différents composants d'une diarthrose

A. Le cartilage articulaire

Le cartilage est un tissu conjonctif hautement spécialisé constitué de matrice extracellulaire et d'un seul type cellulaire : le chondrocyte. Il est de plus non vascularisé et non innervé ce qui rend son développement et sa réparation lents. Le développement des tissus cartilagineux se fait à partir de cellules mésenchymateuses. Celles-ci se différencient en chondroblastes qui vont se diviser et sécréter de la matrice extracellulaire (MEC) dont ils vont être peu à peu entourés. On parle alors de chondroblastes enfermés dans une lacune. Ils vont encore s'y diviser et produire de la MEC autour d'eux jusqu'à être isolés dans les lacunes, on parle alors de chondrocyte.

Il existe trois types de cartilage qui diffèrent essentiellement par leur composition moléculaire (et donc par leurs propriétés)² :

- Le cartilage hyalin (ou articulaire) se situe à la surface des os constitutifs des articulations synoviales. Le terme hyalin provient de sa couleur blanchâtre légèrement bleutée qui rappelle la

couleur du verre. Sa matrice extracellulaire est riche en protéoglycanes et en fibres de collagène (collagène de type II, IX et XI) synthétisés par les chondrocytes. Grâce à son coefficient de friction très faible et ses propriétés de résistance aux forces de compression et d'élasticité, le cartilage hyalin assure le glissement des surfaces osseuses lors des mouvements et l'amortissement des chocs. Il se comporte de plus comme une éponge. En effet, les protéoglycanes sont chargés négativement et peuvent capter de nombreuses molécules d'eau. En plus des articulations, ce cartilage est présent au niveau du nez et des côtes.

- Le cartilage élastique ressemble au cartilage hyalin par sa composition mais est plus riche en fibres élastiques et en collagène de type II ce qui lui donne une couleur jaunâtre. Sa densité cellulaire est aussi plus élevée. Il constitue par exemple la trompe d'eustache ou le pavillon de l'oreille, qui nécessitent une bonne capacité d'extension et de résistance. Ces propriétés proviennent des fibres élastiques constitutives qui forment un réseau tridimensionnel.
- Le fibrocartilage est un intermédiaire entre le cartilage hyalin et le tissu conjonctif. Il est riche en collagènes et notamment en collagène de type I formant un faisceau de fibres orientées selon les lignes de contraintes mécaniques auxquelles est soumis le cartilage. Les chondrocytes y sont disposés en rangées alternées avec les faisceaux de collagène. Ce type de cartilage possède de grandes capacités de compressibilité et de résistance aux tensions. On retrouve notamment le fibrocartilage dans la composition des disques intervertébraux.

La suite de cette étude sera uniquement consacrée au cartilage hyalin.

1) Description du cartilage hyalin

Macroscopiquement, le cartilage présente une surface blanche un peu translucide, lisse et brillante. C'est un matériau légèrement souple et déformable sous une contrainte faible. L'épaisseur du cartilage à la surface des articulations est d'environ 5 à 7 mm³. Dans le cartilage de croissance, le chondrocyte est le siège d'un processus de maturation cellulaire actif et complexe qui aboutit *in fine* à l'ossification enchondrale⁴, contrairement au cartilage adulte au niveau duquel le processus de maturation cellulaire est extrêmement ralenti. Ceci semble secondaire à l'arrêt de recrutement de préchondrocytes ou de chondrocytes jeunes, qui impose une maturation cellulaire presque figée de manière à conserver la hauteur et la présence du cartilage⁵. Parallèlement, le processus d'apoptose qui est le processus final de la maturation cellulaire est en grande partie absent dans le cartilage articulaire normal.

La composition du cartilage n'est pas la même en tout point du tissu, les chondrocytes ainsi que les constituants de la MEC sont organisés selon un ordre défini. Il n'existe pas au sein du cartilage de stades successifs de différenciation et de maturation puisque le tissu n'évolue que très peu. En revanche, on peut distinguer plusieurs couches qui diffèrent par leur composition biochimique (teneur en protéoglycanes) et anatomique (nombre de cellules et disposition des fibres de collagène).

Le cartilage articulaire est ainsi divisé en quatre zones au sein desquelles la composition de la matrice extracellulaire, la forme, la taille et l'activité métabolique des chondrocytes sont différentes.

Il existe à la surface du cartilage une zone acellulaire recouvrant la couche superficielle appelée *lamina splendenda*. Elle sert d'une part de point d'ancrage aux macromolécules issues du liquide synovial et d'autre part joue le rôle de barrière protectrice qui limite l'action des radicaux libres sur le cartilage. Cette couche est notamment composée d'acide hyaluronique (HA), de lubricine et de certains phospholipides³.

En dessous de cette zone et en s'approchant de l'os sous chondral on trouve successivement :

- La couche superficielle (entre 5 et 10 % de la hauteur totale). Les chondrocytes y sont plats, petits (ils ont une allure fibroblastique) et sont disposés de manière parallèle à la surface articulaire. Cette zone riche en fibronectine et en eau, est pauvre en protéoglycanes. On y trouve également du collagène de type I et de type III. La disposition des fibres de collagène qui la composent est caractéristique : celles-ci sont orientées parallèlement à la surface, ce qui lui permet de résister aux fortes tensions.
- Une couche intermédiaire représentant 40 à 45 % de l'épaisseur totale du cartilage. Cette zone est constituée d'un réseau non orienté de collagènes (types II, IX et XI) plus lâche que la zone superficielle. Cette zone est plus riche en protéoglycanes mais la quantité d'eau présente y est plus faible. Les chondrocytes y sont sphériques et plus gros, ils possèdent un appareil de Golgi et un réticulum endoplasmique plus développé ce qui témoigne d'une activité plus importante.
- La couche profonde contient aussi des collagènes de type II, IX et XI mais ceux-ci sont orientés de façon perpendiculaire à la surface, de même que les chondrocytes présents (disposés en colonnettes perpendiculaires à la surface). Cette zone représente 40 à 45 % de la hauteur totale du cartilage. La quantité de protéoglycanes y est la plus forte et la quantité d'eau la plus faible.
- La couche calcifiée (5 à 10 % de la hauteur totale) qui est la plus proche de l'os sous chondral. Les chondrocytes présents sont de type hypertrophique. La quantité de protéoglycanes est faible 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 zone est en voie de calcification. Cette couche est séparée de la zone profonde par une couche protéique basophile nommée "tide-mark", correspondant à un enchevêtrement extrêmement dense de fibres de collagène⁶. Cette tide-mark constitue une barrière interdisant la pénétration des vaisseaux présents dans l'os sous-chondral, mais laissant passer certains constituants.

2) Les chondrocytes

Le cartilage articulaire est constitué d'un seul type de cellules : les chondrocytes. Ils sont issus de cellules mésenchymateuses très différenciées. La différenciation fait intervenir notamment Sox9 ainsi que L-Sox5 et Sox6⁷ (Figure IV-2).

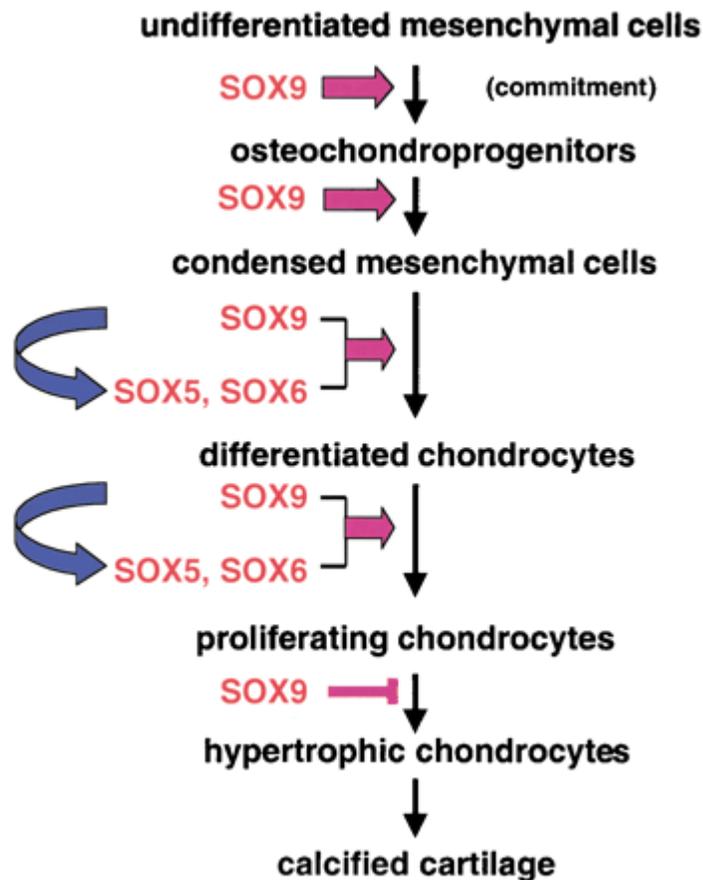


Figure IV-2 : Voie de différenciation des cellules mésenchymateuses en chondrocytes
 (<http://genesdev.cshlp.org/content/16/21/2813.full.pdf+html>).

Les chondrocytes représentent environ 10% du volume total du cartilage (1 à 10 % du total sec). Ce sont des cellules quiescentes (qui ne se divisent pratiquement pas) et très peu mobiles. Elles sont de plus isolées au sein de la matrice extracellulaire. L'environnement immédiat du chondrocyte est pauvre en collagène de type II et forme avec la cellule « le chondron » : c'est un espace où le pH est plus acide (pH 6,1) que dans le reste du tissu (pH 7,4). Cette acidité permet l'activation d'enzymes lysosomiales (cathepsines B) qui peuvent dégrader la matrice extracellulaire. De plus, dans cet espace péricellulaire, les protéoglycanes et les collagènes présents, comme par exemple le collagène de type VI, sont utilisés pour réaliser l'ancrage des chondrocytes à la matrice par l'intermédiaire de protéines membranaires. L'anchorine CII est une protéine d'attachement qui interagit avec le collagène de type II. Des protéoglycanes insérés dans la membrane plasmique des chondrocytes peuvent aussi servir de lien entre la cellule et la matrice extracellulaire. Ces protéoglycanes sont composés d'un sulfate d'héparane et d'une protéine axiale appartenant à la famille des syndécanes ou des biglycanes.

Les chondrocytes sont des cellules sphériques ou ovoïdales mesurant entre 20 et 40 μm de diamètre⁵. Elles ont un noyau développé, sont riches en lysosomes, en mitochondries et en vacuoles de glycogène et lysosomiales (Figure IV-3). Du fait de l'avascléarisation du cartilage, les cellules fonctionnent principalement en hypoxie⁸. Il existe un gradient hypoxique qui varie de 1 à 10 % des profondeurs du cartilage vers la surface. Les chondrocytes les plus proches de la surface peuvent ainsi fonctionner en aérobie partielle grâce à la diffusion des gaz présents dans le liquide synovial⁹. Leur principal substrat énergétique est le glucose, celui-ci intervient de plus dans la synthèse de protéoglycanes (conversion du glucose en glucosamine)¹⁰.

Les caractéristiques des chondrocytes (forme, taille, ...) ainsi que leur nombre varient en fonction des individus, des articulations considérées et de la zone du cartilage dans laquelle ils évoluent.

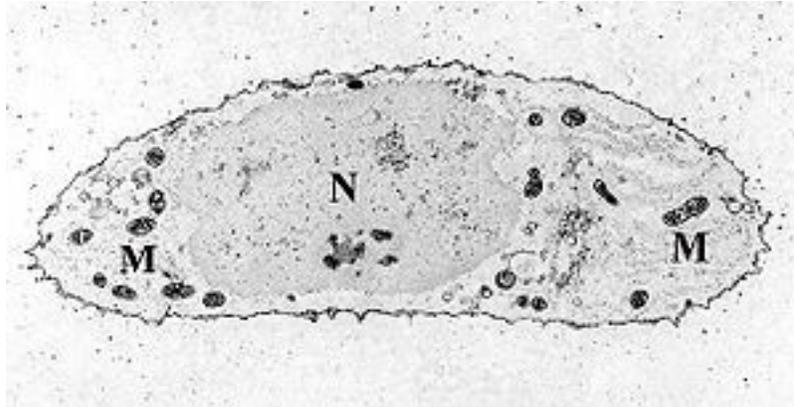


Figure IV-3 : Cliché d'un chondrocyte observé en microscopie électronique à balayage, les lettres M et N représentent respectivement les mitochondries et le noyau de la cellule (<http://www.answers.com/topic/mitochondrion>).

Le rôle des chondrocytes est de synthétiser les différents composants de la matrice extracellulaire et éventuellement de produire des enzymes pouvant dégrader ces composants afin d'assurer le bon fonctionnement du tissu (homéostasie). Ils synthétisent ainsi les fibres de collagène, les protéoglycanes et les molécules non collagéniques. Ils peuvent aussi (notamment dans les cas pathologiques) produire des cytokines pro-inflammatoires qui vont augmenter la synthèse et l'activité de différentes enzymes (hyaluronidases¹¹, agrécanases, métalloprotéases¹², ...) responsables de la destruction des constituants du cartilage. L'activité métabolique des chondrocytes est en permanence influencée par leur environnement et les divers stimuli auxquels ils peuvent être soumis.

3) La matrice extra cellulaire (MEC)

La MEC constitue 95 % du cartilage. Elle est essentiellement composée d'eau (65 à 80 % du poids humide) et de macromolécules (protéines, glycosaminoglycanes). On y trouve aussi de nombreux cations (Ca^{2+} , ...) présents afin de contrer électriquement les charges négatives des protéoglycanes¹³. Ainsi, la matrice extracellulaire est une sorte de gel renforcé par des fibres. Elle assure la protection hydrodynamique du chondrocyte.

On peut distinguer trois zones : la matrice péricellulaire qui se trouve à proximité des chondrocytes, la matrice territoriale et enfin la matrice interterritoriale (la plus éloignée des cellules).

Au voisinage de la cellule, le pH est plus acide pour favoriser l'activité enzymatique. La zone péricellulaire est riche en protéoglycanes sulfatés, acide hyaluronique, biglycanes, collagènes de type VI et molécules non collagéniques telles que l'anchoring ou la fibronectine.

Les autres zones de la matrice extracellulaire sont à pH physiologique. Elles sont principalement composées de collagène (de type II) et de protéoglycanes¹³. La matrice extracellulaire territoriale retrouvée principalement dans les couches superficielle, intermédiaire et profonde du cartilage, est constituée de fibres de collagènes de large diamètre et de forte concentration de protéoglycanes riches en chondroïtine sulfate. La matrice interterritoriale contient des protéoglycanes particulièrement riches en kératane sulfate, et des collagènes majoritairement retrouvés sous forme de fibres de gros diamètre.

4) Les collagènes

Les fibres de collagènes sont des macromolécules formées de trois chaînes polypeptidiques enroulées en hélice. Chaque chaîne possède des domaines collagéniques qui sont des répétitions d'un triplet d'acides aminés de type Glycine-X-Y (où X et Y sont une fois sur trois la proline et l'hydroxyproline). La glycine étant le plus petit acide aminé, elle facilite l'enroulement de la triple hélice. Lorsque trois chaînes de collagène sont identiques on parle d'homotrimère, en revanche, on parle d'hétérotrimère si au moins une des chaînes est différente.

Le collagène subit des modifications post-traductionnelles indispensables à la formation de la triple hélice : il s'agit d'hydroxylations et de glycosylations. Les gènes codants pour les collagènes synthétisent des protéines appelées pro-collagènes qui sont les précurseurs des collagènes matures (Figure IV-4). Dans la lumière du réticulum endoplasmique granulaire, les monomères de pro-collagène sont liés entre eux pour former une triple hélice sauf au niveau de leurs extrémités qui possèdent des acides aminés différents (appelés pro-peptides). Les triples hélices de pro-collagène sont ensuite transportées dans la matrice via des vésicules où des pro-peptidases vont réduire les extrémités terminales et ainsi former une triple hélice de collagène fonctionnel¹⁴. Ces triples hélices de collagène vont ensuite s'associer entre elles pour former des fibrilles qui vont à leur tour s'associer pour former des fibres (Figures IV-4 et IV-5).

Cette association n'est cependant pas systématique. Lorsque les fibrilles se groupent en fibres, on parle de collagène fibrillaire. On en trouve des types majoritaires, comme les collagènes de type I, II et III et des formes minoritaires, le V et le XI. Les collagènes non fibrillaires peuvent s'associer aux collagènes

fibrillaires (c'est le cas des types IX, X et XII) ou former des réseaux comme pour le collagène de type IV dans les lames basales ou le collagène de type VII.

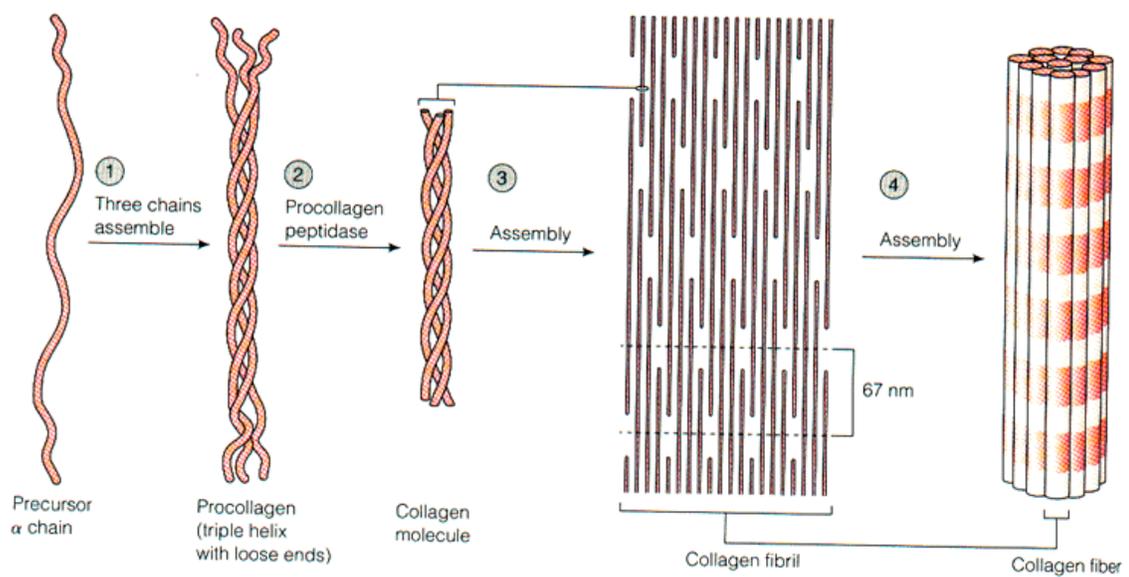


Figure IV-4 : Les différentes étapes de la formation de fibres de collagène à partir de pro-collagènes (http://www-3.unipv.it/webbio/anatcomp/freitas/2009-2010/biocell_LSBUSB09-10.htm).

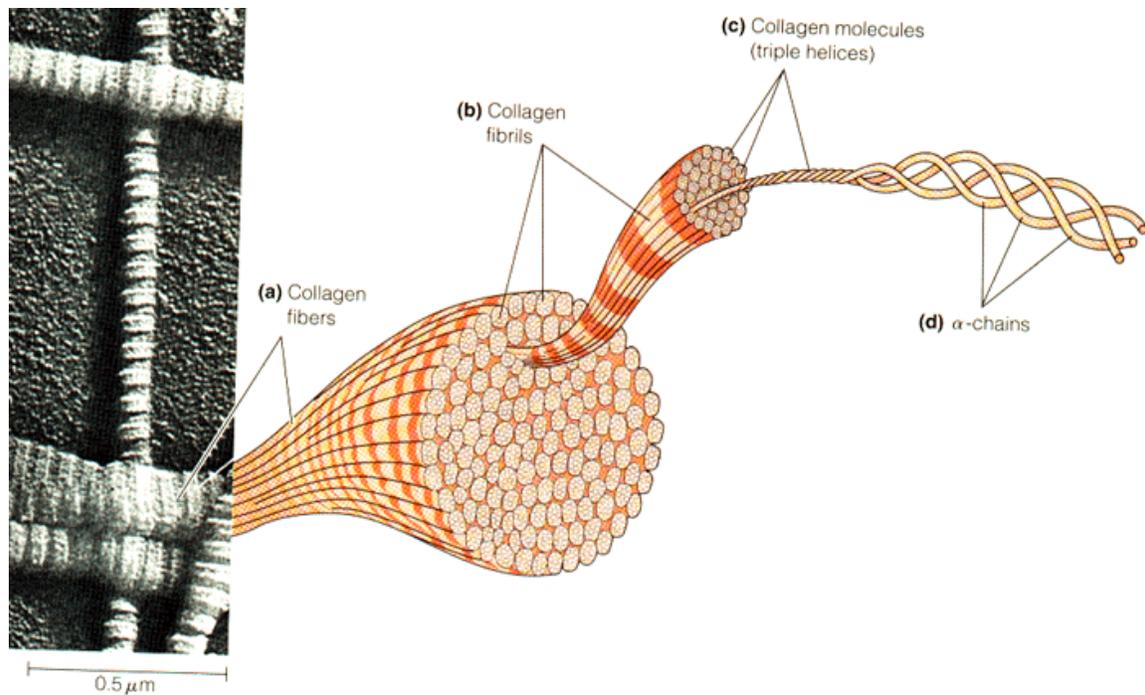


Figure IV-5 : Structure d'une fibre de collagène (<http://course1.winona.edu/sberg/ILLUST/fig11-2.gif>).

Au niveau articulaire, les fibres de collagène constituent jusqu'à 25 % du poids sec du cartilage¹. Au moins cinq types de collagènes ont pu être isolés et identifiés dans le cartilage (type II, VI, IX, X, XI). Le collagène de type II est le plus abondant (entre 80 et 90 %), il est responsable de la résistance à la compression du cartilage. C'est un marqueur du chondrocyte sain, cependant il n'est pas spécifique au cartilage car on le retrouve également dans d'autres tissus (au niveau de la cornée notamment). Le collagène de type VI semble impliqué dans l'adhésion des chondrocytes à la matrice extracellulaire. Le collagène de type IX se lie de manière covalente aux fibres de collagène de type II et favoriserait les interactions fibrilles-fibrilles et fibrilles-protéoglycanes. Le collagène de type X est le seul à être spécifique du cartilage. On le retrouve à proximité des chondrocytes hypertrophiques (zone calcifiée) et il semble intervenir dans le processus de minéralisation. Le collagène de type XI forme avec les collagènes de type II et IX des fibrilles de collagène¹⁵ observées dans le cartilage (Figure IV-6).

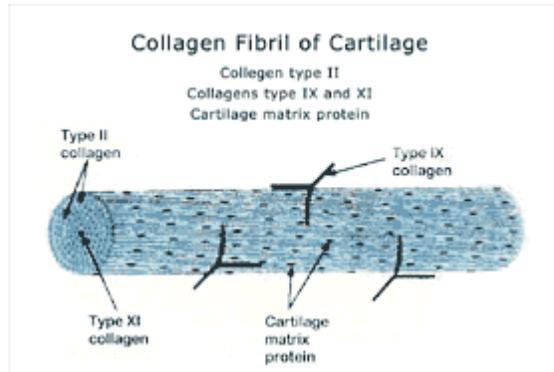


Figure IV-6 : Association entre collagènes de type II, IX et XI au sein de la MEC
 (<http://www.cellprep.com.ar/tecnologia/cultivo/protocolo2/implante.htm>).

5) Les protéoglycanes

Les protéoglycanes sont le résultat de la combinaison entre une protéine (appelée protéine porteuse) et un glycosaminoglycane. Cette structure est ensuite liée via une protéine dite de liaison à une longue chaîne d'acide hyaluronique.

Les glycosaminoglycanes (GAGs) (Figure IV-7) sont des polysaccharides dont le motif de répétition est composé d'un sucre aminé et d'un hexuronate. Cette famille de composés regroupe le kératane sulfate, l'héparine, la chondroïtine sulfate, le dermatane sulfate et l'acide hyaluronique (HA)¹⁶. On retrouve ces GAGs dans des proportions variables selon la zone du cartilage considérée. Il est à noter que le HA est le seul qui n'est pas fixé à une protéine porteuse et qui n'est pas sulfaté.

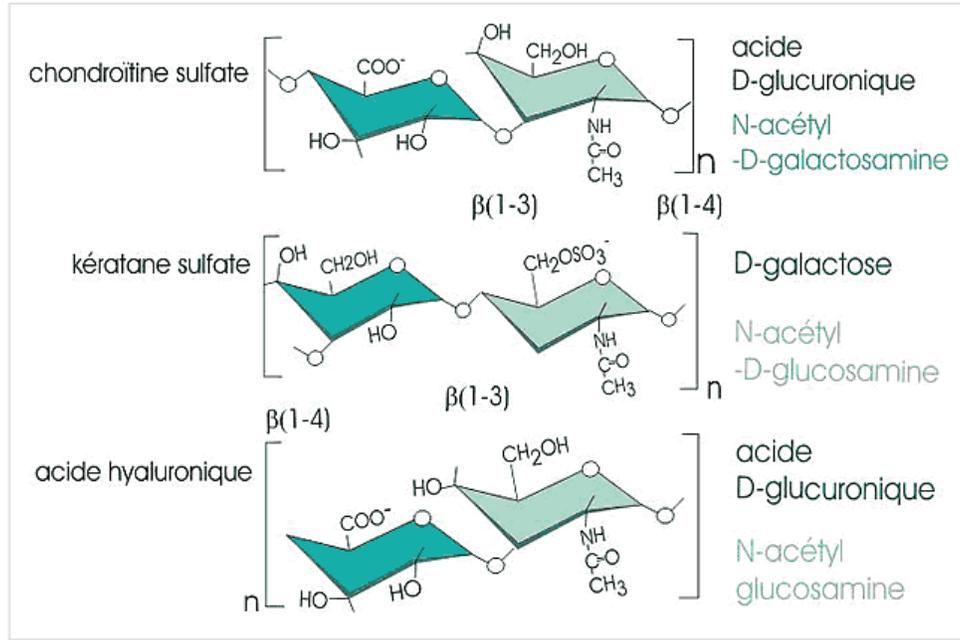


Figure IV-7 : Motif de répétition des GAGs (http://www.ulyse.u-bordeaux.fr/atelier/ikramer/biocell_diffusion/gbb.cel.fa.103.b3/content/access.htm).

Ces molécules contiennent au minimum une charge négative par motif disaccharidique. Ceci permet aux longues chaînes de capter des cations (Ca^{2+} et Na^+ principalement) qui vont à leur tour attirer des molécules d'eau et ainsi créer une pression osmotique. Ceci va maintenir d'une part l'hydratation du cartilage et d'autre part permettre la tension des fibres de collagène et donc conférer ses propriétés élastiques au cartilage.

Les protéoglycanes sont produits essentiellement dans l'appareil de Golgi, mais également au niveau du réticulum endoplasmique granulaire des chondrocytes. Ils sont ensuite transportés hors de la cellule, le plus souvent par exocytose, ou vont entrer dans la composition de la membrane plasmique.

Il existe deux types de protéoglycanes au sein du cartilage. On distingue ainsi les protéoglycanes de masse molaire élevée qui représentent 90 % des protéoglycanes totaux (l'agrécane est le plus abondant) et ceux de masse molaire faible.

L'agrécane est constitué d'une protéine porteuse d'environ 250 kDa sur laquelle sont fixées une centaine de chaînes de chondroïtine sulfate ainsi qu'une trentaine de chaînes de kératane sulfate (Figure IV-8). Le domaine N-terminal de la protéine porteuse est lié de façon covalente à une glycoprotéine (la protéine de liaison) laquelle va se fixer sur la chaîne de HA. On peut ainsi avoir plus de 300 molécules d'agrécane fixées sur le squelette de HA, ces super-agrégats pouvant mesurer jusqu'à 10 μm et posséder une masse

moléculaire de 5×10^5 Da. Ils créent ainsi de larges domaines hydrodynamiques entre les fibres de collagène. En vieillissant, le ralentissement du métabolisme des chondrocytes entraîne une diminution de la quantité de protéoglycanes, ce qui détériore les propriétés mécaniques du cartilage¹⁷.

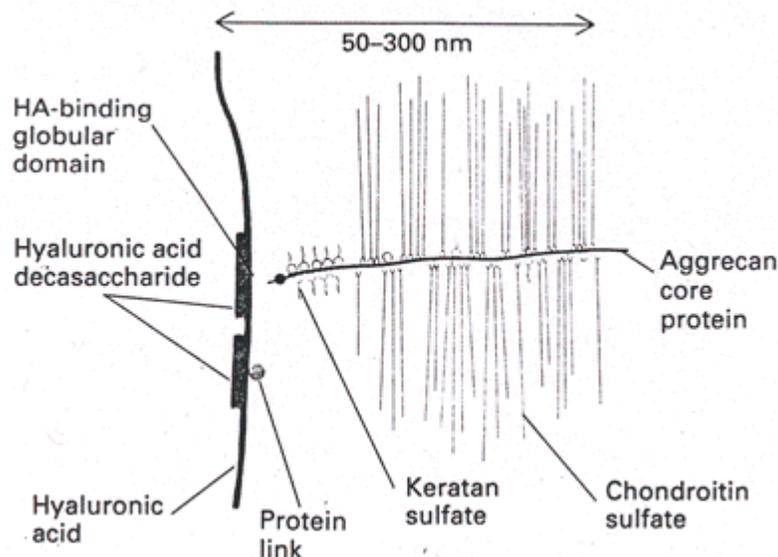


Figure IV-8 : Représentation d'une molécule d'agrécane
(<http://stevetakeshisfirststep.wordpress.com/tag/rheumatology/>).

Les protéoglycanes de faible masse molaire ne représentent que 3 % du tissu cartilagineux. Ce ne sont pas des molécules spécifiques au cartilage. Les plus importants sont le biglycane, la décorine et la fibromoduline ; ils interagissent avec les fibres de collagène par association¹⁶. Ces protéoglycanes possèdent la même protéine porteuse, seule la quantité et le type de GAG varie. 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.

La décorine et la fibromoduline contrôlent le diamètre des fibres de collagène durant la fibrillogénèse. On retrouve le biglycane principalement au voisinage des chondrocytes, il peut interagir avec le collagène de type VI¹⁶.

D'un point de vue général, ces molécules se lient aux autres macromolécules et semblent influencer l'organisation de la matrice extracellulaire et la fonction des chondrocytes.

6) Les protéines non collagéniques

Leur rôle est mal défini car elles ont fait l'objet de moins d'études que les collagènes ou les protéoglycanes. Leur synthèse, dans le cartilage articulaire sain, est faible mais augmente dans les situations pathologiques. Elles semblent entrer en jeu dans le maintien et la structure de la matrice extracellulaire.

Les protéines actuellement décrites appartiennent à la famille des protéines d'adhérence comprenant, entre autres, l'annexine V, l'anchoring CII présente à la surface des chondrocytes, la COMP (Cartilage Oligo Matrix Protein) qui a valeur de marqueur du renouvellement et de la dégénération de la matrice extracellulaire, la trombospondine, la tétranectine, la ténascine et la fibronectine. Ces protéines jouent un rôle important dans les interactions entre les chondrocytes et la matrice extracellulaire et donc dans les phénomènes d'adhésion et de migration des chondrocytes. La liaison avec les chondrocytes se réalise par des protéines transmembranaires, les intégrines. Ces protéines sont reliées au cytosquelette par leur côté cytosolique et peuvent induire des mécanismes de transduction du signal et activer des gènes.

7) Homéostasie du cartilage

L'homéostasie est l'équilibre entre la synthèse et la dégradation des composants de la matrice. Les cellules de l'articulation (chondrocytes et synoviocytes) sont stimulées par différents facteurs :

- Mécaniques ou électriques
- Cytokines anti- et pro-inflammatoires
- Contacts matrice- cellule

Ces interactions vont activer ou inactiver l'expression de gènes responsables de la synthèse ou de la dégradation des constituants du cartilage. De manière générale, dans une articulation saine, la dégradation et par conséquent le renouvellement des composés est faible.

B. La membrane synoviale

La membrane synoviale (ou synovie) est un tissu qui couvre la surface interne de la capsule articulaire. Son nom provient du latin *syn-ovum* car le liquide qu'elle sécrète s'apparente à du blanc d'œuf. Elle couvre toutes les surfaces de l'articulation sauf le cartilage. La membrane synoviale est un tissu conjonctif hautement spécialisé. Lorsque l'articulation est saine, l'épaisseur de la membrane est

inférieure à 100 μm . Elle se compose de deux couches : *l'intima* et la *subintima*, positionnées de l'intérieur de la cavité articulaire vers la capsule articulaire. La membrane synoviale est séparée de la capsule par la subsynoviale qui est un tissu conjonctif pauvre en cellules.

L'intima

Elle est composée de 1 à 4 rangées de cellules appelées synoviocytes et mesure selon les cas entre 20 et 40 μm . Ce sont des cellules endothéliiformes dont le prolongement cytoplasmique est habituellement dirigé vers la lumière articulaire.

Les synoviocytes se divisent en deux groupes :

- Les synoviocytes de type A qui sont des cellules macrophagiques (présence de villosités et de microplis à la surface) dérivées de cellules souches sanguines mononuclées. Ce sont les cellules les plus nombreuses. Elles sont caractérisées par un appareil de Golgi très développé et un petit réticulum endoplasmique granulaire. Du fait de leurs fonctions phagocytaires, elles contiennent de nombreux lysosomes, de larges vacuoles et des vésicules pinocytaires. Ceci leur permet l'absorption puis la dégradation des différents débris cellulaires et extracellulaires, des microorganismes et des antigènes présents à la fois dans le liquide synovial et dans la matrice de la membrane. Elles expriment les molécules du système majeur d'histocompatibilité de classe II ainsi que des antigènes membranaires associés aux phases primaires de la réponse immunitaire (CD 11b, 14, 16, 32, ...).
- Les synoviocytes de type B sont des cellules fibroblastiques¹⁸ plus massives possédant un noyau volumineux. Elles présentent peu de vacuoles et de prolongements cytoplasmiques, leur appareil de Golgi est moins développé. Leur réticulum endoplasmique granulaire est beaucoup plus développé que celui des synoviocytes de type A, ceci s'explique par leur rôle de synthèse de protéines et de polysaccharides au sein de la membrane. En effet, les synoviocytes de type B produisent de l'acide hyaluronique et différents glycosaminoglycanes, des collagènes et de la fibronectine dans l'intima et la cavité articulaire. Ces cellules jouent un rôle essentiel dans la composition protéique du liquide synovial¹⁹.

La subintima

C'est un tissu fibreux où l'on retrouve différents types de cellules : fibroblastes (environ 50 %), histiocytes, mastocytes, adipocytes ainsi que des fibres de collagène. Cette couche est de plus très

vascularisée : elle possède des capillaires, des artérioles et des vaisseaux lymphatiques, ce qui permet d'apporter les nutriments et l'oxygène nécessaires au bon fonctionnement des chondrocytes.

Elle est essentiellement composée de glycosaminoglycanes. La zone subintimale forme l'axe des villosités synoviales qui se greffent à la surface des franges. En cas d'inflammation, il se produit une modification des veinules post-capillaires et une hypertrophie des cellules endothéliales qui contribuent à une augmentation de la perméabilité vasculaire.

La subsynoviale

Au voisinage de la *subintima*, les cellules sont des cellules conjonctives sans spécificité. La substance fondamentale contient des glycosaminoglycanes et des fibres de collagènes lâches. Au niveau de la capsule articulaire, on retrouve des cellules adipeuses qui infiltrent le tissu conjonctif. Dans les synoviales de type fibreuses, la subsynoviale se confond souvent avec les éléments capsuloligamentaires sous-jacents.

- Rôle de la membrane synoviale

La membrane synoviale assure trois fonctions essentielles au niveau articulaire :

- elle assure la nutrition et le développement (trophicité) des différents constituants de l'articulation et participe à ses propriétés mécaniques et à sa stabilité.
- elle joue le rôle de barrière de filtration et d'échange; elle prend part à la formation du liquide synovial.
- elle sert de rempart contre les agressions extérieures.

- Barrière de filtration et d'échanges : constitution du liquide synovial

Le liquide articulaire est élaboré et résorbé par les cellules de l'intima principalement. Il est constitué d'un ultra-dyalisat sanguin implémenté grâce à la synoviale en acide hyaluronique.

Les échanges entre le sang et la cavité articulaire se font dans les deux sens à travers la membrane, sous l'effet des pressions hydrostatique et osmotique d'une part, et sous l'effet de barrières capillaires et interstitielles propres à la membrane synoviale d'autre part. Les cellules intimes, les macrophages et même les autres cellules mononuclées de la subsynoviale contrôlent également le transport de substances d'un compartiment à l'autre par pinocytose ou phagocytose.

- Rôle de défense contre les agressions extérieures

Ce travail est assuré par les synoviocytes de type A. Ils portent à leur surface des antigènes qui sont directement impliqués dans les processus pathologiques tels que la synovite rhumatoïde :

- antigènes HLA de classe II
- antigènes associés à la lignée leucocytaire et macrophagique : CD11b (CR3), CD13, CD14, CD16 (FcRIII), CD18, CD32 (FcRII), CD45 (« leucocyte common antigen »), CD54 (ICAM-1), CD64 (FcRI), CD68 et CD71 (récepteur de la transferrine)
- récepteurs pour le fragment Fc des immunoglobulines : CD64, CD32, CD16
- molécules d'adhésion ICAM-1...

C. Le liquide synovial

Le liquide synovial est un ultra-dialysat du plasma sanguin obtenu par filtration à travers la membrane synoviale, enrichi en facteurs de croissance et en acide hyaluronique issus des synoviocytes¹⁸. C'est un liquide extrêmement visqueux (dans une articulation saine), clair, limpide et de couleur citrine. La concentration en électrolytes est peu différente dans le sang et dans le liquide synovial. La concentration en lipides et en sucres (glucose, galactose, fructose) du liquide synovial est plus faible car ces molécules interviennent dans l'activité métabolique des chondrocytes²⁰.

Trois fois moins de protéines sont trouvées dans le liquide synovial avec une diminution de l'haptoglobine et des α 2-globulines. Les IgGs et les IgAs sont présentes, alors que les IgMs sont pratiquement absentes. Les protéines de haut poids moléculaire (> 10 000 Da) sont exclues en raison du rôle de filtre de la membrane.

Le principal élément constitutif du liquide synovial est l'acide hyaluronique. Il y est présent à raison de 3 g/L environ et c'est lui qui confère les propriétés rhéofluidifiantes au liquide synovial. Le HA n'est pas lié à des protéines comme dans le cartilage mais forme un réseau de molécules enchevêtrées auxquelles sont associées des molécules d'eau par liaisons hydrogène. On obtient de cette façon des hélices (pas de 0,337 nm) dont chaque spire est composée de 4 disaccharides.

Le liquide synovial d'une articulation saine contient moins de 200 cellules par mm³ (essentiellement des cellules mononucléaires) contre plus de 2000 pour une articulation pathologique. Son volume chez l'homme est compris entre 0,5 et 2 mL mais augmente en cas d'inflammation. Il peut aller jusqu'à 100 mL pour certains cas de polyarthrite¹⁸, mais sa viscosité diminue du fait de la réduction de la concentration et de la masse molaire du HA¹⁴.

Le rôle du liquide synovial est d'une part de faciliter le mouvement articulaire grâce à ses propriétés rhéologiques. Il forme un film à la surface de la membrane et du cartilage et permet ainsi d'améliorer le glissement des surfaces articulaires lors des mouvements. D'autre part, il joue un rôle nourricier indispensable pour les chondrocytes en apportant l'oxygène et les divers éléments nécessaires à leur bon développement.

D. L'os sous chondral

Au niveau tissulaire, l'os sous chondral est indistinguable de l'os « normal » mais il possède une organisation spécifique²⁰. L'os sous chondral est plus fin que l'os cortical et contient des canaux de Havers orientés de manière parallèle à l'articulation et non le long de l'axe de l'os. Il est environ 10 fois plus déformable que les os corticaux du fait que les canaux soient orientés à 90 ° par rapport aux lignes de stress.

D'un point de vue biomécanique, l'os sous chondral constitue une zone de transition entre le tissu cartilagineux et l'os trabéculaire. Il joue ainsi un rôle primordial dans l'amortissement des chocs en minimisant le stress mécanique du tissu cartilagineux (50 % de l'amortissement articulaire). Il permet, au même titre que le cartilage calcifié, de transformer les forces de cisaillement en forces de pression. L'os sous chondral est similaire à un os lamellaire tout en étant moins rigide. Sa force et sa rigidité croissent exponentiellement avec la densité du contenu minéral. L'épaisseur de l'os sous chondral varie entre 0,1 et 2 mm et peut atteindre jusqu'à 3 mm dans les régions à fortes contraintes mécaniques (plateau tibial). Cette épaisseur varie d'une espèce à une autre, en fonction de l'âge, du poids, et de la localisation au sein même d'une articulation. Contrairement au tissu cartilagineux, l'os sous chondral est innervé et vascularisé. Si la vascularisation de l'os sous chondral semble jouer un rôle nutritif pour les couches profondes du cartilage et pendant la croissance, il est en revanche absent chez l'adulte. Le remodelage de l'os sous chondral diminue en cas d'activité physique et dans les zones à fortes contraintes mécaniques. En revanche, dans la maladie arthrosique, le remodelage osseux s'accélère avec une ostéoformation qui augmenterait au cours de la phase précoce de la maladie pour diminuer ensuite à un stade plus avancé. L'augmentation du turn-over au cours des phases précoces, entraînerait une augmentation d'os ostéoïde et une réduction de la minéralisation osseuse qui favoriseraient la diminution du module élastique.

III. L'arthrose

L'arthrose (appelée aussi arthropathie chronique dégénérative) est une maladie non inflammatoire due à la dégénérescence du cartilage. En réponse à différents *stimuli*, le rapport entre la synthèse par les chondrocytes des constituants du cartilage et celle des enzymes responsables de leur dégradation est modifié. Il s'en suit une perte des propriétés mécaniques du cartilage. Elle peut toucher toutes les articulations (contrairement à la polyarthrite rhumatoïde) mais on la retrouve plus fréquemment au niveau du genou, de la hanche, des doigts et de la colonne vertébrale (Figure IV-9). C'est la plus commune des maladies articulaires. Son coût estimé est de 1 à 1,5 % du PIB pour les pays développés²¹.

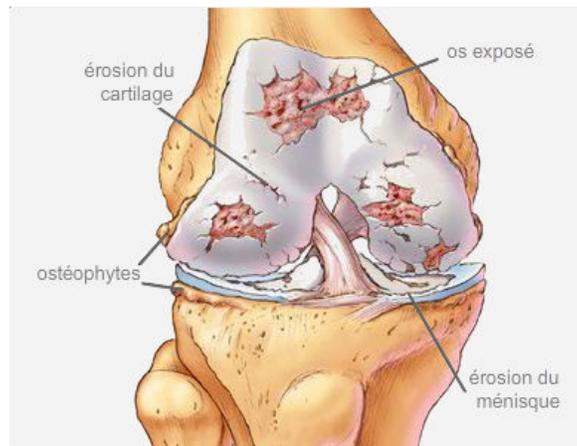


Figure IV-9 : Schéma d'un genou atteint par l'arthrose ([http://knol.google.com/k/l-arthrose-et-ses-traitements#L\(27\)arthrose](http://knol.google.com/k/l-arthrose-et-ses-traitements#L(27)arthrose)).

Il n'y a pas de cause claire et définie de l'arthrose, la maladie peut être déclenchée par plusieurs facteurs (parfois par la combinaison de plusieurs facteurs) :

- Facteurs systémiques : l'âge et le sexe du patient sont des facteurs importants de la survenue de cette maladie²². L'arthrose est rare chez les individus dont l'âge est inférieur à 45 ans, par contre elle touche environ 60 % des plus de 75 ans²³. La gonarthrose atteint plus souvent les femmes que les hommes. Elle correspond à la baisse naturelle de l'activité métabolique des chondrocytes chez l'adulte. Facteurs génétiques : ils sont prépondérants dans l'apparition de la maladie, leur part est évaluée entre 40 et 65 %²⁴ et les articulations atteintes sont majoritairement celles de la main. Il n'existe pas un seul gène responsable de l'arthrose mais plutôt une combinaison de plusieurs.
- Facteurs biomécaniques : dans ces cas, la survenue de l'arthrose correspond à des anomalies congénitales articulaires (dysplasie de la hanche, jambes de longueur différentes), une réduction musculaire (principalement au niveau du genou) ou une usure répétitive de l'articulation.

Certaines blessures peuvent aussi l'engendrer telles qu'une rupture des ligaments croisés antérieurs ou un déchirement méniscal²⁵.

- Facteur pondéral : il joue un rôle important dans l'apparition de l'arthrose au niveau des articulations portantes. En effet plus la charge à supporter est importante, plus le cartilage va être soumis à des efforts²⁶.
- Facteurs environnementaux : des études ont été effectuées concernant l'incidence de l'alcool, du tabac et de différents types de régimes sur la survenue de l'arthrose mais les résultats sont contradictoires ; il ne semble pas y avoir de lien direct entre ces facteurs et l'apparition de la maladie.

A. Diagnostic de l'arthrose²⁷

Le problème de l'arthrose est que la maladie peut se déclarer sans qu'il n'y ait de symptômes. En général, la maladie est déjà à un stade avancé lorsque les premiers effets se font ressentir (douleurs articulaires, raideurs matinales). C'est pourquoi il est important de prendre en compte les facteurs déclencheurs de la maladie afin de surveiller les individus susceptibles d'être atteints et ainsi d'envisager une prise en charge précoce.

B. Examens

Il n'y a pour le moment pas de biomarqueurs sanguins identifiés.

Par radiographie, on observe un rétrécissement de l'espace articulaire (correspondant à la perte de volume du cartilage) mais pas de variation de la densité osseuse. Dans certains cas, il y a formation d'ostéophytes (becs de perroquet), sortes d'éperons osseux situés autour de l'articulation. Cette technique ne permet cependant pas de déceler l'arthrose de manière précoce.

L'échographie et l'IRM ne sont pas utilisées en routine mais ces techniques sont en augmentation constante comme outil en recherche médicale.

La perte de cartilage est le résultat d'un dérèglement au niveau de la balance entre la synthèse des constituants de la matrice et la synthèse d'enzymes de dégradation de ces constituants. Ainsi, la composition de la MEC change petit à petit et les propriétés mécaniques du tissu diminuent.

L'utilisation de l'arthroscopie permet d'une part de confirmer le diagnostic et d'autre part de déterminer l'ampleur de l'altération. En 2000, l'ICRS (*International Cartilage Repair Society*) a ainsi classé en quatre niveaux les atteintes du cartilage selon leur gravité et leur siège²⁸ (Figure IV-10):

Grade I : Il correspond à la présence de fibrillations, de lacérations ou de fissures se traduisant par une chondromalacie (ramollissement du cartilage).

Grade II : C'est une amplification des lésions de grade I entraînant des pertes de substance, mais inférieures à 50 % de la hauteur chondrale.

Grade III : Les lésions sont beaucoup plus profondes, elles peuvent atteindre la couche calcifiée et mettre à nu la lame sous chondrale.

Grade IV : le grade IV regroupe les lésions ostéochondrales.

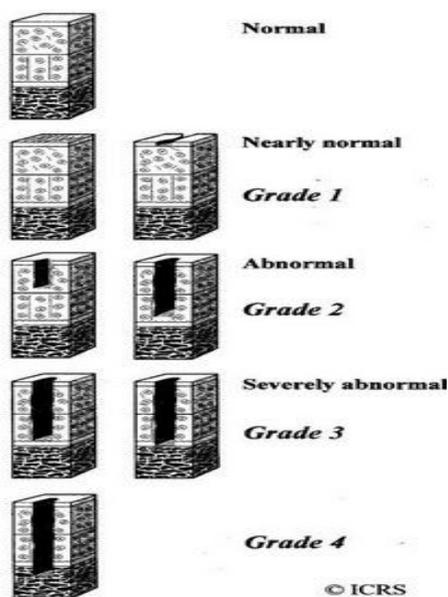


Figure IV-10: Représentation des différents degrés d'avancement de l'arthrose^{29,30}.

Les lésions de grade I et II sont des lésions chondrales, c'est-à-dire que seul le cartilage est altéré contrairement aux grades III et IV qui sont des lésions ostéochondrales touchant aussi l'os.

- Les lésions chondrales :

Ces lésions sont en général limitées aux couches superficielles du cartilage (la couche calcifiée n'est pas affectée). Les cellules avoisinantes vont alors produire les différents constituants nécessaires à la réparation de la matrice, sans toutefois parvenir à mimer les propriétés mécaniques du cartilage hyalin³¹.

- Les lésions ostéochondrales :

Dans le cas d'atteinte de l'os sous chondral, sa vascularisation va entraîner la formation d'un caillot sanguin qui va combler l'espace laissé libre³². On assiste ensuite à une migration de cellules mésenchymateuses qui vont par la suite se différencier en chondrocytes. Le caillot va petit à petit se résorber et laisser place à du fibrocartilage contenant essentiellement du collagène de type I et plus riche en fibronectine³³. Le fibrocartilage diffère du cartilage originel par son aspect désorganisé, plus vascularisé, et sa composition biochimique différente en eau, protéoglycanes et types de collagène. Mécaniquement, ce tissu de réparation est moins efficace et moins durable.

C. Traitements

Il est important de noter qu'à l'heure actuelle il n'existe pas de traitement curatif de l'arthrose. Les traitements administrés aux patients cherchent à améliorer leur confort de vie en soulageant la douleur et en maintenant, voire en augmentant la mobilité des articulations touchées. Il existe trois types de traitements selon l'état de la maladie : les traitements non médicamenteux, les traitements médicamenteux et les traitements chirurgicaux.

1) Les traitements non médicamenteux

Ils sont principalement associés à l'arthrose touchant les articulations portantes (genou et hanche) et notamment en cas de symptômes modérés. Il s'agit surtout de sensibiliser et d'éduquer le patient afin de limiter la progression de la maladie (ils peuvent aussi être utilisés en prévention). Ces traitements consistent en la pratique régulière d'activité physique (renforcement musculaire, marche, natation...) dont l'intensité dépend de la douleur et de la mobilité du patient²⁷. En cas d'obésité, la perte de poids permet de diminuer la charge exercée sur les articulations et donc la douleur. Enfin, l'adaptation (si possible) de l'environnement professionnel, si les traumatismes en sont la conséquence, ou la physiothérapie peuvent être envisagées²⁷.

2) Les traitements médicamenteux

Ils agissent principalement sur les symptômes, dans le cas d'arthrose légère. L'acétaminophène (paracétamol)³⁴ ou des analgésiques sont prescrits pour soulager la douleur. Si ces médicaments ne sont pas efficaces, on a recours à des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) tels que l'ibuprofène ou le kétoprofène. On peut aussi les substituer par des AINS inhibiteurs sélectifs de la Cox-2 (Coxibs) qui ont moins d'effets secondaires vis-à-vis de l'estomac. Néanmoins les AINS provoquent des effets secondaires parfois graves au niveau gastro-intestinal. Le Vioxx[®] (Merck) a même été retiré du marché en raison de risques accrus d'infarctus du myocarde¹⁸. Afin d'éviter les problèmes digestifs dus aux AINS, on peut les appliquer sous forme de gel au niveau de l'articulation du genou (le médicament ne semble pas pénétrer suffisamment profondément dans les articulations de la hanche et de la colonne). En dernier recours, on pourra procéder à des injections intra-articulaires de corticostéroïdes (2 à 4 injections par an)³⁴.

Des administrations orales ou des injections intra-articulaires de chondroïtine sulfate³⁵, de glucosamine ou encore d'acide hyaluronique¹⁸ peuvent aussi être envisagées avec toutefois des problèmes de biodisponibilité. Ces molécules peuvent agir au niveau du chondrocyte afin de stimuler la synthèse de composants matriciels.

3) La chirurgie

De nombreuses techniques chirurgicales existent permettant de soulager les patients à différents stades d'évolution de l'arthrose. Allant du simple lavage articulaire sous arthroscopie jusqu'à l'arthroscopie totale. Elles sont en majorité utilisées pour les arthroses du genou (gonarthrose) et de la hanche (coxarthrose).

a) Lavage/débridement articulaire

Le lavage articulaire est la première étape chirurgicale effectuée quel que soit le traitement associé. Il consiste à injecter du sérum physiologique dans l'articulation afin d'éliminer les débris macro et microscopiques ainsi que certaines molécules pouvant induire une synovite (inflammation de la synoviale). Il permet aussi de préciser le diagnostic grâce à l'analyse de la composition du liquide synovial recueilli³⁶.

Le débridement consiste à polir dans l'articulation tout ce qui est irrégulier et susceptible d'entretenir conflit et douleur. Ce traitement supprime les zones d'irritation et de conflit articulaire³⁷. Il vise à régulariser les lésions tant méniscales que cartilagineuses, à émousser s'il y a lieu les ostéophytes intra-articulaires ainsi qu'effectuer une synovectomie a minima des zones hypertrophiques. Il est utilisé principalement pour les lésions n'atteignant pas l'os sous chondral.

Pour les atteintes plus profondes, diverses techniques chirurgicales plus lourdes ont été mises au point. Elles concernent la production de fibrocartilage par stimulation de l'os sous chondral, complété ou non par l'apport de cartilage hyalin issu de greffes. Les dernières techniques développées consistent en la transplantation de chondrocytes au niveau du cartilage lésé.

b) Stimulation osseuse

Les techniques dites de stimulation osseuse (microfractures) faisant suite aux anciennes techniques de Pridie ou d'abrasion³⁸ (Figure IV-11), consistent à forer la partie de cartilage endommagée de manière à mettre à nu l'os sous chondral. L'os sous-chondral est à son tour perforé à l'aide d'une fine 'pointe carré' ou de très fines mèches motorisées à vitesse lente (pour éviter un échauffement local du tissu) afin de créer un caillot sanguin. Ce caillot va ainsi combler au moins partiellement la cavité chondrale et, en se résorbant, céder sa place à du fibrocartilage. C'est une technique de resurfaçage biologique par stimulation des cellules spongieuses et mésenchymes, des défauts cartilagineux de grade III ou IV, d'épaisseur complète jusqu'à l'os sous-chondral. Il est admis 4 microperforations par cm². Cette technique est longue : il faut environ 8 semaines pour que le caillot sanguin se transforme en tissu fibreux et ensuite environ 4 mois pour que ce tissu devienne du fibrocartilage. De plus, le fibrocartilage ne possède pas les mêmes propriétés mécaniques que le cartilage hyalin.



Figure IV-11: Réparation d'une articulation arthrosique par la méthode des microfractures (<http://www.cartilage.fr/reparer-microfractures.php>).

c) Greffes

Les greffes de cartilages ont aussi été développées. La section endommagée de l'os et du cartilage est détachée de l'articulation. Ensuite une nouvelle clavette d'os sain avec son cartilage est prélevée par perforation et réimplantée dans la cavité créée. L'os sain et son cartilage sont prélevés d'une zone dont l'articulation est peu chargée afin d'éviter le ramollissement de l'articulation. Dans le cas d'autogreffes on ne peut pas traiter de trop grands défauts car la quantité de tissu greffable est limitée. Par contre pour les allogreffes, le tissu est prélevé sur des articulations saines de cadavres et permet ainsi de combler des zones potentiellement plus importantes. Toutefois, les allogreffes soulèvent des questions éthiques et posent des problèmes quant à la compatibilité du receveur et le risque de transmission d'autres maladies^{39,40}. L'intervention est longue et s'adresse généralement aux patients de moins de 60 ans présentant un bon système cardiovasculaire. La convalescence, qui dure deux à trois mois, comporte soins et physiothérapie. Cette intervention donne surtout de bons résultats sur les lésions du genou et de la cheville. Cependant, elle est limitée dans son application par la taille du greffon.

d) Mosaic plastie

Pour pallier aux carences des autogreffes classiques, Hangody a mis au point et développé au début des années 1990 le concept de mosaic plastie⁴¹ (Figure IV-12). Plutôt que de transplanter un bloc complet de cartilage sur la zone défectueuse, plusieurs petits cylindres ostéochondraux sains sont greffés côte à côte au niveau de la lésion. Ceci permet de mieux respecter le rayon de courbure et donc la congruence des surfaces articulaires. Cette méthode chirurgicale est utilisée principalement au niveau du genou et du coude. Elle s'effectue en un seul temps : des greffes ostéochondrales cylindriques sont prélevées au

niveau d'un site donneur puis transférées dans des puits receveurs percés au niveau de la zone à greffer. Les sites donneurs préférentiels au niveau du genou se situent au niveau de la zone fémoro-patellaire non portante⁴¹, les bords interne et externe de la trochlée fémorale et le pourtour de l'échancrure interchondylienne. Pour ce genre de technique, il est nécessaire de combler au moins à 70 % la lésion afin d'obtenir une réparation du tissu satisfaisante. Les études histologiques ont montré qu'environ dix semaines après l'intervention, la zone transplantée contenait 60 à 70 % de cartilage hyalin et 30 à 40 % de fibro-cartilage, ce dernier s'étant formé à partir de l'os spongieux préalablement avivé. Au niveau opératoire, la technique peut être conduite par arthrotomie ou arthroscopie selon la taille de la lésion. Il s'agit d'abord de cureter la zone défectueuse à angle droit jusqu'au cartilage hyalin et de creuser pour atteindre l'os souschondral (celui-ci est « avivé » afin de favoriser la synthèse de fibrocartilage). On procède ensuite à des forages d'environ 15 mm et de diamètres variables (2 à 9 mm) dans cette zone ; ils seront les puits de recueillement des futurs greffons.

Le morcellement du tissu implanté procure un avantage comparé à la greffe classique car il permet d'épouser au mieux la forme de l'os au niveau du défaut (en particulier si les surfaces articulaires sont vallonnées) mais cette technique concerne seulement les petites lésions car la zone de prélèvement est limitée. Le cartilage obtenu est un mélange de fibrocartilage et de cartilage hyalin issu de surfaces non portantes.

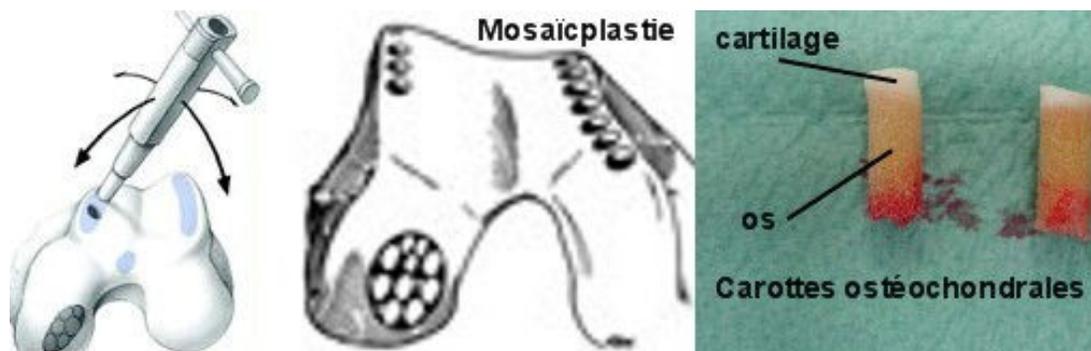


Figure IV-12 : Illustration de la technique de mosaïcplastie (http://docteurrouxel.fr/chirurgie_cartilage.html).

e) ACI (implantation de chondrocytes autologues) (Figure IV-13)

Pour les défauts cartilagineux de taille importante (2 à 5 cm²), une technique d'ingénierie tissulaire a été développée à la fin des années 1980 par une équipe suédoise (Brittberg) : il s'agit de l'implantation de chondrocytes autologues. Une biopsie est effectuée afin de prélever un fragment de cartilage sain (en

général en zone non portante). Les chondrocytes contenus dans ce tissu sont ensuite mis en culture pendant 3 à 4 semaines afin d'en obtenir un nombre suffisant en vue de leur réimplantation future dans la zone à traiter⁴². Les résultats obtenus sont encourageants, le cartilage synthétisé est majoritairement hyalin⁴³. Ce procédé a depuis été amélioré et les chondrocytes sont mis en culture sur des patches composés de collagène (type I et III) ou des gels de polymère biorésorbables (alginate ou acide hyaluronique).

La procédure d'ingénierie tissulaire est peu invasive et ne compromet pas la possibilité de réaliser une autre intervention chirurgicale en cas d'échec. Ce type de greffe cellulaire reste toutefois complexe et cette technique de thérapie cellulaire est encore en pleine évolution : utilisation des matrices, tissue engineering.



Figure IV-13 : Implantation de chondrocytes autologues (<http://oahawaii.com/wp-content/uploads/2011/06/carticel.jpg>).

f) Arthroplastie

L'arthroplastie est le dernier recours pour soulager l'inconfort du patient. Elle n'est généralement pas préconisée pour les patients jeunes car la prothèse a une durée de vie limitée. L'implant est constitué de métal (alliage : acier, chrome, cobalt, titane) et de polyéthylène ultra haute masse molaire (versant tibial) (Figure IV-14). La fixation à l'os utilise du ciment chirurgical (poly(méthyl métacrylate)) ou un système

de fixation sans ciment. L'intervention chirurgicale dure environ 90 minutes et l'opéré peut s'appuyer sur l'articulation seulement 48 heures après l'intervention (dans le cas d'une prothèse cimentée). Environ 40 000 prothèses de genou sont posées chaque année en France.

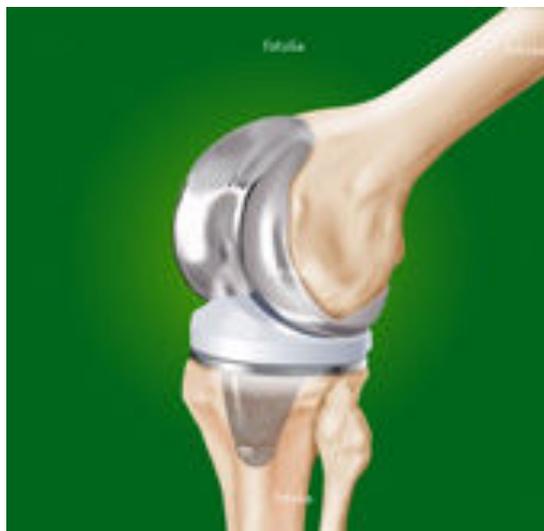


Figure IV-14 : Schéma d'une articulation du genou après arthroplastie totale

(http://hmrortho.ca/index.php?option=com_content&view=article&id=24&Itemid=48&showall=1).

L'objectif de ces travaux de thèse est de pouvoir agir, via les principes actifs contenus dans les particules polymère recouvertes de HA modifié, au niveau de liaisons diffuses du cartilage (dans certains cas d'arthrose). Une prise en charge précoce doit permettre d'éviter, ou au moins de retarder, les traitements chirurgicaux décrits précédemment.

IV. Evaluation biologique des particules recouvertes de HAC6 (HABioC6)

Comme nous l'avons démontré dans le chapitre précédent, il est possible de préparer des particules recouvertes de HAC6 (issu du HANA « Bioiberica ») d'un diamètre inférieur au micron. Nous avons alors conduit deux types d'expériences :

- Une évaluation *in vitro* des différentes particules mises en contact avec des chondrocytes ou des synoviocytes. Il est ainsi possible d'évaluer le potentiel cytotoxique de nos vecteurs pour déterminer la concentration maximale en particules que ces cellules peuvent tolérer.

- l'étude *in vivo* du devenir des particules après injection intra-articulaire dans des genoux de rats. Notre objectif est de montrer que ces vecteurs vont se localiser préférentiellement à proximité des chondrocytes.

Lors de cette étude, et afin de prouver l'intérêt de recouvrir les particules avec du HAC6, nous avons à chaque fois préparé des particules similaires mais recouvertes de PVA (à 10 g/L dans la phase aqueuse externe) en utilisant les protocoles de formulation décrits au chapitre V.

Nous avons testé des concentrations en particules de 25 ; 50 et 100 µg/mL.

A. Etudes in vitro

Les différents lots de particules préparés ont été utilisés en biologie pour évaluer les potentiels effets toxiques ou inflammatoires qu'elles peuvent induire. Parmi les effets délétères susceptibles d'apparaître, certains peuvent être dus aux produits de dégradation des constituants des particules (HAC6, PLGA, BSA, ...) ou aux différents procédés de formulation, lavage ou de stockage des particules (traces de solvant, agrégation, contamination,...)

Ces tests de cytotoxicité consistent à mesurer l'activité mitochondriale d'un ensemble de cellules (test MTT) et à doser la quantité de lactate déshydrogénase libérée dans le milieu de culture par les cellules (test LDH), cette dernière peut être corrélée à la viabilité cellulaire. Enfin une numération des cellules présentes pour chaque condition expérimentale est effectuée et nous permet de normaliser les tests MTT et LDH.

1) Etude de l'activité mitochondriale et de la viabilité cellulaire

Pour chaque lot de particules préparé, des tests de cytocompatibilité ont été effectués afin de déterminer quelle est la concentration maximale en particules supportée par les cellules.

Le test MTT est normalisé par un comptage des cellules dans les différents puits et rapporté aux conditions témoins qui correspondent à 100 % d'activité mitochondriale.

Pour le test LDH, les contrôles 0 % et 100 % (de libération de LDH dans le milieu de culture) sont obtenus par dosage du milieu de culture seul et après lyse des membranes cellulaires respectivement.

Les résultats présentés par la suite (Figure IV-15 et IV-16) correspondent aux valeurs obtenues après exposition pendant 24, 48 et 72 heures des chondrocytes de rats (P2) à des lots de particules de PLGA recouvertes de HABioC6-31% ou de PVA, et encapsulant ou non du DEX-FITC. Les particules sont en suspension à une concentration de 100 µg/mL soit la concentration maximale d'exposition testée.

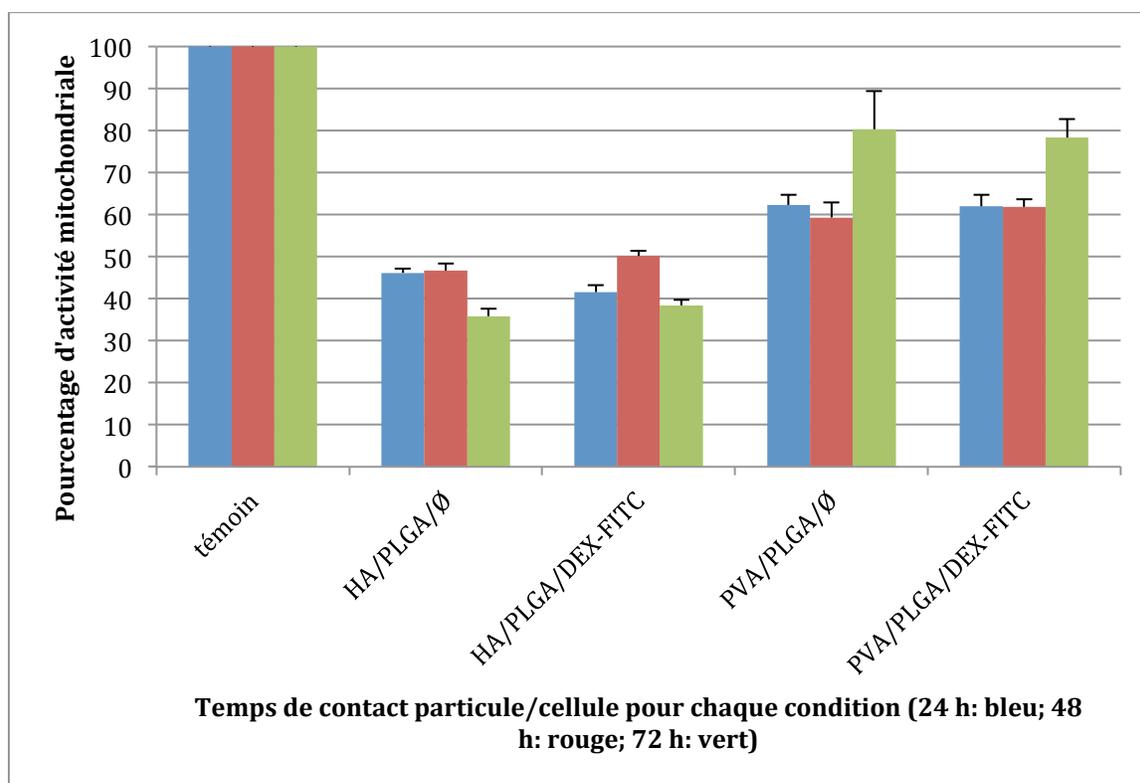


Figure IV-15 : Evolution de l'activité MTT des chondrocytes de rats (P2) à 24, 48 et 72h en fonction de leur exposition à différents lots de particules (100 µg/mL). Les témoins sont des cellules ayant évolué dans un milieu sans particules. Pour les autres lots, des particules recouvertes de HABioC6-31% « vides » (Ø) ou encapsulant du DEX-FITC, ainsi que des particules recouvertes de PVA « vides » (Ø) ou encapsulant du DEX-FITC ont été mises en contact avec les cellules.

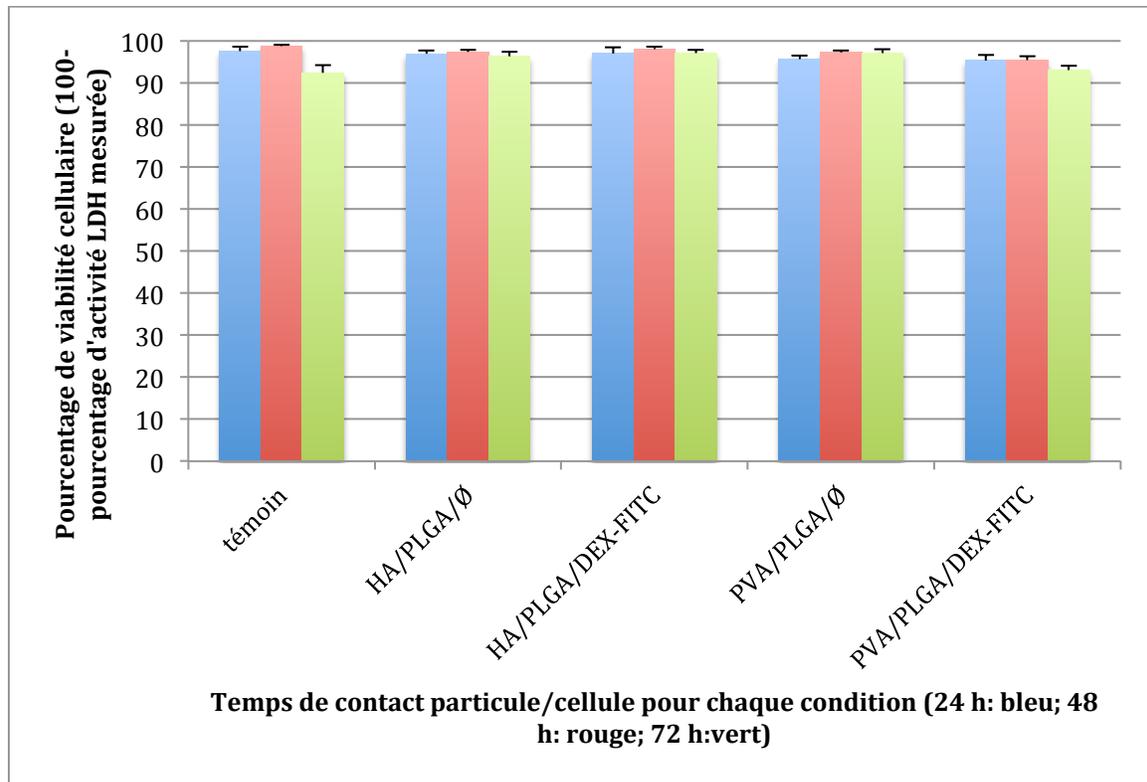


Figure IV-16 : Evolution de la viabilité cellulaire des chondrocytes (P2) à 24, 48 et 72h par dosage de la LDH libérée dans le milieu de culture en fonction de leur exposition à différents lots de particules (100 µg/mL). Les témoins sont des cellules ayant évolué dans un milieu sans particules. Pour les autres lots, des particules recouvertes de HABioC6-31% « vides » (Ø) ou encapsulant du DEX-FITC, ainsi que des particules recouvertes de PVA « vides » (Ø) ou encapsulant du DEX-FITC ont été mises en contact avec les cellules.

Ces résultats nous donnent de nombreuses informations. Tout d’abord, l’activité mitochondriale (test MTT) des chondrocytes exposés aux nanoparticules diminue fortement par rapport à l’activité des cellules témoins. Ainsi, pour les particules recouvertes de HAC6, l’activité mitochondriale des cellules diminue de 60 % en comparaison avec les cellules témoins. Dans le cas de particules recouvertes de PVA, la baisse n’est que de 40 % à 24 et 48 heures et elle n’est plus que de 20 % à 72 heures (figure IV-15).

En revanche, la viabilité cellulaire est relativement identique quelle que soit la condition testée et le temps de contact (figure IV-16).

La diminution de l’activité MTT des cellules mises en contact avec des particules est normale. L’ajout de nano-objets relativement gros et lourds dans le milieu va perturber le développement normal des cellules. Concernant la diminution plus importante de l’activité MTT des cellules mises en contact avec des

particules recouvertes de HAC6, nous l'avons attribuée à l'internalisation des particules (voir plus loin). En effet, les mécanismes d'internalisation entrent en compétition avec les autres phénomènes cellulaires et entraînent alors une diminution de l'activité MTT.

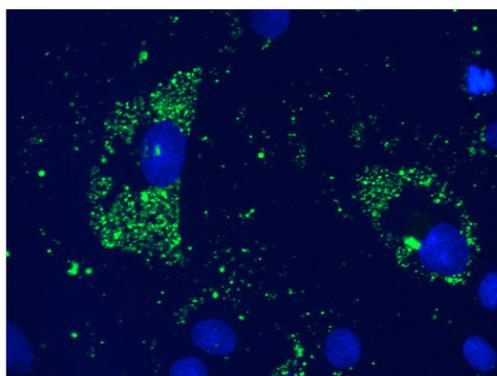
Nous pouvons conclure à la vue de ces résultats que les particules, même à une concentration de 100 $\mu\text{g/mL}$, n'induisent pas d'effets délétères sur les cellules.

2) Internalisation des particules par les cellules?

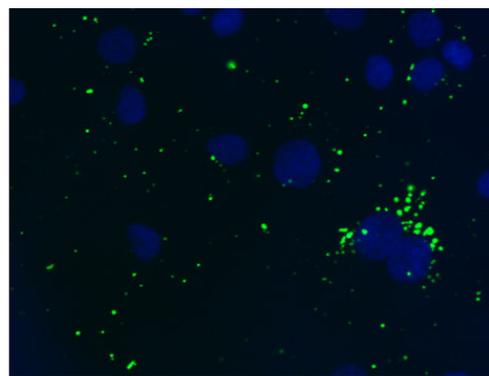
L'internalisation des nanoparticules par les cellules a pu être observée dans le cas des particules encapsulant des molécules fluorescentes.

- Localisation des nanoparticules encapsulant du DEX-FITC

Les chondrocytes sont mises en contact avec des particules (100 $\mu\text{g/mL}$) recouvertes de HAC6 ou de PVA et renfermant du DEX-FITC (Figure IV-17).



a) Nanoparticules recouvertes de HAC6 (HABioC6-31%)



b) Nanoparticules recouvertes de PVA

Figure IV-17 : Visualisation en microscopie à fluorescence de la localisation des nanoparticules recouvertes de HAC6 (a) et de PVA (b) par rapport aux noyaux des cellules. Les chondrocytes ont été utilisés en P2 et le temps de contact avec les nanoparticules est de 72 heures. Le noyau des cellules est marqué au DAPI (bleu) et les particules renferment du DEX-FITC (vert).

L'internalisation des particules par les chondrocytes est beaucoup plus importante lorsqu'elles sont recouvertes par du HAC6 comparé au PVA. D'après la figure V-17, on peut parfaitement délimiter le contour des cellules ayant internalisé des particules. Dans le cas des particules recouvertes de PVA, l'internalisation est beaucoup moins marquée. Dans ce dernier cas il semble que cette internalisation soit plus due à la gravité qu'à une reconnaissance spécifique car il n'y a pas de concentration des particules dans les cellules.

Ces résultats valident notre stratégie de ciblage des cellules par du HAC6.

- Localisation des particules contenant de la BSA-Cy3

Puisque nous avons pu prouver que les particules recouvertes de HAC6 sont internalisées par les cellules et de manière plus importante que celles recouvertes de PVA, nous n'avons pas cherché à encapsuler de BSA-Cy3 dans des particules de PVA. En effet, pour la suite de ces travaux, nous nous sommes concentrés sur l'encapsulation de molécules d'intérêt uniquement dans des particules recouvertes de HAC6. L'évaluation de l'internalisation de nanoparticules recouvertes de HAC6 et encapsulant de la BSA-Cy3 par les chondrocytes est présentée dans la figure IV-18 :

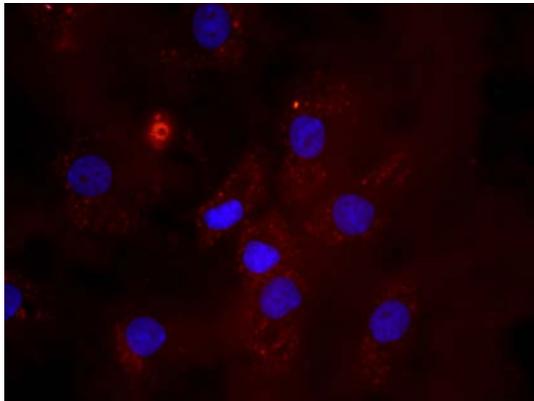


Figure IV-18 : Visualisation en microscopie à fluorescence de la localisation de particules recouvertes de HAC6 par rapport aux cellules. Les cellules sont des chondrocytes humains (P2) dont le noyau est marqué au DAPI (bleu). Les particules encapsulent de la BSA-Cy3 (rouge) et sont mises en contact pendant 96 heures à 100 $\mu\text{g/mL}$.

Les particules encapsulant de la BSA-Cy3 sont aussi internalisées par les différents types de cellules. Le même comportement que pour les nanoparticules recouvertes de HAC6 et encapsulant du DEX-FITC est

observé, à savoir que les particules sont concentrées dans le cytoplasme des chondrocytes et que très peu de particules se retrouvent libres dans le milieu de culture.

3) Etude de l'influence des particules sur la production d'ARN messagers par les chondrocytes :
Biologie moléculaire

Le dosage des variations de la quantité d'ARN messagers (ARNm) produits par des chondrocytes de rat (P2) après exposition à différentes particules a été effectué. Les lots de particules utilisés sont regroupés dans le tableau IV-1 :

recouvrement	utilisation de BSA-Cy3	molécule encapsulée	Nomenclature
résHABioC6-20%	non	aucune	HA
résHABioC6-20%	non	CS	CS
PVA	non	aucune	PVA
résHABioC6-20%	5 %	aucune	HA BSA Cy3-5%
résHABioC6-20%	10 %	aucune	HA BSA Cy3-10%

Tableau IV-1 : Liste des différentes particules utilisées pour l'étude des variations de la quantité d'ARNm produits par les chondrocytes. Le lot de HAC6 utilisé est celui dont l'acidification a été obtenue par la résine échangeuse d'ions (rés signifie résine).

Pour cette étude, sept gènes ont été testés :

- Col2
- Agrecan
- COMP
- Col1
- Versican
- HAS2
- CD44

Les gènes RPLP0 et RP29 sont des « gènes de ménage » qui nous permettent de normaliser les valeurs obtenues pour chaque dosage.

Les ARNm, une fois extraits des cellules, sont transcrits en ADN complémentaires (ADNc). Ceux ci vont alors être amplifiés puis dosés afin de détecter d'éventuelles variations entre les cellules cultivées dans différentes conditions. Les figures IV-19, IV-20 et IV-21 présentent les taux d'expression obtenus pour gènes Col2, Agrecan et COMP respectivement.

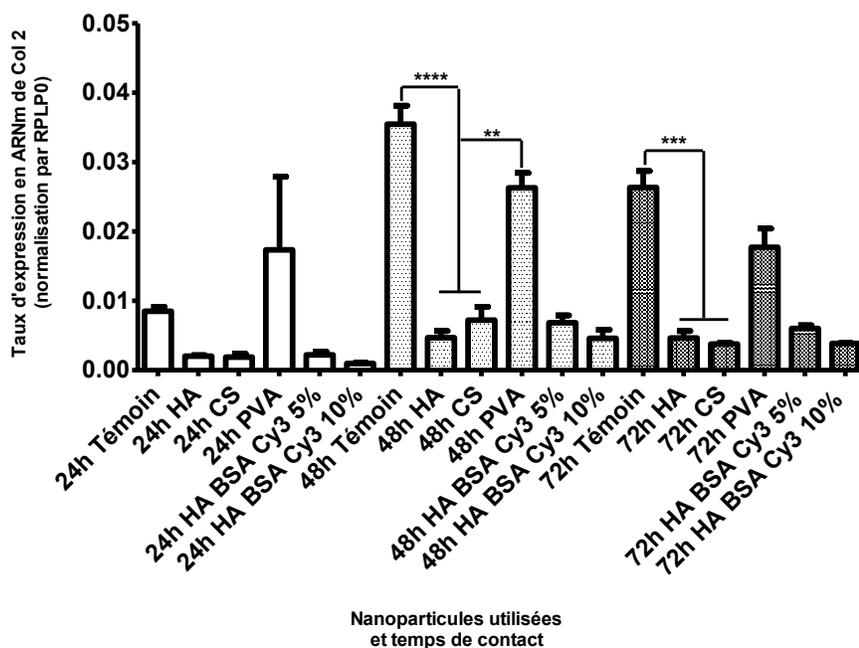


Figure IV-19 : Taux d'expression en ARNm de Col2 chez des chondrocytes de rat (P2) cultivés en monocouche et mis en contact pendant 24, 48 ou 72 heures avec différents types de particules. Les taux d'expression sont normalisés par le gène RPLP0.

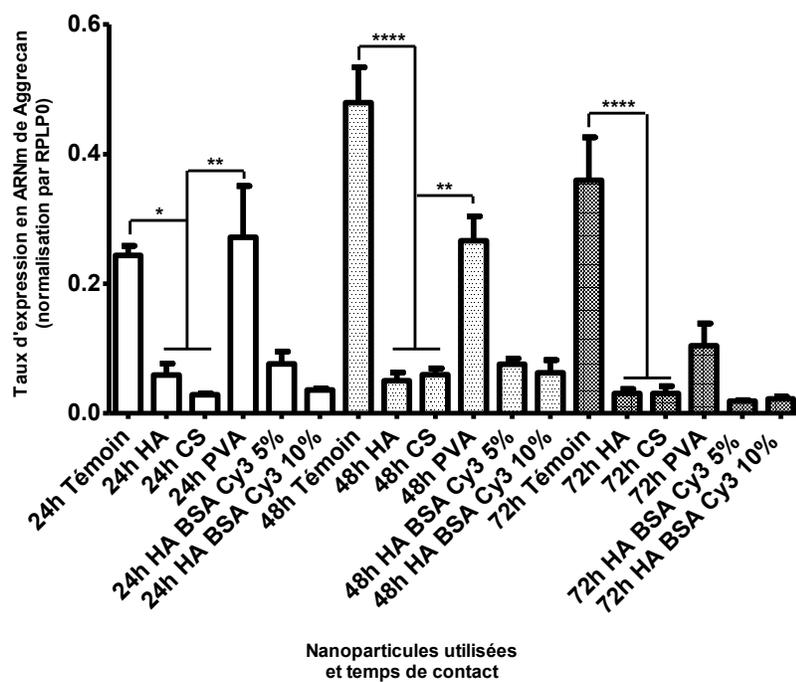


Figure IV-20 : Taux d'expression en ARNm de Aggrecan chez des chondrocytes de rat (P2) cultivés en monocouche et mis en contact pendant 24, 48 ou 72 heures avec différents types de particules. Les taux d'expression sont normalisés par le gène RPLP0.

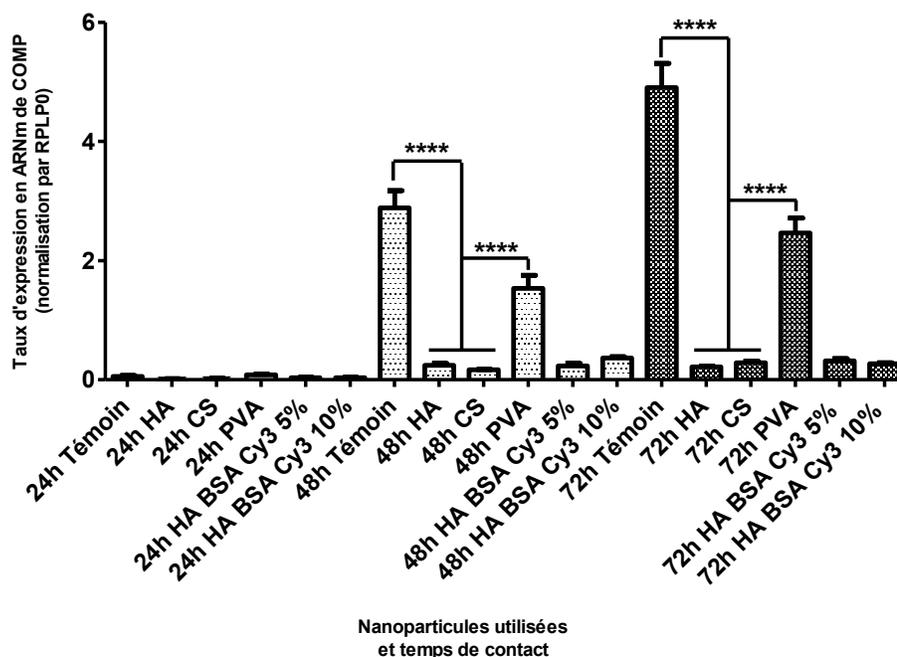


Figure IV-21 : Taux d’expression en ARNm de COMP chez des chondrocytes de rat (P2) cultivés en monocouche et mis en contact pendant 24, 48 ou 72 heures avec différents types de particules. Les taux d’expression sont normalisés par le gène RPLP0.

Interprétation des résultats obtenus

Les taux d’expression des gènes Col2, Agrecan et COMP varient selon l’environnement des cellules. On distingue deux groupes :

- les cellules témoins, c’est à dire non exposées à des particules et celles mises en contact avec les particules recouvertes de PVA qui expriment des taux d’ARNm semblables
- les cellules mises en contact avec des particules recouvertes de HAC6 dont les taux d’expression en ARNm restent très faibles en comparaison avec les cellules témoins.

Nous avons attribué cette variation au fait que les particules recouvertes de HAC6 sont internalisées dans les cellules, contrairement aux témoins et aux particules recouvertes de PVA. L’internalisation et les processus biologiques qui en découlent modifient les voies de signalisation des gènes Col2, Agrecan et COMP.

On remarque de plus que les lots de particules recouvertes de HA présentent les mêmes taux d'expression génique. Les cellules ne semblent pas être affectées par la présence de BSA-Cy3 ou de CS.

Concernant les autres gènes étudiés, nous n'avons pas observé de variation significative des taux d'expression en ARNm, et ce, quelles que soient les particules mises en contact avec les cellules. Nous supposons dans ce cas que l'expression de ces gènes passe par des voies de signalisation qui ne sont pas affectées par l'internalisation des particules recouvertes de HAC6.

4) Conclusion sur l'évaluation *in vitro* des particules

Nous avons observé que les particules recouvertes de HAC6 peuvent être utilisées *in vitro* et ne présentent pas de toxicité avérée, même à des concentrations de 100 µg/mL et jusqu'à 72 heures de contact.

Les chondrocytes internalisent beaucoup plus les particules recouvertes de HAC6 par comparaison avec celles recouvertes de PVA. Nous avons donc montré qu'une interaction spécifique est possible entre le CD44 et le HA modifié localisé en surface des particules.

Les analyses en biologie moléculaire des taux d'expression de certains gènes montrent des variations en fonction du type de particule mis en contact avec les chondrocytes. L'internalisation des particules de HAC6 induit des modifications au niveau des processus biologiques et inhibe l'expression de Col2, Agrecan et COMP.

B. Etudes *in vivo*

1) Rappel des résultats obtenus précédemment

Une étude préliminaire a été menée au laboratoire concernant le potentiel inflammatoire de nanoparticules de PLA recouvertes de HAC6 ou de PVA et encapsulant dans chaque cas du DEX-FITC⁴⁴. Les analyses effectuées portaient sur les marqueurs de l'inflammation (IL-1 β et TNF- α) ainsi que la synthèse de protéoglycanes au niveau des rotules. Pour cela des rats sains ont reçu une injection intra-articulaire d'une suspension de nanoparticules 40 µL (50 µg/mL) ; ils ont été sacrifiés après 5 jours puis les membranes synoviales et les rotules ont été prélevées pour réaliser les dosages.

Les taux d'expression de deux gènes de l'inflammation ($IL-1\beta$ et $TNF-\alpha$) ont été ensuite dosés après extraction des ARN totaux, retranscription puis amplification et comparés avec le groupe de rats témoins ayant reçu une injection de solution saline (contrôle 0 % d'inflammation) et un groupe de rats chez lesquels a été déclenché de l'arthrite par injection de parois de mycobactéries (100 % d'inflammation).

Les résultats obtenus présentés dans la figure IV-22 ont montré que les articulations des rats ayant reçu des injections de particules ne présentent pas de signes particuliers d'inflammation. Les taux d'expression d' $IL-1\beta$ et de $TNF-\alpha$ sont similaires à ceux des rats témoins et très inférieurs à ceux traités aux parois de mycobactéries. Ceci nous confirme que les particules formulées, quel que soit leur type de recouvrement, sont compatibles avec une utilisation *in vivo*.

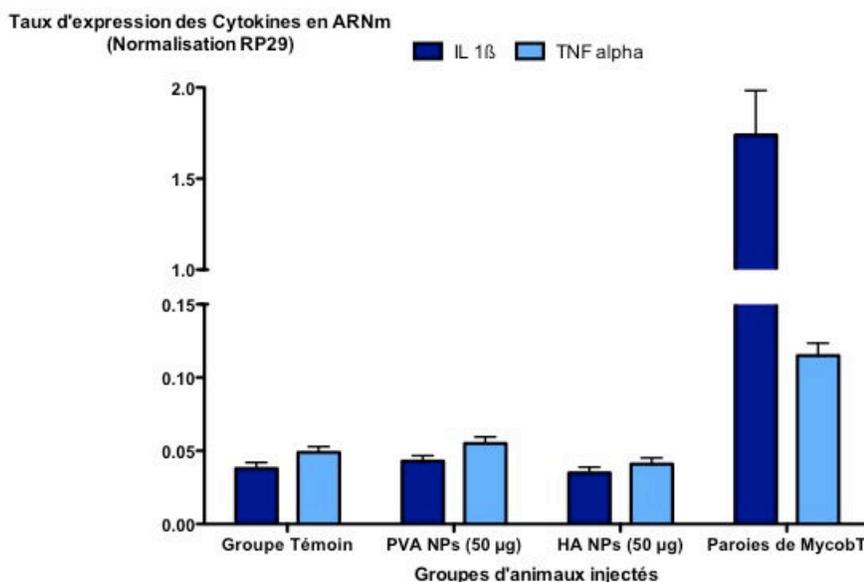


Figure IV-22 : Taux d'expression de deux marqueurs de l'inflammation : $IL-1\beta$ et $TNF-\alpha$ dosés après injection de suspension de particules dans des articulations de rats sains. Les particules sont soit recouvertes de HAC6, soit de PVA et n'encapsulent pas de molécule d'intérêt. Les contrôles 0 % et 100 % sont obtenus par injection d'une solution saline et déclenchement de l'inflammation par injection de parois de mycobactéries respectivement. Les valeurs obtenues sont normalisées par un gène de « ménage » : RP29.

L'activité de biosynthèse des protéoglycanes au niveau du cartilage patellaire a été mesurée par incorporation de Soufre radiomarqué ($\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$) 5 jours après l'injection des particules. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure IV-23 :

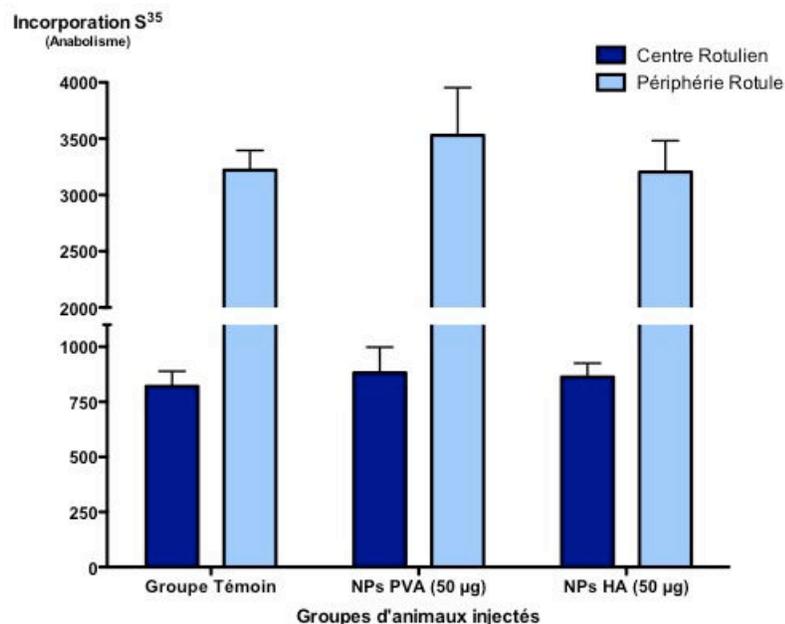


Figure IV-23 : Détermination de l'activité de biosynthèse des protéoglycanes au niveau du cartilage patellaire par incorporation de soufre radiomarqué. L'incorporation du radioélément est réalisée 5 jours après l'injection des particules, les mesures de la radioactivité sont effectuées au centre de la rotule (bleu foncé) ainsi qu'en périphérie (bleu clair).

Les résultats obtenus n'ont pas montré de variation significative entre la synthèse de protéoglycanes chez les rats témoins et les rats ayant reçu des nanoparticules. Malgré la présence de particules dans l'articulation, l'homéostasie du cartilage a été conservée. Pour rappel, une hausse de la synthèse des protéoglycanes en périphérie conjuguée à une diminution au centre aurait indiqué un effet délétère des particules injectées.

Ces premières évaluations *in vivo* avaient permis de vérifier que les particules ne présentent pas de toxicité marquée. Nous n'avons pas observé de hausse des marqueurs de l'inflammation ni de variation de la biosynthèse en protéoglycanes. Toutefois, cette première série d'expériences avait été effectuée avec des quantités relativement faibles de particules (2 µg par injection) et on pouvait conclure que le seuil de toxicité éventuel n'avait pas été atteint.

2) Poursuite de l'évaluation *in vivo* des particules, résultats obtenus au cours de nos travaux

Nous avons complété ces travaux par l'étude du devenir des particules que nous avons formulées, après injection intra-articulaire. Puisque les premiers résultats ne faisaient pas état d'une inflammation au niveau de l'articulation, nous avons cherché à augmenter la quantité de particules injectées afin de déterminer le seuil de toxicité. Parallèlement, nous avons cherché à comparer les effets d'injections multiples sur la structure des articulations saines. Des suspensions de nanoparticules (50 μ L) à différentes concentrations (0,5 ; 1 et 2 mg/mL), recouvertes de HAC6 ou de PVA et renfermant ou non du DEX-FITC ont donc été injectées dans des genoux de rats sains.

Notre objectif était de montrer que les particules sont non toxiques à plus fortes doses *in vivo* et, si possible, qu'elles peuvent être internalisées par les cellules de l'articulation. Une ou deux injections ont été réalisées à 7 jours d'intervalle, puis les animaux ont été sacrifiés 14 jours après la première injection.

3) Analyse histologique des compartiments articulaires

Les différentes colorations réalisées sur les coupes histologiques (cf Chapitre V) nous ont permis de constater l'absence de variation d'intégrité des tissus. Les clichés obtenus pour les rats témoins (injection de 50 μ L de solution saline) comparés à ceux ayant reçu une ou deux injections de suspension de particules sont présentés dans les figures IV-24 et IV-25.

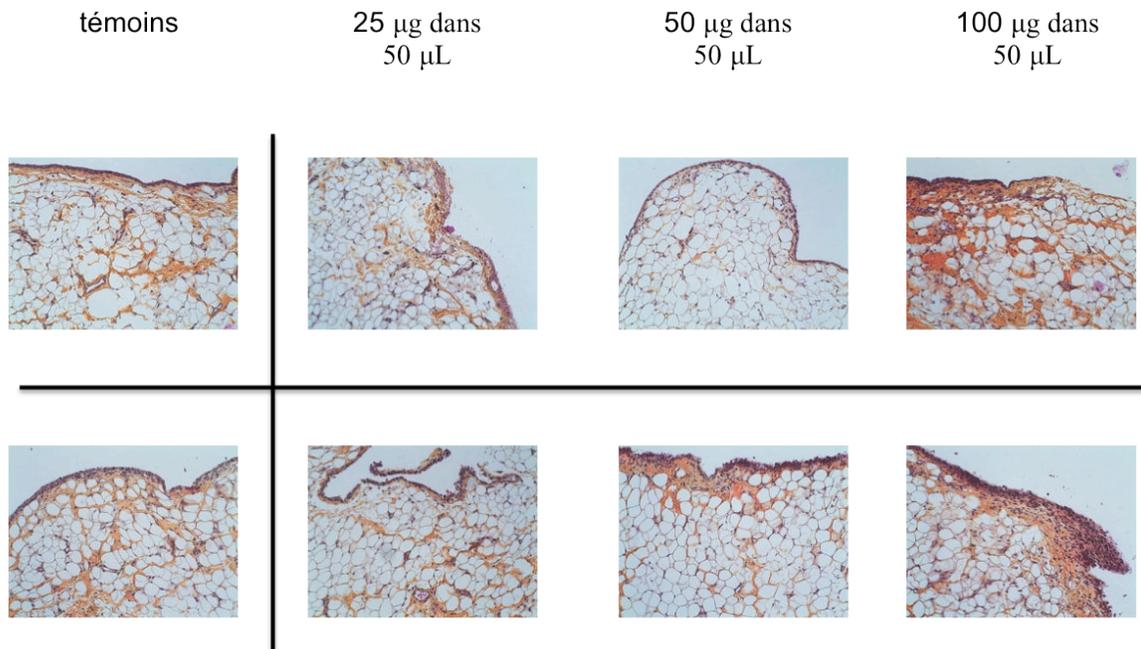


Figure IV-24 : Coupes histologiques et coloration HES des membranes synoviales après observation au microscope (grossissement X20). a) témoins, b) rats ayant reçu 25 μg de particules, c) rats ayant reçu 50 μg de particules, d) rats ayant reçu 100 μg de particules (recouvertes de HABioC6-31%). Les résultats de la ligne supérieure concernent les articulations ayant reçu une injection et ceux de la ligne inférieure correspondent à deux injections à sept jours d'intervalle.

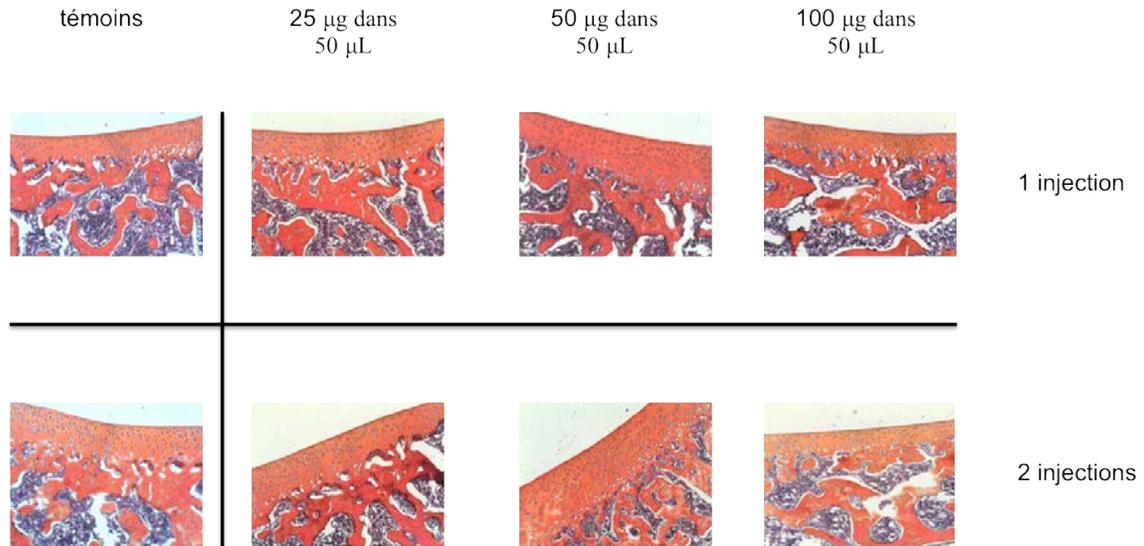


Figure IV-25 : Coupes histologiques et colorations HES des rotules après observation au microscope (grossissement X20). a) témoins, b) rats ayant reçu 25 µg de particules, c) rats ayant reçu 50 µg de particules, d) rats ayant reçu 100 µg de particules (recouvertes de HABioC6-31%). Les résultats de la ligne supérieure concernent les articulations ayant reçu une injection et ceux de la ligne inférieure correspondent à deux injections à sept jours d'intervalle.

a) Observation des coupes de membranes synoviales

L'observation des coupes de membranes n'a pas mis en évidence de différence majeure entre les animaux ayant reçu des particules et les témoins. Une légère hyperplasie (cellules colorées en violet foncé) est visible dans chaque cas et semble donc être la conséquence de l'injection plutôt que des particules. De plus, suite à l'injection de particules nous n'avons pas constaté de néovascularisation (qui peut être la conséquence d'une inflammation).

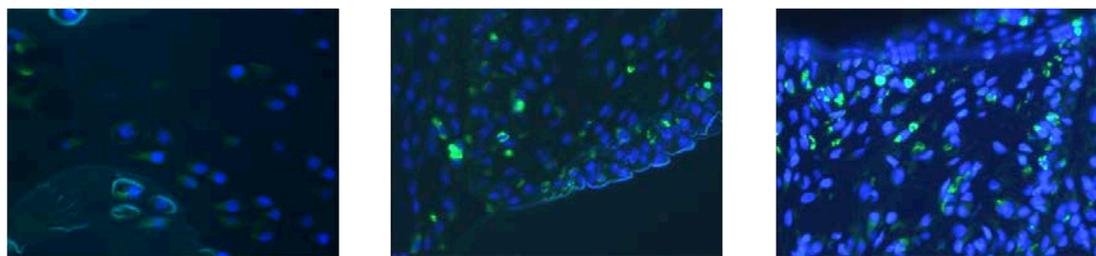
b) Observation des coupes de rotules

L'observation générale du cartilage en coloration HES est la même pour chaque condition. La surface articulaire est lisse, la densité cellulaire semble constante et la forme des cellules (notamment celles qui sont le plus proche de la surface) est identique. Le réseau collagénique (coloration RS LP) et la teneur en protéoglycanes (coloration BT) n'ont pas varié entre les différents groupes, les particules n'induisent donc pas de dégradation du cartilage.

Ces analyses histologiques effectuées sur des animaux sains n'ont pas montré d'effets délétères des particules recouvertes de HAC6. La structure du cartilage est préservée mais, en conséquence, rend les interactions particule/chondrocyte peu favorables. Les membranes synoviales sont légèrement hyperplasiques mais ne présentent pas de signes importants d'inflammation, de plus il n'y a pas de différence entre les tissus des rats ayant reçu des nanoparticules et ceux des rats témoins auxquels on a injecté une solution saline.

4) Localisation des particules fluorescentes au niveau des tissus

Des coupes histologiques ont été déparaffinées puis un marquage au DAPI a été réalisé (Vectashield® with DAPI) afin d'observer les noyaux des cellules et ainsi vérifier l'éventuelle internalisation de particules (Figure IV-26).



(a) rotule

(b) Membrane synoviale

(c) Membrane synoviale

Figure IV-26 : Observation au microscope des tissus de la patte gauche d'animaux ayant reçu 100 µg de particules après coloration des noyaux au DAPI, les noyaux apparaissent en bleu et les particules (FITC) en vert. a) rotule, b) et c) membranes synoviales (nanoparticules recouvertes de HABioC6-31%).

L'observation des membranes synoviales, fait apparaître des points d'intensité lumineuse plus marquée qui nous laissent penser qu'il s'agit d'agrégats de particules car nous avons également observé cette tendance lors de l'observation en microscopie de l'internalisation des particules pour des cellules cultivées en monocouche. Ceci est de plus cohérent avec le rôle de filtre joué par la membrane synoviale qui élimine les métabolites présents dans la cavité articulaire.

Concernant les rotules des animaux ayant reçu des particules fluorescentes, nous n'avons pas pu mettre en évidence la présence de particules à proximité ou dans les cellules. Le cartilage fluoresce naturellement à des longueurs d'onde similaires à celle émise par la FITC et rend délicate la détection. Toutefois nous n'avons pas mis en évidence de zone dont l'intensité lumineuse est plus élevée, qui serait la conséquence d'une accumulation de particules en un endroit précis.

Cette étude de la localisation des particules vient confirmer les résultats observés en histologie : les particules n'interagissent pas (ou très peu) avec le cartilage articulaire sain et ont tendance à être absorbées par la membrane synoviale.

Conclusions du chapitre

Nous avons pu démontrer grâce à cette étude que les particules sont biocompatibles et non toxiques.

Les tests de toxicité effectués ont montré que même à une concentration de 100 µg/mL, les particules sont relativement bien tolérées par les cellules. Nous n'avons pas observé de hausse significative de l'activité LDH, en revanche, une baisse de l'activité MTT marquée est visible. On observe également une baisse du nombre de cellules dans les puits où nous avons déposé des particules par rapport aux témoins. Nous supposons que l'apport de particules limite la prolifération cellulaire en raison des interactions particule/chondrocyte qui s'établissent, et plus particulièrement lorsque les particules sont internalisées.

Les particules recouvertes de HAC6 et mises en contact avec des cellules (chondrocytes et synoviocytes) en monocouche sont progressivement internalisées (à partir de 48 heures). Pour les particules recouvertes de PVA, seuls les synoviocytes les internalisent de façon significative. Toutefois, ceux-ci servent de filtre pour l'articulation et sont beaucoup moins spécifiques que les chondrocytes. Ces résultats prouvent l'intérêt de la couverture en HAC6 des particules pour cibler les cellules de l'articulation et principalement les chondrocytes.

Les tests réalisés *in vivo* sur des animaux sains ont confirmé la cytocompatibilité des particules même à plus forte concentration (100 µg dans 50 µL). Le cartilage n'a pas présenté d'inflammation ni de variation de structure. On observe une légère hyperplasie au niveau de la membrane synoviale qui semble être la conséquence de l'injection car le profil des coupes histologiques est le même chez les rats témoins. Les particules n'ont cependant pas été internalisées par les chondrocytes en raison de la structure du cartilage articulaire sain ; il semble que l'on en retrouve à proximité des synoviocytes mais il est difficile d'être affirmatif en raison de l'autofluorescence des tissus qui parasite le signal de la DEX-FITC. Ces expériences vont être renouvelées avec de la BSA-Cy3 comme traceur fluorescent pour s'affranchir de ce problème.

Références bibliographiques

1. Chevalier, X. & Richette, P. Cartilage articulaire normal : anatomie, physiologie, métabolisme, vieillissement. *EMC - Rhumatologie-Orthopédie* **2**, 41–58 (2005).
2. Treilleux, I., Mallein-Gerin, F., Leguellec, D. & Herbage, D. Localization of the expression of type I, II, III collagen, and aggrecan core protein genes in developing human articular cartilage. *Matrix* **12**, 221–232 (1992).
3. Chevalier, X. Le cartilage normal : Physiopathégnie de l'arthrose. *La Presse médicale* **27**, 75–80 (1998)
4. Kronenberg, H. M. Developmental regulation of the growth plate. *Nature* **423**, 332–336 (2003).
5. M.-T, C. The chondrocyte: From cell aging to osteoarthritis. *Joint Bone Spine* **67**, 557–560 (2000).
6. Madry, H., van Dijk, C. N. & Mueller-Gerbl, M. The basic science of the subchondral bone. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* **18**, 419–433 (2010).
7. W, A. C. & Philippa, F.-W. The chondrocyte. *International journal of biochemistry & cell biology* **35**, 401–404 (2003).
8. Lafont, J. E. Lack of oxygen in articular cartilage: consequences for chondrocyte biology. *Int J Exp Pathol* **91**, 99–106 (2010).
9. Otte, P. Basic cell metabolism of articular cartilage. Manometric studies. *Z Rheumatol* **50**, 304–312 (1991).
10. Terry, D. E. *et al.* N-acylation of glucosamine modulates chondrocyte growth, proteoglycan synthesis, and gene expression. *J. Rheumatol.* **32**, 1775–1786 (2005).
11. Flannery, C. R., Little, C. B., Hughes, C. E. & Caterson, B. Expression and Activity of Articular Cartilage Hyaluronidases. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **251**, 824–829 (1998).
12. Shlopov, B. V. *et al.* Osteoarthritic Lesions. Involvement of three different collagenases. *Arthritis & Rheumatism* **40**, 2065–2074 (1997).
13. Bordji, K. *et al.* Biomateriaux polysaccharidiques. *Actualite en biomateriaux* (1998).
14. Vincourt J.B., Etienne S., Cottet J., Delaunay C., Malanda B., Lionneton F., Sirveaux F., Netter P., Plénat F., Mainard D., Vignaud J.M., Magdalou J. C-Propeptides of Procollagens I-alpha-1 and II that Differentially Accumulate in Enchondromas versus Chondrosarcomas Regulate Tumor Cell Survival and Migration. *Cancer Research*, **70**, 4739-4748 (2010)

15. Petit, B., Ronzière, M. C., Hartmann, D. J. & Herbage, D. Ultrastructural organization of type XI collagen in fetal bovine epiphyseal cartilage. *Histochemistry and Cell Biology* **100**, 231–239 (1993).
16. Roughley, P. J. & Lee, E. R. Cartilage proteoglycans: structure and potential functions. *Microsc. Res. Tech.* **28**, 385–397 (1994).
17. Sandy, J. D., Flannery, C. R., Neame, P. J. & Lohmander, L. S. The structure of aggrecan fragments in human synovial fluid : evidence for the involvement in osteoarthritis of a novel proteinase which cleaves the Glu 373-Ala 374 bond of the interglobular domain. *The Journal of clinical investigation* **89**, 1512–1516 (1992)
18. Gerwin, N., Hops, C. & Lucke, A. Intraarticular drug delivery in osteoarthritis☆. *Advanced Drug Delivery Reviews* **58**, 226–242 (2006).
19. T, I., M, S., H, K., H, Y. & K, N.-I. Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint
. *Archives of Histology and Cytology* **63**, 17–31 (2000).
20. Mason, R. M., Levick, J. R., Coleman, P. J. & Scott, D. Biochemistry of synovium and synovial fluid. *Biology of the Synovial Joint* 252–264 (1999).
21. Reginster, J. Y. The prevalence and burden of arthritis. *Rheumatology (Oxford)* **41 Supp 1**, 3–6 (2002).
22. Boston Medical Center, USA, Boston University Arthritis Center, USA, T, F. D. & ZHANG, Y. An update on the epidemiology of knee and hip osteoarthritis with a view to prevention
. *Arthritis and rheumatism* **41**, 1343–1355 (1998).
23. INRCA Geriatric Department I Fraticini, ITA *et al.* Epidemiological profile of symptomatic osteoarthritis in older adults: a population based study in Dicomano, Italy
. *Annals of the rheumatic diseases* **62**, 576–578 (2003).
24. The Twin Research Unit, St Thomas' Hospital, GBR, Department of Epidemiology and Preventive Medicine, Alfred Hospital, AUS, M, C. F., D, S. T. & N, B. what is the evidence that osteoarthritis is genetically determined?
. *Baillière's clinical rheumatology* **11**, 657–669 (1997).
25. Lund University, SWE, M, E. & S, L. L. Risk factors for symptomatic Knee osteoarthritis fifteen to twenty-two years after meniscectomy
. *Arthritis and rheumatism* **50**, 2811–2819 (2004).
26. Felson, D. T. *et al.* Osteoarthritis: New Insights. Part 1: The Disease and Its Risk Factors. *Ann Intern Med* **133**, 635–646 (2000).
27. Vincent, T. L. & Watt, F. E. Osteoarthritis. *Medicine* **38**, 151–156 (2010).
28. Browne, J. E. & Branch, T. P. Surgical alternatives for treatment of articular cartilage lesions. *J Am Acad Orthop Surg* **8**, 180–189 (2000).
29. <http://www.cartilage.fr/alteration-cartilage.php>.

30. <http://www.maitrise-orthop.com/viewPage.do?id=706>.
31. Umlauf, D., Frank, S., Pap, T. & Bertrand, J. Cartilage biology, pathology, and repair. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**, 4197–4211 (2010).
32. Hunziker, E. B. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthr. Cartil.* **10**, 432–463 (2002).
33. Wang, C.-C., Yang, K.-C., Lin, K.-H., Liu, H.-C. & Lin, F.-H. A highly organized three-dimensional alginate scaffold for cartilage tissue engineering prepared by microfluidic technology. *Biomaterials* **32**, 7118–7126 (2011).
34. Bohsali, K. Contemporary Medical and Surgical Management of Osteoarthritis. *Northeast Florida Medicine*, **58**, 45-48 (2007)
35. Henrotin, Y. Advances in the Treatment of Osteoarthritis and the Role of Chondroitin Sulphate - A Review. **5**, 11–17 (2010).
36. Courtney, P. & Doherty, M. Joint aspiration and injection and synovial fluid analysis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* **23**, 161–192 (2009).
37. Cazenave, A. Debridement, abrasion and microfracture for osteoarthritis of the knee. at <http://www.orthopale.com/arthroscopic-debridement.pdf>
38. Yen, Y.-M. *et al.* Treatment of osteoarthritis of the knee with microfracture and rehabilitation. *Med Sci Sports Exerc* **40**, 200–205 (2008).
39. Takahashi, S., Oka, M., Kotoura, Y. & Yamamuro, T. Autogenous callo-osseous grafts for the repair of osteochondral defects. *J Bone Joint Surg Br* **77**, 194–204 (1995).
40. Bugbee, W. D., Gortz, S., Hwang, J., Osteochondral Graft Transfer-Techniques, Outcomes, and the Future. *US Musculoskeletal Review* **3**, 75-80 (2008)
41. Szerb, I., Hangody, L., Duska, Z. & Kaposi, N. P. Mosaicplasty: long-term follow-up. *Bull Hosp Jt Dis* **63**, 54–62 (2005).
42. Nagle, J. A. Knee Joint Preservation With Autologous Cartilage Implantation. *AORN Journal* **86**, 550–562 (2007).
43. Cole, B. J. & Cohen, B. Chondral Injuries of the Knee A Contemporary View of Cartilage Restoration. *Orthopedic Special Edition* **6**, 71-76 (2000)
44. Laroui, H. *Nanosphères polymères à couverture de hyaluronate pour la délivrance ciblée de molécules actives dans le traitement des affections du cartilage.* (Doctorat de l'Université Nancy 1: 2007).

Chapitre V : Matériels et méthodes

I. Synthèse des dérivés amphiphiles du HA

Les protocoles décrits dans cette partie font référence au chapitre II.

Le schéma de la réaction qui conduit à la formation de HAC6 est présenté sur la figure V-1 :

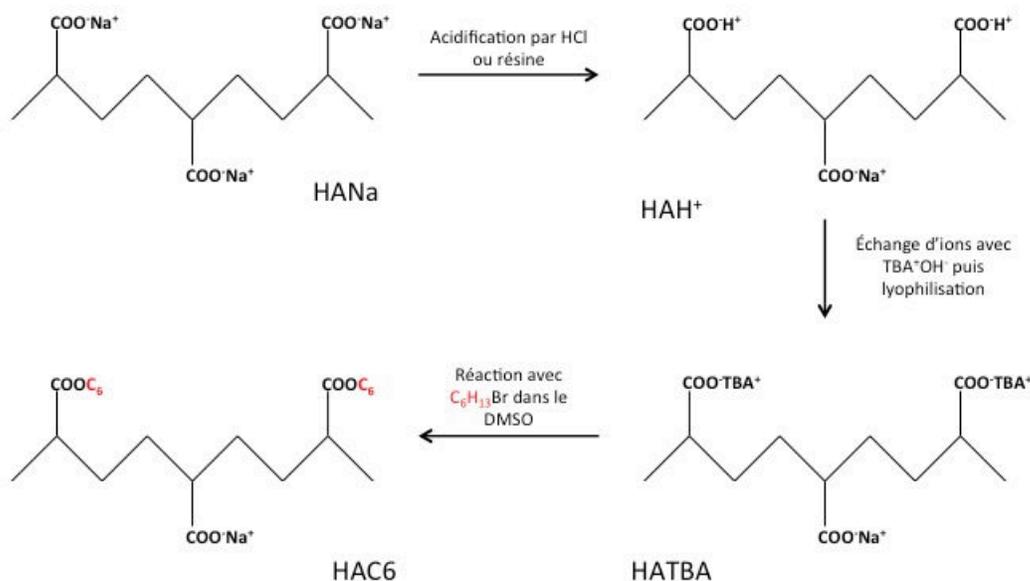


Figure V-1: Schéma réactionnel de la synthèse de HAC6 (seules les fonctions carboxyliques du HA sont montrées car elles sont les seules à réagir lors de cette synthèse).

A. Protocole de synthèse des HAC6

- 1) Acidification du HANa : Afin de rendre soluble le HANa dans le DMSO, il faut au préalable le transformer en son sel de tétrabutylammonium : 10 g de HANa sont tout d'abord mis en suspension dans un mélange contenant 490 mL d'EtOH 70 % et 10 mL d'HCl 0,06 M, pendant 15

minutes à 4 °C sous agitation. Le mélange est filtré (filtre borosilicate n° 4) puis lavé avec de l'éthanol 70 % afin d'éliminer les ions chlorure et sodium formés 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.

- 2) Le HA alors obtenu sous sa forme acide (HAH^+) est ensuite mis en suspension dans 1 L d'eau sous agitation et une solution de TBAOH (hydroxyde de tétrabutylammonium) 0,15 M est ajoutée progressivement jusqu'à obtenir la neutralisation du mélange à pH 7. Le HA-TBA alors synthétisé est ensuite lyophilisé.
- 3) Le HA-TBA lyophilisé est solubilisé à 1 % (poids/volume) dans le DMSO pendant 24 heures. La quantité de $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{Br}$ ajoutée est calculée en tenant compte du taux de substitution visé et de la réactivité supposée de ce dérivé. Le mélange est laissé sous agitation pendant 24 heures sous flux d'azote.
- 4) Après obtention du HAC6, 110 mL de NaCl 2,5 M sont ajoutés au mélange pendant 1 heure à température ambiante pour échanger les ions TBA^+ des groupements carboxylate qui n'ont pas réagi. Le produit obtenu est précipité dans 6 L d'acétone, l'agitation étant laissée pendant 15 minutes. 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 maintenu à température ambiante pour évaporer l'acétone résiduelle. Le dérivé de HA est finalement stocké à 4 °C.

- Acidification du HANa par résine échangeuse de cations

La résine DOWEX 50WX8-400 hydrogen form est conditionnée sous forme H^+ après des lavages à l'eau puis échange de cations par une solution HCl 1 N pendant 30 minutes. Une fois rincée et filtrée, elle est conservée au réfrigérateur dans un minimum d'eau. Une solution de HANa dans l'eau (typiquement 10 grammes dans 500 mL d'eau) est ajoutée à la suspension de résine, le mélange est placé sous agitation pendant 3 heures puis filtré (filtre borosilicate n° 4) pour récupérer le HA acidifié (HAH^+).

B. Détermination du taux d'acidification

La détermination du taux d'acidification se fait à l'aide d'un appareil de type Autotitrator 736 GP Titrimo (Metrohm, Suisse). Pour cela, environ 10 mg de HAH^+ sont mis en solution dans 12,5 mL d'eau MilliQ

puis la titration a lieu par ajout de NaOH (1 M). La détermination du point équivalent permet alors de connaître la part des fonctions carboxyliques du HA qui a été acidifiée.

C. Méthodes de caractérisation des différents produits

1) Mesure des masses molaires

a) Rappels sur la théorie de la diffusion de la lumière

La théorie fondamentale de la diffusion de la lumière par des solutions de polymère 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 :

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

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,

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

Avec :

N_A : le nombre d'Avogadro, n : l'indice de réfraction de l'éluant, dn/dC : la variation de l'indice de réfraction en fonction de 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.

b) Equipements

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

- d'une pompe Waters 590,
- d'un dégazeur (Degazys DG 1310, Uniflow),
- d'une boucle d'injection de 200 μL ,
- d'une série de colonnes PL aquagel -OH 30, 40 et 50 $8\mu\text{m}$ (de 100 à 1 000 000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) 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.

c) Conditions expérimentales

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

Le poids sec des échantillons est déterminé préalablement 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 sont élués quantitativement. Le débit de la pompe est fixé à 0,7 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ et 24 heures 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 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 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.

Environ 25 mg de HAH^+ (HA sous sa forme acide) sont préalablement mis en solution dans un mélange contenant 0,5 g de NaCl, 5,6 mL d'éthanol et 2,4 mL d'eau. La solution est placée sous agitation à 4 °C

pendant une nuit, le HA est ensuite filtré sur fritté n° 4 puis séché à l'étuve. Cet échange d'ions permet d'obtenir du HANa qui pourra être comparé avec les HA natifs afin d'estimer les éventuelles pertes de masses molaires lors de l'étape d'acidification.

2) Etude par RMN ¹H

a) Principe

La détection de la résonance magnétique nucléaire se produit lorsque des noyaux atomiques de spin non nul sont placés dans un champ magnétique externe uniforme (généralement) et excités par un rayonnement radiofréquence accordé sur les différences d'énergie entre les différents états de spin nucléaire possible.

La fréquence de résonance (appelée aussi fréquence de Larmor) ν_0 est proportionnelle au champ appliqué B_0 tel que :

$$\nu_0 = \gamma B_0$$

avec : $\gamma = \frac{\gamma}{2\pi}$ le rapport gyromagnétique exprimé en MHz/T

Ce rapport gyromagnétique est spécifique pour chaque isotope ce qui permet de régler l'appareil sur la fréquence d'excitation du noyau à analyser.

b) Le déplacement chimique

Lorsqu'une molécule est soumise à un champ magnétique, le mouvement des électrons induit des champs magnétiques locaux qui vont diminuer (diamagnétisme) ou augmenter (paramagnétisme) le champ magnétique global.

La façon dont la fréquence de résonance de chaque noyau est affectée par ces champs locaux est caractérisée par une constante d'écran σ qui contient les contributions dia et paramagnétiques :

$$\nu_L = \nu_0 * (1 - \sigma)$$

Le déplacement chimique (ou différence de fréquence due à l'environnement électronique) noté δ permet de caractériser facilement chaque noyau considéré :

$$\delta = \frac{\nu_L - \nu_{ref}}{\nu_0} * 10^6$$

où ν_{ref} est la fréquence de la référence choisie (en général le tétraméthylsilane ou TMS pour l'analyse de ^1H).

c) Conditions expérimentales

Les analyses du HA et des dérivés amphiphiles HAC6 ont été réalisées grâce à un spectromètre de marque Brücker Advance300 à 300,13 MHz et 300 K. le traitement des spectres ^1H est effectué par le logiciel WIN-NMR 6.1 de chez Brücker et les déplacements chimiques sont donnés en prenant pour référence le solvant deutéré (D_2O).

d) Détermination du taux de substitution des HAC6

Une solution de NaOD dans D_2O à 4 % (w/v) à laquelle on ajoute une quantité connue de phtalate de potassium (environ 25 mg), qui servira de référence interne, est préparée. 25 mg de polymère (HAC6) sont dissous dans 1mL de la solution NaOD + phtalate et mis en agitation pendant 4 heures à température ambiante afin d'hydrolyser les liaisons ester. La solution est ensuite transférée dans un tube RMN pour procéder à l'analyse.

Les protons du noyau aromatique du phtalate de potassium sont déblindés. On observe leur signal entre 7,27 et 7,36 ppm (Figure V-2).

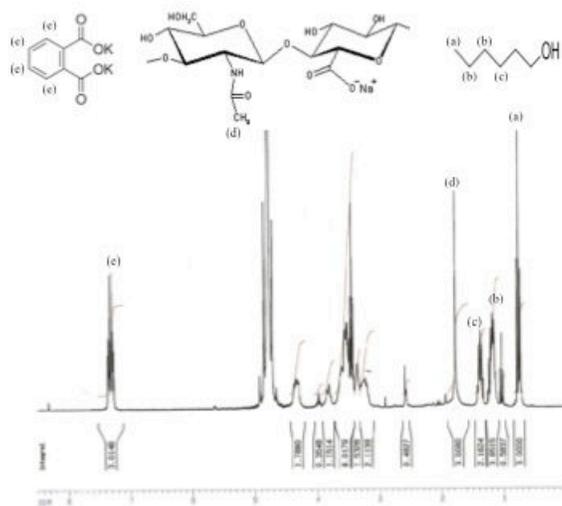


Figure V-2 : Spectre RMN ^1H d'un hyaluronate modifié par des chaînes alkyle (C6) (HABioC6-17% concentration de 20 mg.mL^{-1} dans D_2O), avec (a) (b) et (c) les signaux des protons de l'éthanol, (d) le signal des protons du méthyl du groupement acétamide et (e) les signaux des protons du phtalate de potassium. Le massif entre 3 et 5 ppm correspond aux signaux des protons du squelette de HA.

Après hydrolyse, les chaînes alkyle se retrouvent libres en solution et on peut donc facilement quantifier le taux de substitution pour chaque synthèse. Les signaux des protons situés sur le carbone comportant la fonction alcool des chaînes alkyle ne sont pas pris en compte lors du calcul du taux de substitution car, en raison de la proximité du $-\text{OH}$, leur déplacement chimique est déblindé et donc confondu avec le signal des protons du squelette polysaccharidique.

Le nombre de moles d'hexanol récupérées dans la solution (lors de la réaction $\text{HAC6} + \text{NaOD}$) est donné par :

$$n(\text{C6}) = \frac{A(\text{C6})/11}{A(\text{ph})/4}$$

avec :

$A(\text{C6})$ et $A(\text{ph})$ la somme des aires des pics attribués à la chaîne hexyl (11 protons à 0,75 ; 1.19 et 1,80 ppm) et du phtalate de potassium (4 protons à 7,3 ppm), respectivement.

Ceci nous permet de déterminer alors la quantité de HANa libéré dans la solution:

$$n(\text{HANa}) = \frac{m(\text{HAC6}) - M(\text{C6}) * n(\text{C6})}{M(\text{HANa})}$$

avec:

$n(\text{HANa})$ le nombre de moles d'unités dimères de HA sous forme HANa

$M(\text{HANa})$ la masse molaire d'une unité dimère de HANa (401 g/mol)

$m(\text{HAC6})$ la quantité massique de HAC6 introduit

$M(\text{C6})$ la masse molaire de l'hexanol

Le taux de substitution est alors calculé par:

$$\tau = \frac{n(\text{C6})}{n(\text{C6}) + n(\text{HANa})} * 100 = \frac{\frac{\frac{A(\text{C6})}{11}}{4}}{\frac{\frac{A(\text{C6})}{11}}{4} + \frac{m(\text{HANa})}{M(\text{HANa})}} * 100$$

D. Propriétés des HAC6 en solution

La caractérisation en terme de pouvoir tensioactif des HAC6 a été effectuée par tensiométrie superficielle et interfaciale via la technique de l'anneau de Noüy. Elle consiste à étirer un ménisque de la solution étudiée à l'aide d'un anneau en platine. L'anneau est tout d'abord plongé dans la solution considérée, puis on abaisse lentement le récipient contenant le liquide. Lorsque l'anneau arrive à l'interface, il va l'étirer et par conséquent, augmente l'aire interfaciale.

Les forces s'exerçant sur l'anneau étant les forces de gravité et superficielle, il est possible de relier la tension interfaciale à cette force de traction. La force de traction qui s'exerce, augmente au fur et à mesure de l'étirement du ménisque, passe par un maximum puis décroît jusqu'à la rupture du ménisque. Il est ainsi possible de mesurer la tension interfaciale statique par la relation suivante :

$$\gamma = \frac{F_{\max}}{4\pi R} J \frac{R \Delta \rho g R^3}{r' F_{\max}}$$

avec :

γ : la tension interfaciale, F_{max} : la force maximale de traction, R : le rayon de l'anneau, r' : le rayon de la section de l'anneau, $\Delta\rho$: la différence de densité entre la solution et l'air J : le facteur correctif de Harkins et Jordan, g : la force de gravité.

- protocoles

Une solution mère de HAC6 à 5 g/L dans l'eau MilliQ est préparée et mise sous agitation pendant une nuit. Cette solution est ensuite diluée afin de préparer des solutions de concentration connue (mélange pendant 1 heure minimum). 20 mL de la solution à analyser sont placés dans un récipient parfaitement propre et sec. L'anneau de Noüy (Pt/Ir, RI21, Krüss) est alors placé à l'interface entre l'eau et l'air. La solution est laissée ainsi pendant 30 minutes afin d'atteindre l'équilibre thermique. Le pilulier contenant la solution est ensuite abaissé jusqu'au moment de la rupture du film interfacial au niveau de l'anneau.

Le protocole de mesure de la tension interfaciale entre l'eau et le dichlorométhane est sensiblement le même que le précédent. Une fois l'anneau de Noüy plongé dans la solution aqueuse de HA, 20 mL de dichlorométhane sont ajoutés au système et le tout est laissé 30 minutes au repos pour atteindre l'équilibre thermique. L'anneau est ensuite poussé verticalement dans la phase organique (par abaissement du pilulier) jusqu'à rupture du film interfacial. Les mesures sont effectuées à 25 °C.

Pour s'assurer de leur propreté, chaque pilulier destiné à contenir la solution aqueuse de polymère est plongé dans un mélange eau oxygénée/acide sulfurique (30/70 en volume) pendant 24 heures, puis rincé abondamment à l'eau MilliQ et enfin placé dans une étuve à 50 °C. L'anneau est lavé à l'eau puis à l'acétone et finalement séché à l'aide d'un chalumeau de manière à le rendre parfaitement propre après chaque mesure. Les différentes concentrations testées sont 5 ; 2,5 ; 1 ; 0,5 ; 0,1 et 0,01 g/L.

Ces analyses nous permettent de comparer les produits obtenus en fonction de leur différents taux de substitution et nous renseignent sur la capacité du HAC6 à stabiliser l'interface créée entre l'eau et le dichlorométhane lors de la formulation d'émulsions.

II. Formulation des nanoparticules

Les protocoles ci dessous font référence au chapitre III de ce manuscrit.

A. Généralités sur les émulsions¹

Une émulsion est un système obtenu par agitation d'une phase dispersée dans une phase dispersante, les liquides constitutifs de chaque phase étant non miscibles. Le rapport volumique entre les phases peut être variable. On parlera par exemple d'émulsion concentrée si la phase continue constitue moins de 30 % du volume total.

L'agitation pour réaliser l'émulsion peut se faire de différentes manières (manuelle, barreau aimanté, ultrasons, ...) et ceci va influencer la taille finale de l'émulsion. Plus l'énergie fournie au système est importante, plus la taille des gouttelettes (et donc, dans notre cas après évaporation du solvant organique, la taille des particules) sera petite. L'agitation doit être homogène au sein du système pour permettre d'obtenir une distribution en taille des gouttelettes la plus faible possible.

L'ajout d'un émulsifiant (ou stabilisant) au système abaisse la tension interfaciale entre ces deux phases, ce qui favorise la formation de gouttelettes plus petites et stabilise le système lorsque l'agitation a cessé.

B. Stabilité des émulsions

La formation des gouttelettes engendre une augmentation de la surface de contact entre les deux phases. Il existe à l'intérieur des gouttelettes une surpression ΔP appelée surpression de Laplace qui est proportionnelle à l'énergie interfaciale du système et inversement proportionnelle à leur rayon.

$$\Delta P = \frac{2\gamma}{r}$$

avec :

ΔP : pression de Laplace (Pa), γ : énergie interfaciale (mJ/m²), r : rayon (m)

Une fois formulées, les émulsions ne sont pas des systèmes thermodynamiquement stables. La démixtion de l'émulsion formée est plus ou moins rapide selon la composition des phases, la taille des gouttelettes et la présence ou non d'un agent stabilisant. Il existe quatre phénomènes de déstabilisation des émulsions :

- Le mûrissement d'Ostwald

Il consiste en un flux de matière, des petites gouttes vers les grosses. Lorsque la distribution en taille des gouttelettes n'est pas homogène, la surpression de Laplace n'est pas la même entre les petites gouttes et les grosses : les potentiels chimiques ne sont pas à l'équilibre. Le système tend donc à s'équilibrer, ce qui fait disparaître les petites gouttelettes au profit des grosses.

- La floculation

La floculation provient du fait que les gouttes peuvent adhérer les unes aux autres si les interactions attractives entre elles sont suffisamment fortes. Ce phénomène est souvent un signe précurseur de la sédimentation des gouttelettes.

- La sédimentation et le crémage

En raison de la pesanteur, les gouttes plus denses que la phase dispersante vont se concentrer au fond du récipient au cours du temps. On parle alors de sédimentation. Dans le cas contraire, lorsque les gouttes sont plus légères que la phase dispersante, elles vont migrer à la surface, ce phénomène est appelé crémage. Ces deux processus sont en général réversibles par simple agitation.

- La coalescence

Tout comme le mûrissement d'Ostwald, la coalescence est un phénomène irréversible. C'est le processus inverse de la dispersion : les gouttes vont fusionner entre elles, ce qui provoquera à terme la démixtion des phases.

C. Protocole de formulation d'une émulsion simple (o/w)

Dans un tube FalconTM (BD Biosciences, USA) de 50 mL, 4 mL de phase organique (PLGA 50/50 (Sigma Aldrich, USA) dissout dans du dichlorométhane à 25 g/L) sont émulsifiés par pré-mélange (agitation + vortex pendant 2 minutes) avec 8 mL de solution aqueuse de HAC6 (5 g/L). Cette émulsion grossière est ensuite soumise à l'action d'une sonde à ultrasons pendant 2 minutes à une puissance de 50 % à 50 % de cycle actif, c'est-à-dire que la sonde va produire des ultrasons pendant 1 seconde puis être au repos la seconde d'après (1 seconde d'ultrasons pour un cycle de 2 secondes) (Figure V-3). L'appareil utilisé est constitué d'une sonde à ultrasons couplée à un amplificateur Vibracell 75043 (Bioblock Scientific, France).

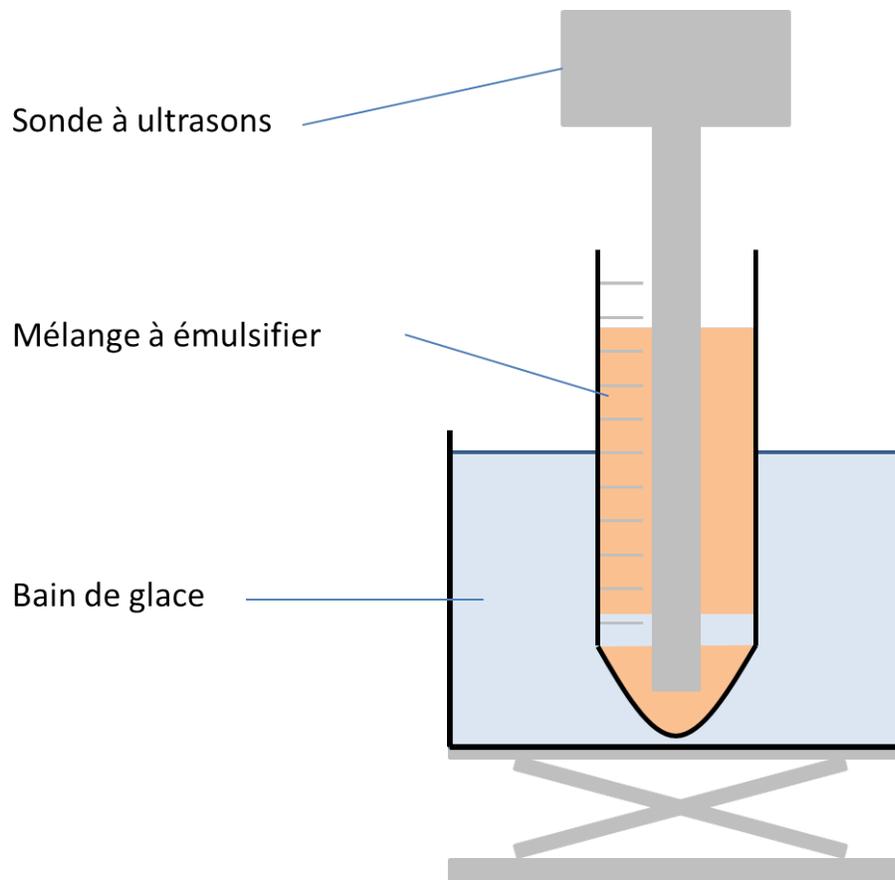


Figure V-3 : Schéma du dispositif permettant la préparation d'émulsions. La sonde à ultrasons est plongée au plus profond du tube Falcon™ sans toutefois toucher la paroi, un bain de glace permet d'éviter les échauffements locaux lors de l'émulsification.

D. Protocole de formulation d'une émulsion double (Figure V-4)

Dans le cas d'une émulsion double, une première émulsion eau dans huile (w/o) est préparée en mélangeant 400 μL de phase aqueuse dite « interne » contenant de l'albumine de sérum bovin (BSA) à 25 g/L qui agit comme stabilisant interne. Une molécule d'intérêt (traceur fluorescent, HA, CS, ...) peut y être éventuellement ajoutée. Cette phase aqueuse interne est mélangée à 4 mL de solution organique (PLGA dans du dichlorométhane à 25 g/L). L'agitation est effectuée au vortex pendant 2 minutes puis par sonication pendant 2 minutes à 50 % de cycle actif à une puissance de 50 %. On obtient alors la première émulsion w/o.

L'émulsion double finale est formée par ajout de 8 mL de solution aqueuse de HAC6 (5 g/L) à la précédente émulsion. Le système est agité au vortex pendant 30 secondes puis soniqué pendant 10 secondes à 50 % de cycle actif à une puissance de 35 %.

Une fois l'émulsion double réalisée, la sonde à ultrasons est retirée du tube Falcon™, lavée avec 15 mL d'eau MilliQ que l'on ajoute dans le flacon de manière à récupérer la totalité de l'émulsion produite.

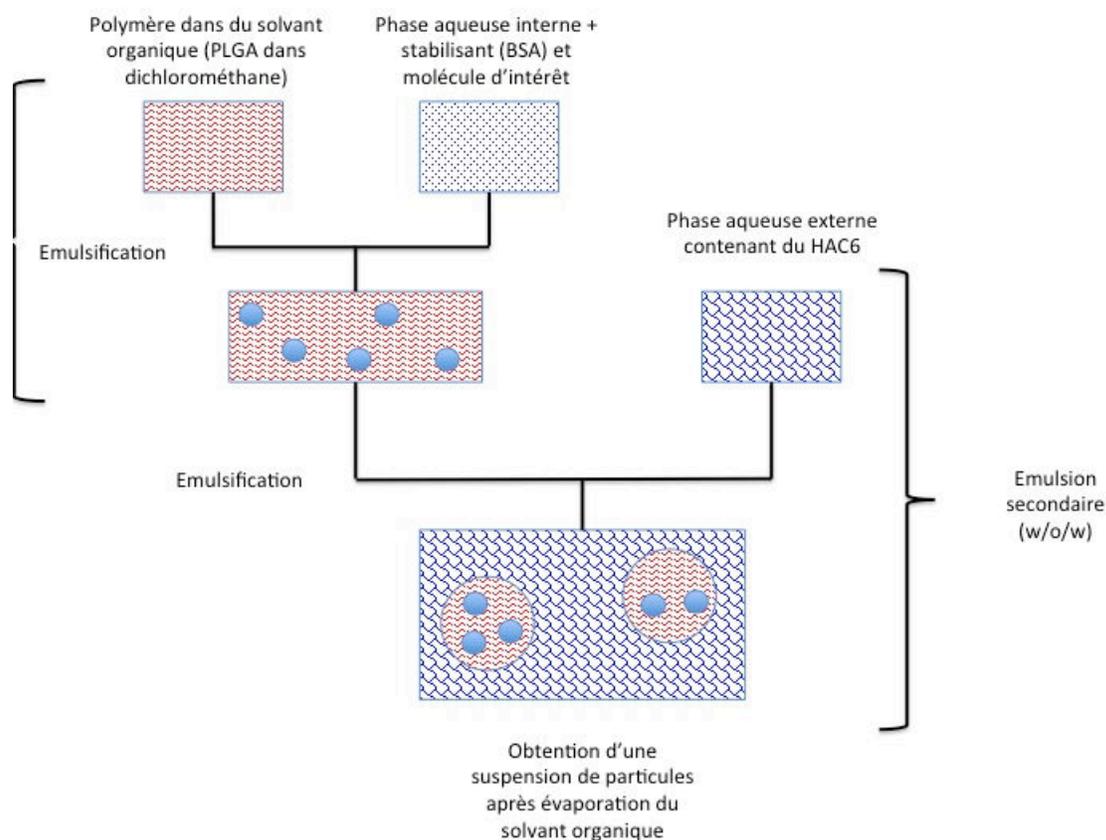


Figure V-4 : Schéma représentant les différentes étapes conduisant à l'obtention de nanoparticules préparées par double émulsion/évaporation de solvant organique.

E. Évaporation du solvant organique

Nous avons choisi pour cette étape d'évaporer le solvant à l'air libre par agitation au moyen d'un barreau aimanté. Le dichlorométhane est un solvant à bas point d'ébullition, aussi il est facile et rapide de l'évaporer. L'évaporation du solvant à l'aide d'un évaporateur rotatif sous pression réduite a été envisagée puis abandonnée car trop brutale : elle entraîne la précipitation du matériau cœur.

Par la suite un bain thermostaté à 35 °C a été utilisé pour favoriser l'évaporation du solvant organique tout en conservant une température inférieure :

- à la température du corps humain pour prévenir la dégradation de molécules thermosensibles
- à la température de transition vitreuse (Tg) du PLGA qui est supérieure à 40 °C.

On passe ainsi d'un temps de 4 heures d'évaporation à température ambiante à 2heures grâce au bain thermostaté.

F. Mesure de la taille des particules

1) Principe de la diffraction de la lumière

Lorsqu'un faisceau laser rencontre une particule, celle-ci va modifier le trajet optique de l'onde et réémettre ce faisceau dans différentes directions de l'espace (Figure V-5). Les angles de diffraction correspondants dépendent de la taille des objets. Plus les objets sont petits, plus l'angle de diffraction sera grand.

Ainsi lorsque l'on connaît les caractéristiques physiques des particules telles que l'indice de réfraction du matériau et l'absorption du milieu dispersant, on peut prévoir le modèle de diffraction à employer grâce aux travaux de Mie sur la diffraction de la lumière.

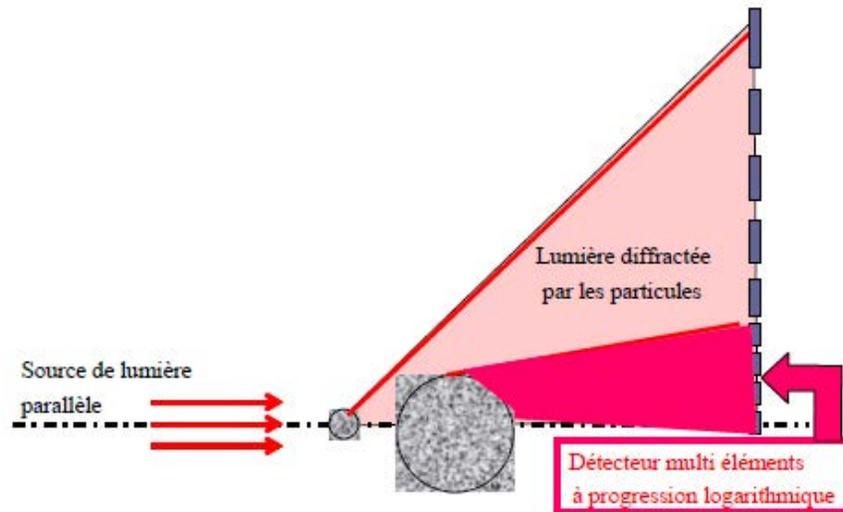


Figure V-5 : Principe de la diffraction de la lumière par des particules de différentes tailles (source Malvern Instruments).

2) Théorie de Mie²

Au début du XXème siècle, Gustav Mie développe une théorie, basée sur les équations d'électromagnétisme de Maxwell, qui permet de décrire les phénomènes de diffusion de la lumière qui apparaissent lorsque des particules sphériques (opaques ou transparentes) sont soumises à un laser.

Grâce à cette méthode, on peut corréler un modèle de diffraction de la lumière à un objet de taille spécifique. Lorsqu'une particule passe à travers un faisceau lumineux émis par un laser, elle va diffuser une partie de cette lumière selon un angle qui est directement dépendant de la taille de la particule. L'angle de diffusion augmente de manière logarithmique lorsque le diamètre de la particule diminue. L'intensité de la diffusion est aussi dépendante de la taille : elle diminue avec le volume de la particule.

La théorie de Mie est basée sur 4 principes :

- Les particules mesurées sont sphériques
- La suspension est suffisamment diluée afin d'éviter la diffusion multiple de la lumière
- Les propriétés optiques de la particule et du milieu environnant sont connues
- Les particules sont homogènes

Afin de prédire l'intensité de la lumière diffusée, la théorie de Mie se base sur la différence entre les indices de réfraction des particules et du milieu. Elle permet aussi de décrire comment l'absorption caractéristique de la lumière par des particules affecte la quantité de lumière qui est transmise à travers la particule et est soit absorbée, soit réfractée. Cette propriété est particulièrement importante pour les particules d'un diamètre inférieur à 50 μm .

3) Théorie de Fraunhofer

C'est une version simplifiée de la théorie de Mie. Elle a été beaucoup utilisée à partir de la fin des années 1970 lorsque les ordinateurs n'étaient pas assez puissants pour pouvoir appliquer rigoureusement la théorie de Mie.

La théorie de Fraunhofer diffère de la théorie de Mie par les hypothèses suivantes :

- Les particules sont considérées comme étant des disques opaques
- La lumière est diffusée seulement aux petits angles
- Chaque particule diffuse la lumière avec la même intensité quelle que soit sa taille
- La différence entre l'indice de réfraction de la particule et celui du milieu est infinie

Cette approche simplifiée donne de bons résultats si les particules d'un échantillon ont un diamètre supérieur ou égal à 50 μm . En dessous de 50 μm , les valeurs obtenues peuvent se révéler fantaisistes (principalement si les particules ont un diamètre inférieur à 2 μm ou si la différence entre les indices de réfraction est faible).

L'hypothèse que toutes les particules diffusent la lumière avec la même intensité conduit à surestimer le diamètre des particules de petite taille. En effet, le pouvoir de diffusion diminue rapidement en dessous de 0,5 μm donc la quantité de lumière diffusée par des particules de ce diamètre est faible.

Malgré ces imprécisions, le modèle de Fraunhofer reste utilisé de nos jours dans certains cas car il permet de mesurer des diamètres de particules (au-delà de 50 μm) sans connaître l'indice de réfraction du matériau.

4) Principe de la mesure par le Mastersizer

Un faisceau laser est émis et traverse une suspension de particules. Celles-ci vont diffuser la lumière selon un certain schéma qui est dépendant de leur taille. Les petites particules diffusent la lumière aux grands angles avec une intensité faible, tandis que les grosses diffusent aux petits angles avec une forte intensité. L'intensité de cette lumière diffusée est recueillie par une série de détecteurs, on obtient ainsi une image de diffraction qui est représentative de la distribution en taille des particules présentes dans l'échantillon analysé. La théorie de Mie est donc très utilisée pour la détermination de la taille de particules par diffraction de la lumière.

5) Protocole de mesure de la taille des particules par diffraction de la lumière

70 mL de NaCl 10^{-4} M qui sert de milieu dispersant sont introduits dans la cellule de mesure, l'agitation est fixée à 1490 rotations par minute (rpm). L'appareil mesure alors la diffraction obtenue pour le milieu dispersant et ajuste la ligne de base. Puis on ajoute la suspension de particules de manière à obtenir 5 % d'obscurcissement de la lumière (au-delà de 7 % la suspension devient trop concentrée et des phénomènes de diffraction multiple faussent la mesure en minimisant la taille des particules de l'échantillon). L'appareil est réglé pour réaliser trois mesures de chaque échantillon. Après traitement du signal reçu, on obtient un diffractogramme représentant la fraction du volume total d'une suspension en fonction du diamètre des particules ainsi que de multiples valeurs concernant les différentes populations de particules présentes dans l'échantillon.

6) Confirmation des diamètres de particules par microscopie électronique à balayage

Une suspension de particules est déposée sur une platine porte-échantillon recouverte d'un adhésif double face. Le solvant est évaporé à température ambiante pendant une nuit. La surface de l'échantillon sec est ensuite métallisée par un mélange de 60 % de palladium et de 40 % d'or pendant 5 minutes sous vide à 1,2 kV et 5 mA de courant imposé. On obtient ainsi une couche métallique de l'ordre de 7 nm d'épaisseur.

G. Optimisation des conditions de formulation des particules

Les particules obtenues, une fois le solvant organique évaporé, se trouvent en suspension dans la phase aqueuse en présence des molécules qui ne sont pas intervenues dans le procédé de formulation. Nous avons choisi de purifier les nanoparticules par centrifugation.

1) Centrifugations

L'objectif est de déterminer quelle vitesse de centrifugation permet de séparer efficacement les particules des molécules tout en préservant l'intégrité physique des particules. Nous avons donc fait varier la vitesse de centrifugation de 5 000 à 10 000 rpm et mesuré la taille des particules après chaque cycle. La présence de particules ou objets dans les surnageants à la fin du premier cycle a été vérifiée. Des essais de centrifugation effectués à des vitesses supérieures à 10 000 rpm ont montré que ces vitesses entraînent une agrégation irréversible des particules.

- Protocole

Ces tests ont été effectués grâce à une centrifugeuse de type JOUAN GR20-22 sur laquelle est adapté un rotor AG 100-18 d'une capacité de 6 tubes de 100 mL. Chaque suspension est placée dans un tube de polyéthylène haute densité (HDPE) et centrifugée pendant 20 minutes à 20 °C.

Une suspension de particules est préparée puis divisée en lots que l'on centrifuge à des vitesses différentes (5 000 à 10 000 rpm). Les suspensions subissent deux cycles de lavage et une mesure de la taille des particules à la fin de chaque cycle est effectuée. Les particules sèches sont alors resuspendues dans l'eau par agitation à l'aide d'un barreau magnétique pendant 5 minutes puis soniquées dans un bain à ultrasons pendant 20 minutes.

Un cycle de lavage se définit comme une étape de centrifugation, l'élimination du surnageant pour le remplacer par 20 mL d'eau MilliQ puis la resuspension des particules par agitation au vortex pendant 5 minutes.

Une fois les conditions de centrifugation optimales déterminées, nous avons transposé ces paramètres pour une utilisation avec un appareil de type Ultracentrifugeuse optima L-80 XP Beckman Coulter® qui permet de travailler avec des volumes plus importants de suspension. Le protocole est sensiblement le même que précédemment, le rotor utilisé est de type 45 Ti (Beckman Coulter, France). Afin d'atteindre la même accélération (12085 g), la vitesse de centrifugation a été fixée à 10 200 rpm.

2) Protocole de lyophilisation des particules

Après lavage par centrifugation, les suspensions de particules sont placées dans un tube Falcon® stérile puis celui-ci est plongé dans une solution d'azote liquide jusqu'à congélation complète. L'eau présente dans les tubes est lyophilisée pendant 24 heures et on obtient une poudre sèche de particules.

3) Lyoprotecteurs

L'utilisation de lyoprotecteurs a été envisagée pour faciliter la redispersion des particules sèches et limiter leur agrégation lors de la lyophilisation. Une suspension de particules est préparée puis divisée en plusieurs lots. Les lots sont purifiés par centrifugation (deux cycles de lavage) selon le protocole défini précédemment. Une fois le surnageant éliminé, les particules sont redispersées soit avec de l'eau, soit avec une solution aqueuse de lyoprotecteur (5 g/L). De la même façon, les particules lavées à l'eau sont soit lyophilisées dans l'eau, soit dans une solution aqueuse de lyoprotecteur (5 g/L). Voici la liste des différents lots obtenus après lyophilisation :

- 1) Un échantillon lavé à l'eau et lyophilisé dans de l'eau
- 2) Un échantillon lavé à l'eau et lyophilisé dans une solution de Tréhalose (5 g/L)
- 3) Un échantillon lavé à l'eau et lyophilisé dans une solution de Mannitol (5 g/L)
- 4) Un échantillon lavé et lyophilisé dans une solution de Tréhalose (5 g/L)
- 5) Un échantillon lavé et lyophilisé dans une solution de Mannitol (5 g/L)

III. Electrophorèse Capillaire

1) Historique de l'électrophorèse

Les travaux sur l'électrophorèse remontent au milieu du XIX^{ème} siècle et au phénomène appelé cataphorèse développé par Quincke. Il a montré que l'on peut déplacer des particules colloïdales sous l'action d'un champ électrique. Helmholtz mettra en évidence par son concept d'électro-osmose que les espèces chargées migrent vers l'électrode opposée à leur charge. Ces techniques ont pu être développées grâce aux connaissances acquises en matière d'électricité et d'électrostatique (Volta, Ampère, Coulomb).

Le chercheur suédois Arne K. W. Tiselius (prix Nobel de chimie 1948) est considéré comme le père de l'électrophorèse moderne. En 1937, il met au point la technique dite d'électrophorèse libre afin de

séparer les protéines du sérum sanguin par application d'un champ électrique. La séparation se déroule dans un tube en forme de U et de section carrée pour permettre la détection optique des composés à travers le tube en mesurant en continu l'indice de réfraction de la solution. Les techniques électrophorétiques sont nombreuses et peuvent être effectuée en 1 ou 2 dimensions. On peut citer l'exemple de l'électrophorèse 2D sur gel d'agarose pour la séparation de fragments d'ADN³. L'électrophorèse capillaire a ensuite été développée grâce à Jorgenson et Lukacs⁴.

2) Principe

C'est une méthode d'analyse et de séparation en solution qui se base sur la différence de « mobilité » des composés ionisés ou non lorsqu'on applique un champ électrique. La migration s'effectue dans un capillaire et on peut quantifier chaque composé lors de son passage à travers la fenêtre de détection. La figure V-6 représente le principe de fonctionnement d'une électrophorèse capillaire :

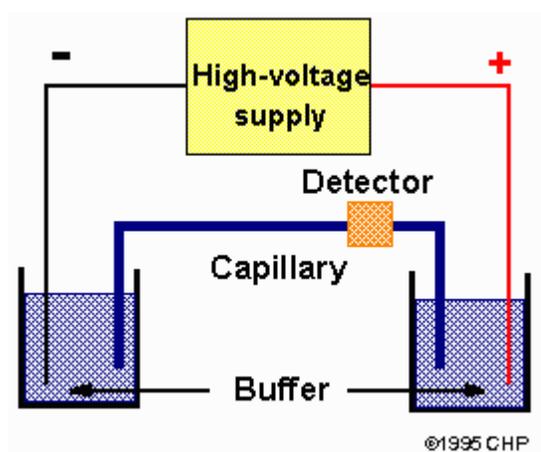


Figure V-6 : Schéma descriptif d'une électrophorèse capillaire.

L'électrophorèse capillaire est un appareil relativement simple composé :

- D'un capillaire dont le diamètre interne mesure entre 25 et 100 μm et dont la longueur varie selon les caractéristiques de mesure entre quelques dizaines de centimètres à près d'un mètre. La paroi interne du capillaire est le plus souvent constituée de silice fondue et présente à la surface des groupements silanol (-Si-OH) sensibles au pH.
- D'un tampon électrolyte qui assure la continuité du circuit électrique dans le capillaire. Il doit être stable et non dégradant envers les composés à séparer.

- D'une alimentation électrique qui permet de délivrer une tension comprise entre 0 et 30 kV ou un courant entre 0 et 200 μA . On va ainsi générer des champs électriques jusqu'à plusieurs centaines de volts par mètre. Le générateur est relié au capillaire par l'intermédiaire de deux électrodes de platine plongeant dans la solution tampon qui assure la continuité du circuit électrique.
- D'un système de contrôle de la température du capillaire. Du fait des tensions importantes appliquées, la dissipation de l'énergie produite par effet joule est nécessaire.
- D'un détecteur couplé à un système de traitement du signal.

L'électrophorèse capillaire permet de séparer rapidement des composés et de détecter de faibles quantités, c'est donc une technique de choix pour la biologie.

3) L'électro-osmose

Lorsque l'on applique un champ électrique à une solution, les espèces chargées vont migrer vers l'électrode de signe opposée à leur charge. Les espèces neutres ne sont pas affectées. Dans le cas de l'électrophorèse, on observe une migration de toutes les espèces dans le même sens en raison du flux électro-osmotique, la mobilité globale des espèces, notée μ_{app} , est donnée par la relation suivante :

$$\mu_{\text{app}} = \mu_{\text{ep}} + \mu_{\text{eo}}$$

avec :

- μ_{ep} : la mobilité propre de l'espèce due au flux électrophorétique et dépendant de la charge ainsi que de la taille de l'espèce considérée.
- μ_{eo} : le flux électroosmotique (mobilité du tampon).

Le flux électrophorétique μ_{ep} correspond à la vitesse à laquelle se déplace une espèce chargée lorsqu'elle se trouve dans un champ électrique (\vec{E}). Il est donné par la relation suivante :

$$\mu_{\text{ep}} = \frac{q}{6\pi\eta r}$$

avec η la viscosité de la solution, q et r respectivement la charge et le rayon de l'ion.

Le flux électroosmotique μ_{eo} correspond au déplacement d'une couche ionique liquide par rapport à une couche d'ions fixes (la paroi du capillaire) sous l'effet du champ électrique. Les groupements silanol présents sur la surface interne du capillaire sont plus ou moins hydrolysés selon le pH de l'électrolyte et ils vont attirer des contre-ions présents dans la solution tampon. Cette double couche ionique engendre une différence de potentiel entre la paroi et l'intérieur du capillaire appelée potentiel zêta (ζ). Lorsqu'un champ électrique est appliqué, les cations les moins retenus de cette double couche ionique vont migrer vers la cathode et emporter les molécules du tampon.

$$\mu_{eo} = \frac{\varepsilon \cdot \zeta}{4 \cdot \pi \cdot \eta}$$

avec ε la constante diélectrique, ζ le potentiel zêta et η la viscosité de la solution.

Le flux électroosmotique μ_{eo} est généralement supérieur aux flux électrophorétiques μ_{ep} , ce qui permet de détecter toutes les espèces présentes dans le mélange.

Lorsqu'une tension positive est appliquée, les constituants de l'échantillon vont migrer vers la cathode selon l'ordre suivant : cations, molécules neutres, anions.

4) Electrophorèse capillaire par association ionique

Le mode « association ionique » consiste à modifier la paroi interne du capillaire en ajoutant des contre-ions cationiques dans le tampon de travail. Dans le cadre de ces travaux de thèse, la dégradation du HA et de la CS conduit à des oligomères dont le rapport masse/charge est identique. Aussi leur détection n'est pas possible par ECZ. L'ajout de tétrabutylammonium phosphate (présent dans le PicA Reagent[®] et qui joue le rôle de contre-ion) dans le tampon employé permet, d'une part de réduire le flux électroosmotique par interaction ionique avec les groupements silanol et d'autre part de former des complexes avec les oligosaccharides et les ions borates du tampon. Ceci facilite la séparation et donc la détection des résidus de la dégradation enzymatique.

5) Protocoles utilisés pour le dosage des polysaccharides

a) Cas du HA

Avant chaque dosage, une courbe d'étalonnage est réalisée en utilisant le HAC6 utilisé pour recouvrir les particules. Une quantité connue de HAC6 est ainsi solubilisée dans un tampon acétate 20 mM pH 6 (typiquement 1 mg/mL). Puis, cette solution mère est ensuite diluée pour obtenir une gamme

d'étalonnage de 0 à 250 µg/mL. A 200 µL de chaque solution, on ajoute 30 µL d'enzyme reconstituée à 1000 unités par mL dans le tampon acétate et la dégradation a lieu pendant 72 heures à 37 °C.

b) Cas de la CS

Une droite d'étalonnage de 0 à 100 µg/mL est réalisée à partir d'une solution mère de CS dans une solution tampon de Tris HCl 50 mM pH 8 (Euromedex, France). 200 µL de chaque solution à différentes concentrations en CS sont ajoutés à 30 µL de chondroïtinase ABC. Les solutions sont agitées pendant 72 heures à 37 °C pour permettre la digestion de la chondroïtine sulfate.

c) HA en surface : protocole 1

10 mg de nanoparticules sont mises en suspension dans 1 mL de NaOH 0,1 M pendant 2 heures afin d'hydrolyser la liaison ester du HAC6 et libérer alors du HANA et des chaînes hexyle. Puis 1 mL d'acide acétique 0,1 M est ajouté et enfin 3 mL d'eau MilliQ de manière à obtenir une solution de tampon acétate à 20 mM et pH 6. 200 µL de cette suspension résultante sont mis en contact avec 30 µL de hyaluronidase issue de *Streptomyces Hyalurolyticus* (Sigma Aldrich, France) reconstituée à 1000 unités par mL dans le tampon acétate. La suspension est agitée pendant 72 heures à 37 °C pour permettre la digestion du HA puis filtrée sur des tubes à filtre Ultrafree[®]-MC de 10 000 NMLW (Nominal Molecular Weight Limit) (Millipore Corporation, USA) afin d'éliminer l'enzyme et de ne conserver que les hydrolysats du HA.

Ce protocole ne permet pas de dégrader la matrice de la particule et ne permet donc que de doser le HA qui était présent sous forme HAC6 en surface des particules.

d) Quantité totale de HA ou de CS : protocole 2

Afin de recueillir la totalité des molécules d'intérêt encapsulées, nous avons tout d'abord déstructuré les particules par dissolution de la matrice hydrophobe dans du tétrahydrofurane (THF). 10 mg de particules sont ainsi dissoutes dans 1 mL de THF pendant 1 heure. Une solution de NaOH 0,1 M est ajoutée et le mélange est mis en agitation pendant 2 heures. Enfin 1 mL de solution d'acide acétique 0,1 M et 3 mL d'eau MilliQ sont ajoutés à la solution. Le THF est finalement évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif sous pression réduite et la matrice de PLGA va précipiter. Les molécules d'intérêt encapsulées (HA ou CS) ainsi que le HA obtenu par saponification du HAC6 de surface sont libérées dans la phase aqueuse,

ce qui permet leur dosage. 200 μL de la solution résultante sont ensuite prélevés et mis en contact avec 30 μL de hyaluronidase ou de chondroïtinase ABC issue de *Proteus vulgaris* (Sigma Aldrich, France) pendant 72 heures à 37 °C puis la solution est filtrée sur des filtres Ultrafree[®]-MC 10 000 NMLW.

e) Dosage par ECZ

Une fois l'hydrolyse des différents échantillons terminée, environ 200 μL de chaque solution sont centrifugés à 10 000 rpm sur des filtres Ultrafree[®]-MC NML 10 000 pendant 1 heure à 4 °C. 170 μL du filtrat sont prélevés et on y ajoute 5 μL de MixB (Beckman Coulter, France) qui sert de référence interne. Le MixB est composé d'acide 4-hydroxybenzoïque (0,72 mM) et d'acide 4-hydroxyphénylacétique (0,66 mM).

Chaque solution est ensuite analysée par ECZ-AI (par Association Ionique) grâce à un appareil de type P/ACE[™] MDQ (Beckman Coulter, France), équipé d'un capillaire de type eCAP Neutral Capillary (Beckman Coulter, France) de 57 cm (détection à 50 cm). Le tampon de migration est composé 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, Allemagne)] additionné de 375 μL d'une solution de PIC[®] Reagent A (Waters Corporation, USA) préalablement diluée au 3/8^{ème} dans le tampon B/AB. La migration des espèces a lieu durant 30 minutes à 30 kV. La détection des espèces se fait à l'aide d'une barrette de diode et à une longueur d'onde fixée à 232 nm.

La présence de MixB dans chaque échantillon permet de normaliser et de comparer les résultats obtenus. Le temps de rétention sur les électrophérogrammes est propre à la molécule séparée alors que l'aire sous la courbe est proportionnelle à la quantité de molécule présente.

Pour doser facilement le HA ou la CS présents dans les particules, nous avons effectué des analyses de solutions étalons. Ceci nous a permis d'obtenir une droite de type $y = ax$.

Avec :

- y représentant le rapport entre la somme des aires sous la courbe des oligomères constitutifs du HA (ou de la CS) et les aires sous la courbe du MixB.
- a représentant le coefficient directeur de la droite d'étalonnage.

- x représentant la concentration en HA ou CS dans l'échantillon (concentration totale dans le cas du HANA encapsulé).

On peut de cette façon et en utilisant les deux protocoles décrits précédemment déterminer la quantité de HAC6 présente en surface des particules, ainsi que la quantité de HA ou de CS encapsulés.

Une fois l'intégration des aires sous la courbe obtenue (y), on peut retrouver la quantité (x) de HA ou de CS présente dans l'échantillon.

Cette quantité (x) présente dans les 170 µL de solution digérée et filtrée correspond à une quantité (x') de HA ou de CS dans le mélange surnageant (200 µL) + enzyme (30 µL) :

$$x' = \frac{230}{170} x$$

x' correspond à la quantité de HA ou de CS présente dans 200 µL de surnageant, soit cinq fois plus dans 1 mL de surnageant.

La quantité totale (x'') de HA ou de CS dans les particules est donc calculée par rapport à la concentration de départ en particules dans la suspension :

$$x'' = x' \frac{5}{[\text{particules}]}$$

On obtient ainsi la quantité de HA ou de CS présente en microgramme par milligramme de particule.

IV. Partie évaluation biologique des nanoparticules

Cette partie regroupe les protocoles relatifs aux expérimentations décrites au chapitre IV de ce manuscrit.

A. Etude *in vitro* du potentiel inflammatoire des particules

Afin de s'assurer de la non toxicité des différents constituants des particules, nous avons au préalable exposé des chondrocytes et des synoviocytes à chaque produit intervenant dans la formulation des particules à la concentration maximale utilisée lors de la formulation à savoir :

- 40 mg/ml de HAC6 (HABioC6-17%)
- 10 mg de BSA
- 2 mg de DEX-FITC

Le PLGA n'a pas pu être testé car il n'est pas dispersable en l'état dans l'eau, il précipite lorsqu'on évapore le solvant organique après formation de l'émulsion.

Seuls les lots issus du HANA fournis par Bioibérica ont été utilisés lors de l'étude biologique.

1) Resuspension des particules

Les particules lyophilisées sont resuspendues dans une solution saline (NaCl 0,15M) à une concentration de 1 mg/mL. Cette suspension est agitée au vortex pendant 1 minute puis soniquée pendant 20 minutes dans un bain à ultrasons. La suspension est ensuite stérilisée par ultra-violets au GelDoc™ (Bio-Rad, USA) pendant 10 minutes. La concentration finale en particules est obtenue par dilution de la suspension dans du milieu de culture DMEM (Gibco®, USA) contenant 10 % de sérum de veau fœtal (SVF, Thermo Scientific HyClone, USA) ainsi que 1 % de pénicilline et de streptomycine (Gibco®, USA) ; on parle alors de « milieu complet ».

2) 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) (Gibco®, USA). Il est ensuite soumis à une digestion par une solution de pronase (2 mg/ml) (Sigma Aldrich, USA) 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, Suisse) pendant une nuit à 37 °C sous 5 % de CO₂. La collagénase B permet la libération des chondrocytes par destruction de la matrice extra cellulaire. Elle est reconstituée dans du milieu de culture DMEM/F12 (Gibco®, USA) supplémenté à 1 % en pénicilline et en streptomycine (Gibco®, USA). Les solutions sont filtrées sur filtre de 0,22 µm de diamètre (Pall, USA) 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 (Gibco®, USA), 100 U/mL de pénicilline et 100 µg/mL streptomycine) contenant 10 % de SVF (sérum de veau fœtal) décomplémenté.

3) Culture cellulaire des 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 8 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.

4) 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, USA) 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 cellules en vue de leur utilisation.

5) Evaluation de la cytotoxicité des particules vis à vis des cellules

Ces tests s'effectuent sur des cellules cultivées en monocouche dans des plaques 96 puits à raison de 3 000 cellules par puits pour les synoviocytes et 4 000 cellules par puits pour les chondrocytes (100 µL de suspension de cellules par puits). Après 24 heures d'incubation, le milieu de culture de chaque puits est aspiré et 100 µL d'une suspension de particules à la concentration désirée est ajoutée. L'exposition a lieu pendant 24, 48 et 72 heures et les différents tests de toxicité sont effectués. Une observation des puits au microscope est opérée afin de visualiser une éventuelle internalisation des particules.

Les résultats sont présentés sous forme d'histogrammes et chaque échantillon est normalisé par rapport aux cellules témoins qui correspondent à la valeur maximale que l'on peut obtenir. Le milieu de culture de ces témoins est changé après 24 heures et remplacé par du milieu de culture complet contenant 10 % de NaCl 0,15 M.

Parallèlement, un comptage du nombre de cellules contenues dans deux puits pour chaque condition est effectué afin de normaliser les résultats obtenus.

a) Test MTT

Le test MTT est une méthode colorimétrique qui sert à doser l'activité mitochondriale et par conséquent la viabilité cellulaire. Il consiste en la réduction du sel de tétrazolium MTT (bromure de 3-[4, 5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényl-tétrazolium) par la succinate déshydrogénase mitochondriale qui conduit à la formation de cristaux de formazan de couleur violette (Figure V-7).

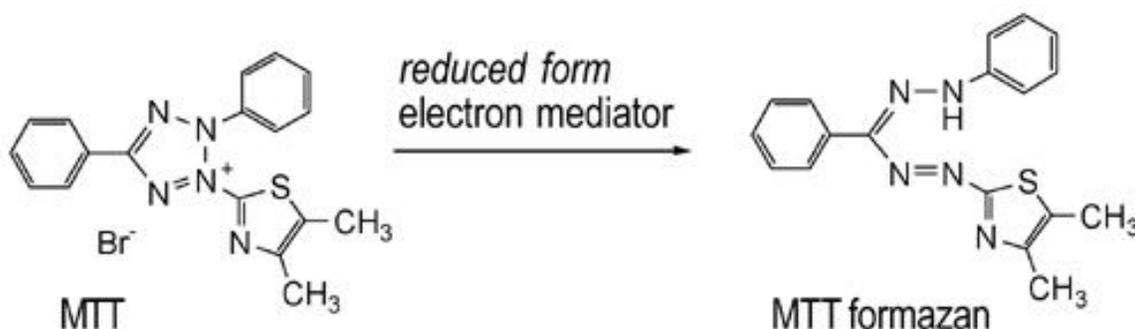


Figure V-7 : Schéma de la réaction de réduction du sel de tétrazolium MTT en formazan d'après : http://www.itsbio.co.kr/main/goods_view.php?category2=58&no=122.

- Protocole de dosage

Après avoir éliminé le surnageant de culture, un mélange contenant 100 µL de milieu complet et 25 µL de MTT (5 mg/mL dans du PBS) (Sigma Aldrich, USA) est mis en contact avec les chondrocytes pendant 4 heures à 37 °C sous 5 % de CO₂. Le surnageant est ensuite éliminé et les cellules sont lysées par un tampon SDS-DMF (80 g sodium dodécylsulfate, 200 mL diméthylformamide, 200 mL H₂O, pH 4.7) durant 24 heures à 37 °C pour solubiliser les cristaux de formazan. La densité optique (DO) de chaque puits est déterminée sur un spectrophotomètre Thermo Labsystems Multiskan EX à 580 nm.

b) Test LDH

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 (Figure V-8). L'augmentation de l'activité LDH est directement corrélée avec la production de formazan. Ainsi, la coloration rouge qui se forme est proportionnelle au nombre de cellules dont la membrane cytoplasmique est altérée.

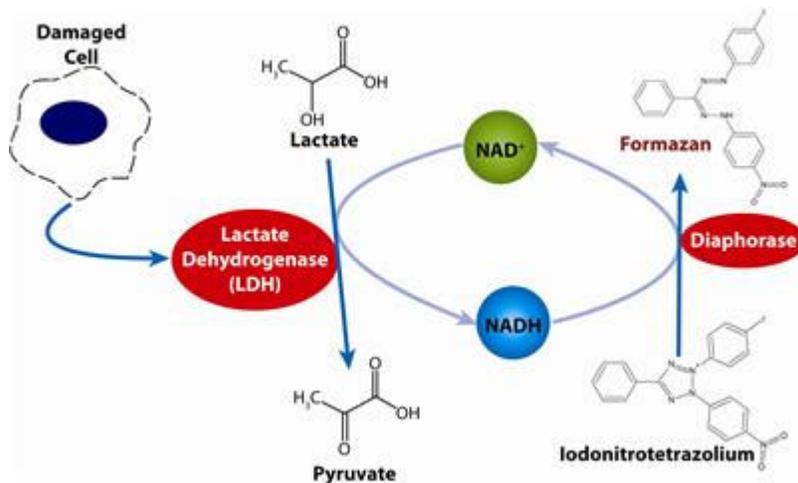


Figure V-8 : Schéma de la réaction de réduction du NAD en NADH,H⁺ après transformation par la LDH du lactate en pyruvate.

Le surnageant de culture (90 µL) est mélangé avec 90 µL d'une solution contenant du NAD⁺, du sel de tétrazolium et du lactate de sodium. L'ensemble est incubé 10 minutes à l'obscurité. La réaction est ensuite arrêtée par 45 µL d'HCl (0,1 N) et l'absorbance est lue à 490 nm spectrophotomètre Thermo Labsystems Multiskan EX.

Les témoins 0 % et 100 % sont obtenus respectivement par réaction du kit avec du milieu de culture seul et par lyse de toutes les cellules d'un puits pour chaque condition par une solution de Triton X-100 (Sigma Aldrich, USA) à 1 % (v/v) dans du milieu de culture puis dosage du surnageant.

c) Microscopie optique

Les lots de particules encapsulant les molécules fluorescentes (DEX-FITC et BSA-Cy3), ont également été observés en microscopie pour les localiser par rapport aux cellules:

- Les particules sont visualisées à l'aide des filtres adéquats en fonction de la molécule fluorescente encapsulée.

- Le noyau des particules peut être observé après un marquage au DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole).

- *Protocole de culture sur lamelles*

Chaque lamelle de verre est placée dans un puits d'une plaque 24 puits et désinfectée par ajout de 1 mL d'éthanol 70 % pendant 24 heures. Puis des cellules (synoviocytes ou chondrocytes) sontensemencées à raison de 20 000 cellules par lamelle pendant 24 heures afin de leur assurer une bonne adhésion. Le surnageant est finalement aspiré et remplacé par 1 mL d'une suspension de particules dans du milieu de culture.

- *Protocole de coloration des noyaux*

Le DAPI possède la caractéristique de se lier à l'ADN, c'est un agent intercalant. Après absorption de la lumière UV, il émet une fluorescence bleue et on peut de cette manière localiser précisément les noyaux des cellules.

Les lamelles sont lavées au PBS pour éliminer les débris (cellules non adhérentes et particules libres). A l'abri de la lumière, 2 µL de DAPI (5 mg/mL) sont dilués dans 10 mL de MeOH froid puis 400 µL de cette solution sont ajoutés dans chaque puits, les plaques sont placées dans un incubateur à 37 °C pendant 10 minutes. L'excès de DAPI est finalement éliminé par une solution de MeOH. Les lamelles sont ensuite égouttées puis montées sur des lames de verre (Superfrost[®], MENZEL-GLASER) avec une goutte de Vectashield[®] Mounting Media (Vector Laboratories, USA) et séchées pendant une nuit à l'abri de la lumière.

6) Biologie moléculaire

a) Extraction des ARN totaux de cellules cultivées en monocouches

Après décongélation des cellules, l'extraction des ARN totaux se fait grâce au kit RNeasy (QIAGEN, Courtaboeuf, France). Les cellules sont resuspendues dans 350 µL de tampon RLT, additionné de β-mercapto-éthanol (10 µL/mL) (Sigma). Cette étape a pour but de lyser les membranes cellulaires et de libérer ainsi leur contenu en acides nucléiques. De l'éthanol à 70 % (v/v) est ajouté avant de passer ce mélange sur la colonne d'extraction d'ARN, 3 lavages sont ensuite réalisés par les tampons RW1 (1 fois) et RPE (2 fois) fournis dans le kit. L'élution est réalisée avec 25 µL d'eau exempte de nucléases.

Afin d'éliminer d'éventuelles contaminations par de l'ADN génomique lors de l'extraction des ARN totaux, chaque échantillon est traité à la DNase I (1 U/ μ L, Invitrogen). Suivant la concentration en ARN obtenue par dosage spectrophotométrique, des échantillons contenant 1 μ g d'ARN sont préparés (qsq avec de l'eau), sachant que le volume total final est de 11 μ L au maximum. La DNase (1 μ L) mélangée à un tampon (v/v) est alors ajoutée (15 minutes à température ambiante). Cette réaction est arrêtée par addition d'EDTA qui va chélater les ions divalents et ainsi inhiber l'action de la DNase. Il faut cependant inactiver cette enzyme avant de réaliser la transcription inverse par une incubation des échantillons de 10 minutes à 65 °C.

b) Vérification de l'intégrité des ARN totaux extraits

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 : $[\text{ARN}] = A_{260} \times 1/D \times 40 \mu\text{g/ml}$, où D = facteur de dilution de l'échantillon.

Parallèlement, le rapport A_{260}/A_{280} (absorbance à 260 et 280 nm) est mesuré. Il doit être compris entre 1,8 et 2 pour que l'on puisse estimer que nos extraits d'ARN ne sont pas contaminés par des extraits protéiques.

c) Transcription inverse avec la reverse transcriptase 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 possède 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 comprise entre 500 ng et 1 μ g (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-adenylée 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 μ L de solution d'ARN et 9 μ L de tampon réactionnel. Ce tampon est composé de 4 μ L de tampon de RT, de 2 μ L de DTT, de 1 μ L de dNTP, 1 μ L d'oligodT et de 1 μ L de

transcriptase inverse. La réaction de transcription inverse se déroule pendant 1 heure à 37 °C. Les ARN restants sont dénaturés par la chaleur (5 minutes à 95°C).

d) 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 V-9). 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 d'un tampon contenant du MgCl₂ 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 ; la quantité d'ADN correspondant au gène, doublant à chaque cycle, augmente de façon exponentielle et devient majoritaire dans le mélange réactionnel.

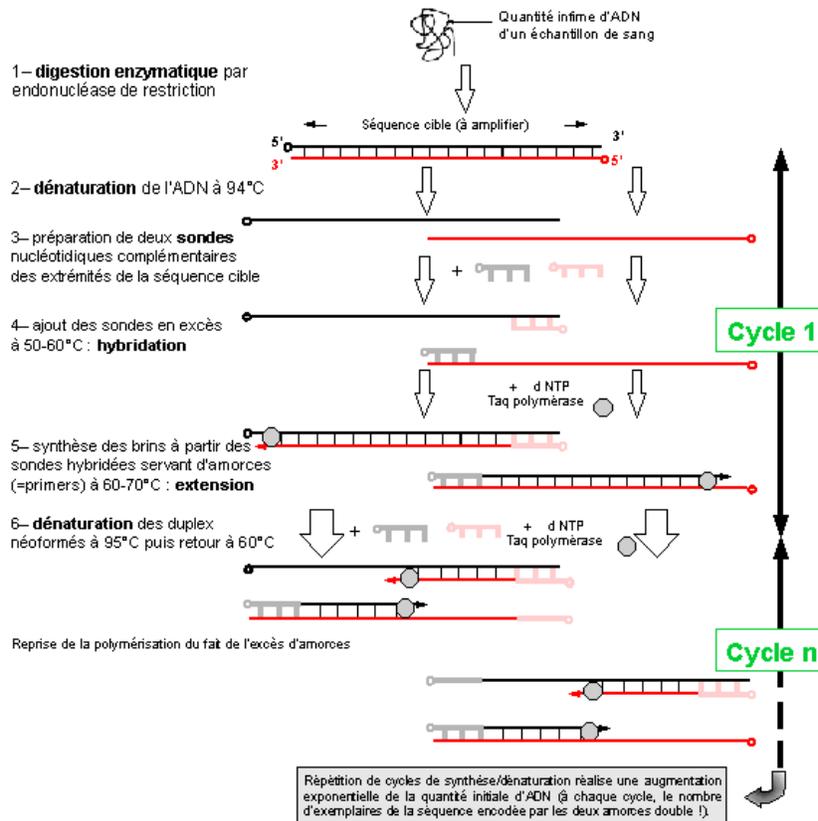


Figure V-9 : Principe de la technique de PCR. Les brins d'ADN complémentaires sont dénaturés à 95 °C puis les amorces spécifiques se fixent sur les brins et enfin la polymérase synthétise les brins complémentaires à l'aide des oligonucléotides présents dans le milieu réactionnel

(<http://www.inrp.fr/Acces/biotech/biomol/techgen/html/schempcr.htm>).

2. 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, précise et très reproductible. En outre, quelques nanogrammes d'ADNc suffisent pour l'analyse.

3. Principe de la technique de PCR quantitative

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.

a) Exploitation des données

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 V-10). Cette gamme est analysée en même temps que les échantillons et permet de quantifier le gène étudié.

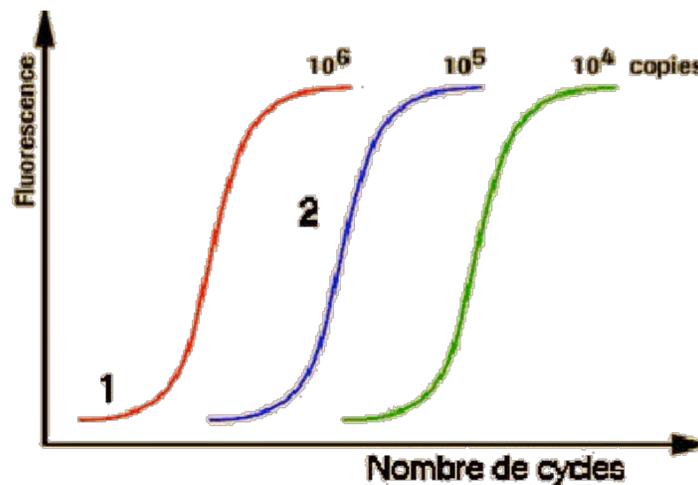


Figure V-10 : Quantification de l'expression d'un gène en fonction d'une gamme d'ADNc.

1. 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 4,5 µL d'extrait d'ADNc, 5 µL de Master Mix et 0,5 µL d'amorces. Les amorces sont choisies spécifiquement suivant le gène que l'on veut amplifier (Tableau V-1).

Gènes	Amorce Forward	Amorce Reverse	T en °C
RPLP0			61
Col II	GCCTCGCGGTGAGCCA TGATC	CTCCATCTCTGCCACG GGGT	60
Agrécane	ACACCCCTACCCTTGC TTCT	AAAGTGTCCAAGGCAT CCAC	59
Versican	GCAGCGACCAGCAGAT ACACT	TGACCGCCCCGATGTC	60
HAS-2	TCGGAACCACACTGTT TGGA	TGGATAAACTGGTAGC CAACAATATAA	60

Tableau V-1 : Caractéristiques des amorces des gènes étudiés en PCR en temps réel.

2. 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).

b) 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 RPLP0) 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/µl).

c) Traitement statistique des résultats

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.

B. Etude *in vivo* du devenir des particules

1) Préparation des animaux

Lors de notre étude, nous avons travaillé avec des rats Wistar mâles (Wistar Han, Charles River, Saint-Germain sur l'Arbresle, France) dont le poids varie entre 150 et 175 grammes. Les animaux sont conservés en cages contenant 5 individus chacune, dans une animalerie pendant 1 semaine avant le début des expériences pour leur permettre de s'acclimater. La température y est réglée ($23\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$) ainsi que l'alternance des cycles jour/nuit (cycles diurnes de 6 heures à 18 heures et nocturnes de 18 heures à 6 heures). Les animaux ont à tout moment accès à de la nourriture ainsi qu'à de l'eau. Avant chaque injection, les rats sont anesthésiés par inhalation d'isoflurane (AErrane™- Baxter S.A., Branquart, Belgique).

2) Injection d'une suspension de particules

Des injections intra-articulaires de 50 μL de suspension de particules à différentes concentrations (0,5 ; 1 et 2 mg/mL) dans une solution de NaCl 0,15 M ont été réalisées. Pour chaque individu, une première injection est réalisée dans chaque genou, en dessous de la rotule puis, après une semaine, une deuxième injection est effectuée dans le genou gauche selon les mêmes conditions. Le groupe de rats témoins servant de contrôle négatif a reçu une et deux injections de 50 μL de NaCl 0,15 M dans le genou droit et gauche, respectivement. Les animaux sont sacrifiés une semaine après la deuxième injection.

3) Sacrifice et dissection

Les animaux sont anesthésiés 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) préalablement à leur sacrifice par dislocation cervicale.

On récupère sur chaque animal les rotules ainsi qu'un échantillon de chaque membrane synoviale.

4) Histologie et microscopie

Chaque tissu est fixé immédiatement après prélèvement dans une solution de paraformaldéhyde 4 % (v/v) (Sigma, Saint-Quentin Fallavier) dans du PBS (pH = 7,4) pendant 24 heures, décalcifié (Rapide Décalcifiant Osseux, Eurobio) pendant 6 heures à température ambiante et enfin fixé dans du paraformaldéhyde 4 % avant d'être incorporé dans de la paraffine. Les tissus sont ensuite coupés à l'aide d'un microtome (LEICA RM 2135) pour obtenir des échantillons de 5 µm d'épaisseur.

- Les différentes colorations utilisées

Nous avons choisi trois colorations pour évaluer qualitativement l'état de l'articulation après les différentes injections de particule : HES (hématoxyline/éosine/safran), Bleu de Toluidine et rouge Sirius. Les échantillons sont déparaffinés dans le Tissue Clear (MEDITE), réhydratés dans des bains d'alcool puis colorés.

a) Hématoxyline-Eosine-Safran (HES)

L'HES est une coloration trichromatique standard permettant de visualiser les différents constituants des tissus. L'Hématoxyline chargée négativement forme un complexe positif avec un sel métallique qui va se lier à la chromatine nucléaire⁵, on peut donc visualiser les noyaux des cellules (bleu foncé) et les glycosaminoglycanes (violet foncé). L'Eosine sert de contre coloration à l'hématoxyline et permet de colorer les fibres tissulaires, nerveuses et les cytoplasmes en différentes teintes du rose au rouge. Enfin le Safran confère une coloration jaune aux collagènes et à certaines protéines. Les lames sont plongées dans des bains d'Hématoxyline 0,5 %, d'Eosine 1 % et de Safran 1 % pendant 5 minutes à chaque fois. Après déshydratation, elles sont montées avec une résine synthétique (VOGEL, Bayer diagnostic, France).

b) Rouge Sirius

La coloration au rouge Sirius permet de visualiser l'organisation du réseau collagénique par réaction entre les groupements sulfonique du colorant et les fonctions basiques des collagènes⁶. Les lames sont plongées dans une solution saturée en acide picrique à 0,1 %⁷ puis rincées dans un bain d'acide chlorhydrique 0.01 N pendant 2 minutes, dans une solution d'alcool à 95 ° et enfin dans de l'alcool absolu pendant 2 minutes. Elles sont ensuite déshydratées et montées avec la résine synthétique VOGEL (Bayer diagnostic, France).

La visualisation des tissus s'effectue en deux temps, premièrement en lumière classique puis en lumière polarisée à 45 ° grâce à deux filtres spécifiques afin d'observer l'architecture du réseau collagénique.

c) Bleu de toluidine

Le bleu de toluidine ou chlorhydrate de triméthylthionine est un colorant basique progressif⁸. Il est métachromatique et colore les glycosaminoglycanes en bleu. Les lames sont plongées dans une solution de bleu de toluidine à 1 % pendant 5 minutes puis rincées à l'acétone et l'éthanol absolu pour être déshydratées. Le montage des lames est réalisé avec la résine synthétique VOGEL (Bayer diagnostic, France).

Références Bibliographiques

1. Brochette, P. Emulsification - Elaboration et etude des emulsions. (1999).
2. Malvern Mie theory. The first 100 years. (2010).
3. <http://fangman-brewer.genetics.washington.edu/2Dgel.html>.
4. <http://www.idtdna.com/pages/docs/technical-reports/capillary-electrophoresis-of-oligonucleotides.pdf?sfvrsn=4>.
5. Ducup de Saint Paul, C. Anatomie et histologie de l'oeil du chien. Constitution d'un document pour l'enseignement sur support multimedia. (2006).
6. Constantine, V. S. & Mowry, R. W. Selective Staining of Human Dermal Collagen. II The Use of Picrosirius Red F3BA with Polarization Microscopy. (1968).at
<<http://www.nature.com/jid/journal/v50/n5/abs/jid196868a.html>>
7. Junqueira, L. C., Bignolas, G. & Brentani, R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem. J.* **11**, 447–455 (1979).
8. http://lhec.teso.net/enseignements/p1/polyp1/mineralise/index_mineralise.html.

Conclusion générale

Les travaux présentés dans ce manuscrit concernaient l'élaboration de nanoparticules polymère dont l'objectif est de favoriser la biodisponibilité, au niveau de l'articulation, des principes actifs qu'elles renferment. Cette biodisponibilité est augmentée grâce au recouvrement des particules par des dérivés de HA amphiphiles, ce qui permet une reconnaissance spécifique par les récepteurs CD44 et donc facilite l'internalisation des particules dans les chondrocytes.

Nous avons pu démontrer que malgré la difficulté de travailler avec l'acide hyaluronique, il est possible de le modifier pour lui conférer des propriétés tensio-actives, certes faibles, mais suffisantes pour l'utiliser comme stabilisant lors de la formulation de nanoparticules par double émulsion/évaporation de solvant.

La formulation par double émulsion/évaporation de solvant conduit à l'obtention de particules dont le diamètre est inférieur à 2 micromètres (dans le cas de particules « vides »). Les particules obtenues ont pu être purifiées et lyophilisées ; ces conditions de stockage facilitent leur utilisation lors de tests biologiques, elles sont de plus facilement redispersables.

Nous avons déterminé expérimentalement la quantité de HAC6 adsorbée à la surface des particules à environ 13,5 µg par mg de particule. Cette valeur peut sembler faible, mais la rigidité du polysaccharide explique ce problème. De plus, les évaluations biologiques ont pu démontrer que cette quantité de HA modifié en surface est suffisante pour induire une reconnaissance par les récepteurs CD44 des cellules.

Au niveau biologique, les évaluations *in vitro* ont démontré que les particules n'induisent pas de toxicité jusqu'à une concentration en particules de 100 µg/mL. On observe au niveau des chondrocytes une baisse de leur activité mitochondriale qui semble être la conséquence de l'internalisation des particules.

Des traceurs fluorescents (DEX-FITC et BSA-Cy3) ont été encapsulés afin de prouver cette internalisation par microscopie. La visualisation de la quantité de particules internalisée a de plus permis de démontrer l'intérêt du recouvrement en HAC6 par comparaison avec un recouvrement en PVA ; l'intensité de fluorescence due aux traceurs est plus importante et mieux répartie au niveau des cellules dans le cas du recouvrement en HAC6.

S'il est possible d'encapsuler des molécules hydrophiles, le HA et la CS ont posé des problèmes car la taille des particules obtenues n'est pas compatible avec une application au niveau biologique.

Enfin, une première évaluation du devenir des particules *in vivo* a permis de montrer qu'elles n'induisent pas d'inflammation dans des genoux de rats sains, toutefois nous n'avons pas pu observer d'internalisation dans des chondrocytes sains.

Ce projet de recherche se poursuit au laboratoire, avec l'étude du devenir *in vivo* des particules contenant de la BSA-Cy3 dans des articulations de rats saines ou pathologiques. L'objectif est de pouvoir cibler préférentiellement des zones de cartilage lésé pour ne vectoriser des principes actifs qu'au niveau des chondrocytes dont l'environnement est dégradé.

Si l'encapsulation de HA et de CS doit être améliorée, d'autres molécules sont à l'étude telles que des oligonucléotides. Ceux ci devraient, s'ils sont libérés de manière intracellulaire, favoriser la réponse chondrocytaire et donc stimuler la production de matrice extracellulaire ou inhiber la synthèse de cytokines pro-inflammatoires.

L'originalité de ces travaux est de concevoir des vecteurs modulables et pouvant encapsuler une ou plusieurs molécules d'intérêt (molécules hydrophiles et/ou hydrophobes). Si notre étude s'est limitée à l'évaluation du devenir et de la compatibilité de particules recouvertes de HAC6 au niveau de l'articulation, il est tout à fait envisageable d'utiliser ces particules dans d'autres domaines d'application. Nous avons montré dans le second chapitre de ce manuscrit que le récepteur CD44 est présent à la surface de nombreux types cellulaires, particulièrement au niveau de cellules cancéreuses. L'encapsulation de molécules anticancéreuses telle que la doxorubicine peut ainsi être envisagée ; les particules vont préserver le principe actif et le recouvrement en HAC6 va favoriser l'internalisation par les cellules.

Nos travaux ont contribué à l'élaboration d'une "boîte à outils thérapeutiques", dont le contenu peut être modifié et enrichi au gré de l'avancée des recherches, afin de proposer une réponse adaptée aux différentes pathologies à traiter.

Liste des Figures et Tableaux

Chapitre I

Figure I-1: Représentation de l'état de l'endothélium cellulaire au voisinage des tissus sains (A) ou des tumeurs (B)⁹.

Figure I-2: Schéma représentant l'adsorption de molécules tensio-actives (en rouge) à la surface de particules (en bleu)¹⁰. La conformation « end-on » est obtenue lorsque le tensio-actif ne possède qu'un seul point d'ancrage tandis que pour la conformation « side-on », la molécule possède plusieurs sites de fixation.

Figure I-3: Diagramme représentant l'évolution de la concentration en principes actifs dans la circulation sanguine après injection selon qu'ils soient encapsulés dans des particules (en vert) ou non (en rouge).

Figure I-4: Représentation d'un liposome d'après <http://www.lyposphericnutrients.fr/ResearchAndDevelopment.aspx>.

Figure I-5: Unité de répétition du PACA.

Figure I-6: Représentation des unités de répétition des principaux poly(α -hydroxy esters).

Figure I-7: Unités de répétition constitutives du a) poly(hydroxybutyrate) : PH3B, du b) poly(hydroxyvalérate) : PHV et du c) poly(hydroxybutyrate-*co*-valérate) : PHBV.

Figure I-8: Représentation de l'unité de répétition d'un PbAE.

Figure I-9: Unité de répétition de la poly(lysine) (a), de la poly(histidine) (b) et du poly(glutamate) (c).

Figure I-10: Schéma de la synthèse des PEGs par ouverture de cycle de l'oxyde d'éthylène.

Figure I-11: Unité de répétition du PVA (a) et de la PVP (b).

Figure I-12: Structure chimique des principaux polysaccharides employés pour la vectorisation.

Figure I-13: Structure moléculaire des α -, β - et γ - cyclodextrines d'après [Stanisław Skowron](#).

Figure I-14: Principe du complexe d'inclusion entre une cyclodextrine et une molécule hydrophobe (d'après <http://www.pharmainfo.net/pharma-student-magazine/cyclodextrins-pharmaceuticals-overview-0>).

Figure I-15: Schéma des deux modes de synthèse des dendrimères d'après <http://fr.wikipedia.org/wiki/Dendrimère>.

Figure I-16: Représentation schématique de la couleur d'émission des quantum dots en fonction de leur diamètre (d'après <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/brands/Molecular-Probes/Key-Molecular-Probes-Products/Qdot/Technology-Overview.html?icid=fr-qdot-1>).

Tableau I-1: Exemples d'utilisation des nanoparticules polymériques pour la vectorisation de principes actifs.

Tableau I-2: Exemples de molécules encapsulées au sein de SLN.

Tableau I-3: Exemples de molécules encapsulées grâce à des cyclodextrines et leurs applications.

Tableau I-4: Classification des particules d'oxydes de fer en fonction de leur taille.

Tableau I-5: principales applications des nanoparticules d'or en vue d'une utilisation biomédicale (type de synthèse, greffage, cible).

Chapitre II

Figure II-1: Schéma d'un motif disaccharidique de l'acide hyaluronique (l'acide D glucuronique est à gauche et la N acétyl glucosamine à droite).

Figure II-2: Représentation des liaisons hydrogène qui peuvent s'établir à partir d'un tétrasaccharide de HA : a) dans un solvant aprotique et b) dans l'eau¹¹.

Figure II-3: Modèle atomique représentant la structure du HA, on peut voir les 8 carbones qui forment un domaine hydrophobe (boules blanches marquées d'une croix bleue)¹¹.

Figure II-4: Schéma de la synthèse du HA par la bactérie *streptococcus thermophilus* YIT 2084. Le lactose internalisé par la cellule est converti en glucose et en galactose qui peuvent ensuite intervenir dans la synthèse du HA²⁹.

Figure II-5: Schéma du CD44 avec les différents domaines : domaine distal, domaine proximal, transmembranaire et cytoplasmique de haut en bas⁴¹.

Figure II-6: Schéma de la protéine RHAMM-P1 (une des isoformes de RHAMM). Les domaines hélicoïdaux sont représentés en rouge⁴⁹.

Figure II-7: Représentation schématique de LYVE-1 et CD44⁵⁶.

Figure II-8: Schéma d'un motif disaccharidique du HA. Les groupements susceptibles de réagir sont colorés : en bleu les groupements hydroxyles, en vert le groupement acétamide et en rouge le groupement carboxylique.

Figure II-9: Schéma représentant les différentes modifications possibles. Les chaînes de HA sont représentées en noir et les molécules greffées en rouge.

Figure II-10: Schéma réactionnel de la synthèse de HAC6 (seules les fonctions carboxyliques du HA sont montrées car elles sont les seules à réagir lors de cette synthèse).

Figure II-21: Spectre RMN ^1H d'un hyaluronate modifié par des chaînes alkyle (C6) (HABioC6-17% concentration de 20 mg.mL^{-1} dans D_2O), avec (a) (b) et (c) les signaux des protons de l'éthanol, (d) celui des protons du méthyl du groupement acétamide et (e) les signaux des protons du phtalate de potassium. Le massif entre 3 et 5 ppm correspond aux signaux des protons du squelette de HA.

Figure II-12: Schéma représentant l'évolution de la tension interfaciale d'un système composé de 2 phases non miscibles en fonction de la concentration en tensio-actif. La zone 1 correspond à des concentrations faibles en tensio-actif, les molécules sont dispersées à l'interface. Dans la zone 2, les tensio-actifs sont de plus en plus nombreux à l'interface et on arrive à la CMC en fin de zone 2 c'est-à-dire que les tensio-actifs saturent l'interface. Enfin la zone 3, au-delà de la CMC, la tension interfaciale ne diminue plus malgré l'ajout de tensio-actifs.

Figure II-13: Principe de mesure de la tension interfaciale au moyen d'un tensiomètre utilisant la méthode de l'anneau de Noüy⁷⁸.

Figure II-14: Evolution de la tension superficielle (g) en fonction de la concentration en HAC6 ou HANA dans l'eau à 25 °C.

Figure II-15: Evolution de la tension interfaciale (g) du système (eau + polymère)/dichlorométhane en fonction de la concentration en HAC6 ou HANA dans l'eau à 25°C.

Tableau II-1: Quantités de HA dosées dans différents tissus humains et de mammifères^{4,5}.

Tableau II-2: Taux d'acidification du HA selon les différentes synthèses.

Tableau II-3: Evolution des masses molaires moyennes du HA avant et après avoir subi le protocole de synthèse (Figure II-10).

Tableau II-4: Comparatif entre le taux de substitution visé 40 % et le taux de substitution réel obtenu pour chaque synthèse réalisée. Le taux de substitution en C6 correspond au nombre de chaînes C6 pour 100 unités disaccharidiques.

Chapitre III

Figure III-1: Structure moléculaire d'une unité de répétition du HA et de la CS.

Figure III-2: Schéma représentatif du mode de fonctionnement du Mastersizer¹³.

Figure III-3: Diffractogramme obtenu dans le cas d'un lot de particules formulées par double émulsion avec du HABioC6-31% utilisé comme stabilisant de la phase aqueuse externe.

Figure III-4: Evolution de la taille des nanoparticules recouvertes de HABioC6-17% obtenues par double émulsion/évaporation de solvant en fonction de la concentration en BSA dans la phase aqueuse interne : 25 g/L (en rouge) et 50 g/L (en vert).

Figure III-5: Observation en microscopie électronique à balayage de nanoparticules de PLGA recouvertes de HABioC6-24% à différentes concentrations, préparées par double émulsion (BSA à 25 g/L dans la phase aqueuse interne). Les concentrations en HABioC6-24% sont de 0,5 ; 1 ; 2,5 et 5 g/L pour les clichés A, B, C et D, respectivement.

Figure III-6: Représentation graphique de l'évolution de la taille en nanomètre des particules, mesurée dans les surnageants en fonction de la vitesse de centrifugation en rpm. Le HABioC6-31% a été utilisé à 5 g/L comme stabilisant de la phase externe.

Figure III-7: Structure moléculaire du a) mannitol et du b) tréhalose.

Figure III-8: Structures moléculaires de la Fluorescéine (a), de la Fluorescéine Isothiocyanate (b) et du DEX-FITC (c)¹⁸.

Figure III-9: Droites d'étalonnage de l'intensité de fluorescence émise par le DEX-FITC (en coups par seconde) par rapport à la concentration ($\mu\text{g/mL}$). La solution de DEX-FITC dans l'eau est représentée en bleu, le mélange DEX-FITC + BSA (à 25 g/L) est en rose et la solution de DEX-FITC ayant subi le protocole de double émulsion est en vert.

Figure III-10: Structure moléculaire de la cyanine 3. Les groupements R peuvent être des chaînes aliphatiques si la cyanine 3 est utilisée seule ou des groupements réactifs (N-hydroxysuccinimide ou maleimide) permettant de coupler la cyanine 3 à une autre molécule.

Figure III-11: Cliché obtenu après internalisation de particules recouvertes de HAC6 et contenant de la BSA-Cy3 (5%). Les cellules sont des chondrocytes de rat (P2) et ont été mises en contact avec les particules pendant 72 heures. Les particules apparaissent en rouge et les noyaux des cellules sont marqués au DAPI (bleu).

Figure III-12: Dégradation enzymatique de l'acide hyaluronique (HA) par la hyaluronate 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.

Figure III-13: Electrophérogramme d'un point de gamme 250 $\mu\text{g/mL}$ du HANa après digestion et ajout de MixB dans la solution.

Figure III-14: Diffractogramme obtenu après analyse de la taille des particules de HABioC6-24% « vides » (vert) ou encapsulant du HANa Bioiberica à raison de 5 g/L dans la phase aqueuse interne (rouge).

Figure III-15: Diffractogrammes obtenus après analyse de la taille des particules de HABioC6-24% « vides » (rouge) ou encapsulant de la chondroïtine sulfate à 5 g/L (noir), 10 g/L (bleu) et 25 g/L (vert) dans la phase aqueuse interne.

Figure III-16: Electrophérogramme du point de gamme 50 (50 µg/mL) de la CS après dégradation enzymatique.

Tableau III-1: Evolution des tailles des particules préparées par simple émulsion o/w puis évaporation du solvant en fonction de la concentration en HAC6 dans la phase aqueuse externe.

Tableau III-2: Evolution des diamètres des particules préparées par double émulsion (après évaporation du solvant organique) en fonction de la concentration en HAC6 dans la phase aqueuse externe.

Tableau III-3: Evolution des tailles de particules présentes dans les surnageants en fonction de la vitesse de centrifugation. Le HABioC6-31% a été utilisé à 5 g/L comme stabilisant de la phase externe.

Tableau III-4: Evolution des tailles des particules contenues dans le culot de centrifugation en fonction de la vitesse de centrifugation. Les particules sont redispersées pendant 5 minutes au vortex après chaque centrifugation. Le HABioC6-31% a été utilisé à 5 g/L comme stabilisant de la phase externe.

Tableau III-5: Evolution des tailles des particules obtenues en fonction de la vitesse de centrifugation après lyophilisation, redispersion et sonication 20 minutes au bain à ultrasons. Le HABioC6-31% a été utilisé à 5 g/L comme stabilisant de la phase externe.

Tableau III-6: Récapitulatif des tailles de particules en fonction des conditions de lavages et de lyophilisation (à l'eau ou dans une solution contenant des cryoprotecteurs). Les particules sont stabilisées par du HABioC6-31% à 5 g/L, après lyophilisation, elles sont redispersées dans l'eau puis soniquées pendant 20 minutes dans un bain à ultrasons.

Tableau III-7: Récapitulatif des tailles de particules obtenues pour l'encapsulation de DEX-FITC dans des particules de PLGA recouvertes de HAC6 (HABioC6-17% et HABioC6-31% à 5 g/L).

Tableau III-8: Tailles de particules obtenues après ajout de différentes quantités de BSA-Cy3 dans la phase aqueuse interne. Utilisation de HABioC6-24% (5 g/L) dans la phase aqueuse externe.

Chapitre IV

Figure IV-1: Schéma d'une diarthrose (<http://www.info-arthrite.fr/articulations.php>).

Figure IV-2: Voie de différenciation des cellules mésenchymateuses en chondrocytes (<http://genesdev.cshlp.org/content/16/21/2813.full.pdf+html>).

Figure IV-3: Cliché d'un chondrocyte observé en microscopie électronique à balayage, les lettres M et N représentent respectivement les mitochondries et le noyau de la cellule (<http://www.answers.com/topic/mitochondrion>).

Figure IV-4: Les différentes étapes de la formation de fibres de collagène à partir de pro-collagènes (http://www-3.unipv.it/webbio/anatcomp/freitas/2009-2010/biocell_LSBUSB09-10.htm).

Figure IV-5: Structure d'une fibre de collagène (<http://course1.winona.edu/sberg/ILLUST/fig11-2.gif>).

Figure IV-6: Association entre collagènes de type II, IX et XI au sein de la MEC (<http://www.cellprep.com.ar/tecnologia/cultivo/protocolo2/implante.htm>).

Figure IV-7: Motif de répétition des GAGs (http://www.ulyse.u-bordeaux.fr/atelier/ikramer/biocell_diffusion/gbb.cel.fa.103.b3/content/access.htm).

Figure IV-8: Représentation d'une molécule d'agrécan (<http://stevetakeshisfirststep.wordpress.com/tag/rheumatology/>).

Figure IV-9: Schéma d'un genou atteint par l'arthrose ([http://knol.google.com/k/l-arthrose-et-ses-traitements#L\(27\)arthrose](http://knol.google.com/k/l-arthrose-et-ses-traitements#L(27)arthrose)).

Figure IV-10: Représentation des différents degrés d'avancement de l'arthrose^{29,30}.

Figure IV-11: Réparation d'une articulation arthrosique par la méthode des microfractures (<http://www.cartilage.fr/reparer-microfractures.php>).

Figure IV-12: Illustration de la technique de mosaïcoplastie (http://docteurrouxel.fr/chirurgie_cartilage.html).

Figure IV-13: Implantation de chondrocytes autologues (<http://oahawaii.com/wp-content/uploads/2011/06/carticel.jpg>).

Figure IV-14: Schéma d'une articulation du genou après arthroplastie totale (http://hmrortho.ca/index.php?option=com_content&view=article&id=24&Itemid=48&showall=1).

Figure IV-15: Evolution de l'activité MTT des chondrocytes de rats (P2) à 24, 48 et 72h en fonction de leur exposition à différents lots de particules (100 µg/mL). Les témoins sont des cellules ayant évolué dans un milieu sans particules. Pour les autres lots, des particules recouvertes de HABioC6-31% « vides » (Ø) ou encapsulant du

DEX-FITC, ainsi que des particules recouvertes de PVA « vides » (Ø) ou encapsulant du DEX-FITC ont été mises en contact avec les cellules.

Figure IV-16: Evolution de la viabilité cellulaire des chondrocytes (P2) à 24, 48 et 72h par dosage de la LDH libérée dans le milieu de culture en fonction de leur exposition à différents lots de particules (100 µg/mL). Les témoins sont des cellules ayant évolué dans un milieu sans particules. Pour les autres lots, des particules recouvertes de HABioC6-31% « vides » (Ø) ou encapsulant du DEX-FITC, ainsi que des particules recouvertes de PVA « vides » (Ø) ou encapsulant du DEX-FITC ont été mises en contact avec les cellules.

Figure IV-17: Visualisation en microscopie à fluorescence de la localisation des nanoparticules recouvertes de HAC6 (a) et de PVA (b) par rapport aux noyaux des cellules. Les chondrocytes ont été utilisés en P2 et le temps de contact avec les nanoparticules est de 72 heures. Le noyau des cellules est marqué au DAPI (bleu) et les particules renferment du DEX-FITC (vert).

Figure IV-18: Visualisation en microscopie à fluorescence de la localisation de particules recouvertes de HAC6 par rapport aux cellules. Les cellules sont des chondrocytes humains (P2) dont le noyau est marqué au DAPI (bleu). Les particules encapsulent de la BSA-Cy3 (rouge) et sont mises en contact pendant 96 heures à 100 µg/mL.

Figure IV-19: Taux d'expression en ARNm de Col2 chez des chondrocytes de rat (P2) cultivés en monocouche et mis en contact pendant 24, 48 ou 72 heures avec différents types de particules. Les taux d'expression sont normalisés par le gène RPLP0.

Figure IV-20: Taux d'expression en ARNm de Agrecan chez des chondrocytes de rat (P2) cultivés en monocouche et mis en contact pendant 24, 48 ou 72 heures avec différents types de particules. Les taux d'expression sont normalisés par le gène RPLP0.

Figure IV-21: Taux d'expression en ARNm de COMP chez des chondrocytes de rat (P2) cultivés en monocouche et mis en contact pendant 24, 48 ou 72 heures avec différents types de particules. Les taux d'expression sont normalisés par le gène RPLP0.

Figure IV-22: Taux d'expression de deux marqueurs de l'inflammation : IL-1 β et TNF- α dosés après injection de suspension de particules dans des articulations de rats sains. Les particules sont soit recouvertes de HAC6, soit de PVA et n'encapsulent pas de molécule d'intérêt. Les contrôles 0 % et 100 % sont obtenus par injection d'une solution saline et déclenchement de l'inflammation par injection de parois de mycobactéries respectivement. Les valeurs obtenues sont normalisées par un gène de « ménage » : RP29.

Figure IV-23: Détermination de l'activité de biosynthèse des protéoglycanes au niveau du cartilage patellaire par incorporation de soufre radiomarqué. L'incorporation du radioélément est réalisée 5 jours après l'injection des particules, les mesures de la radioactivité sont effectuées au centre de la rotule (bleu foncé) ainsi qu'en périphérie (bleu clair).

Figure IV-24: Coupes histologiques et coloration HES des membranes synoviales après observation au microscope (grossissement X20). a) témoins, b) rats ayant reçu 25 µg de particules, c) rats ayant reçu 50 µg de particules, d) rats ayant reçu 100 µg de particules (recouvertes de HABioC6-31%). Les résultats de la ligne supérieure concernent les articulations ayant reçu une injection et ceux de la ligne inférieure correspondent à deux injections à sept jours d'intervalle.

Figure IV-25: Coupes histologiques et colorations HES des rotules après observation au microscope (grossissement X20). a) témoins, b) rats ayant reçu 25 µg de particules, c) rats ayant reçu 50 µg de particules, d) rats ayant reçu 100 µg de particules (recouvertes de HABioC6-31%). Les résultats de la ligne supérieure concernent les articulations ayant reçu une injection et ceux de la ligne inférieure correspondent à deux injections à sept jours d'intervalle.

Figure IV-26: Observation au microscope des tissus de la patte gauche d'animaux ayant reçu 100 µg de particules après coloration des noyaux au DAPI, les noyaux apparaissent en bleu et les particules (FITC) en vert. a) rotule, b) et c) membranes synoviales (nanoparticules recouvertes de HABioC6-31%).

Tableau IV-1: Liste des différentes particules utilisées pour l'étude des variations de la quantité d'ARNm produits par les chondrocytes. Le lot de HAC6 utilisé est celui dont l'acidification a été obtenue par la résine échangeuse d'ions (rés signifie résine).

Chapitre V

Figure V-1: Schéma réactionnel de la synthèse de HAC6 (seules les fonctions carboxyliques du HA sont montrées car elles sont les seules à réagir lors de cette synthèse).

Figure V-2: Spectre RMN ¹H d'un hyaluronate modifié par des chaînes alkyle (C6) (HABioC6-17% concentration de 20 mg.mL⁻¹ dans D₂O), avec (a) (b) et (c) les signaux des protons de l'éthanol, (d) le signal des protons du méthyl du groupement acétamide et (e) les signaux des protons du phtalate de potassium. Le massif entre 3 et 5 ppm correspond aux signaux des protons du squelette de HA.

Figure V-3: Schéma du dispositif permettant la préparation d'émulsions. La sonde à ultrasons est plongée au plus profond du tube Falcon™ sans toutefois toucher la paroi, un bain de glace permet d'éviter les échauffements locaux lors de l'émulsification.

Figure V-4: Schéma représentant les différentes étapes conduisant à l'obtention de nanoparticules préparées par double émulsion/évaporation de solvant organique.

Figure V-5: Principe de la diffraction de la lumière par des particules de différentes tailles (source Malvern Instruments).

Figure V-6: Schéma descriptif d'une électrophorèse capillaire.

Figure V-7: Schéma de la réaction de réduction du sel de tétrazolium MTT en formazan d'après : http://www.itsbio.co.kr/main/goods_view.php?category2=58&no=122.

Figure V-8: Schéma de la réaction de réduction du NAD en NADH,H⁺ après transformation par la LDH du lactate en pyruvate.

Figure V-9: 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/schempcr.htm>).

Figure V-10: Quantification de l'expression d'un gène en fonction d'une gamme d'ADNc.

Tableau V-1: Caractéristiques des amorces des gènes étudiés en PCR en temps réel.

Lorsque le cartilage d'une articulation synoviale est dégradé, la réponse biologique des chondrocytes (les cellules du cartilage) n'est pas suffisante pour stopper cette dégradation ou réparer le tissu. Les thérapies non chirurgicales actuelles sont essentiellement basées sur l'administration d'anti-inflammatoires afin de soulager la douleur. Parallèlement, de nombreuses molécules aux effets potentiellement thérapeutiques ne sont pas utilisées en raison d'une faible biodisponibilité au niveau articulaire ou d'effets secondaires trop importants.

L'objectif de ces travaux est de préparer des particules polymère pouvant améliorer la biodisponibilité au niveau articulaire des principes actifs qu'elles contiennent. Ceci est obtenu par le recouvrement de ces particules avec des dérivés de l'acide hyaluronique (HA), polysaccharide naturellement présent dans le cartilage et qui possède une forte affinité pour un récepteur présent en surface des chondrocytes : le CD44. Ce ciblage actif permet de concentrer les molécules d'intérêt à proximité ou dans ces cellules en cas d'internalisation et donc, d'obtenir des effets biologiques avec des concentrations moins importantes en principe actif.

Nous avons tout d'abord estérifié le HA par des groupements hydrophobes pour lui conférer des propriétés tensio-actives. Puis les dérivés obtenus ont servi de stabilisant lors de la formulation d'émulsions conduisant à l'obtention de particules polymère. Ces particules ont pu être caractérisées en termes de taille, distribution et de quantité de HA modifié présent en surface. L'encapsulation de traceurs fluorescents a permis de démontrer que les particules peuvent être internalisées par des chondrocytes *in vitro* et que leur administration par injection intra-articulaire dans des genoux de rats sains n'engendre pas d'inflammation. L'encapsulation de molécules d'intérêt telles que le HA ou la chondroïtine sulfate (CS) est possible mais les tailles des particules alors obtenues sont plus importantes. De plus il ne nous a pas été possible de déterminer précisément les quantités encapsulées.

Ces travaux ouvrent la voie vers de nouvelles thérapies dans le traitement des pathologies articulaires : l'injection intra-articulaire de particules polymère recouvertes de HA modifié permet un adressage actif des molécules d'intérêt qu'elles contiennent au niveau des chondrocytes.

Mots clés : acide hyaluronique, nanoparticules, articulation, vectorisation, cartilage

A defect in articular cartilage yield to a biological response of the chondrocytes (the cells of the cartilage). However, this response is not sufficient to stop the damage or heal the tissue. The non-surgical therapies available are based on the administration of anti-inflammatory in order to relieve the pain. In the meantime, many molecules which might have therapeutic effects are not used because of poor bioavailability in the articulation or severe side effects.

The work described in this study is the elaboration of polymeric nanoparticles that can enhance articular bioavailability of entrapped drugs. One can reach this goal by using HA derivatives at the surface of such particles. HA is a polysaccharide naturally present in the articulation and with a strong affinity with one of the receptor present on the membrane of the chondrocytes: the CD44. Such an active targeting will allow the accumulation of drugs near or in the cells in case of internalization and therefore, the observation of biological effects with lower concentration of drugs.

First, we chemically modified the HA by esterification with hydrophobic chains in order to give it tension-actives properties. Then, those HA derivatives were used as the stabilizer in the formulation of polymeric particles. The characterization of the size, distribution and amount of HA derivatives present at the surface of the particle was conducted. The encapsulation of fluorescent probes proved that an *in vitro* internalization by the chondrocytes was possible. Moreover, intra-articular injection of such particles in the knees of healthy rats did not show any inflammation. Entrapment of molecules of interest such as HA or CS was possible but the size of the particles then formulated was higher and the amount of molecules encapsulated could not be precisely measured.

This work is promising for new therapies in articular diseases, the intra articular injection of polymeric particles covered by HA derivatives allow an active targeting in the chondrocytes of the drugs that they entrap.

Key words: hyaluronic acid, nanoparticles, articulation, vectorization, cartilage