



**HAL**  
open science

# Synthèse et caractérisation d'un hydrogel d'alginamide pour la régénération de voies nerveuses lésées au sein du Système Nerveux Central chez le rat

Frédéric Vallée

► **To cite this version:**

Frédéric Vallée. Synthèse et caractérisation d'un hydrogel d'alginamide pour la régénération de voies nerveuses lésées au sein du Système Nerveux Central chez le rat. Autre. Institut National Polytechnique de Lorraine, 2007. Français. NNT : 2007INPL110N . tel-01752836

**HAL Id: tel-01752836**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01752836>**

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](mailto: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.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

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

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

---

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE DES INDUSTRIES CHIMIQUES

# THESE

Présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR

DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : Génie des procédés et des produits

Par

**Frédéric Vallée**

*Synthèse et caractérisation d'un hydrogel d'alginate  
pour la régénération de voies nerveuses lésées au sein du  
Système Nerveux Central chez le rat*

Soutenue publiquement le 20 Décembre 2007 devant la Commission d'Examen

## MEMBRES DU JURY

Rapporteurs :	J.-C. Cassel, DR CNRS, Strasbourg Y. Chevalier, DR CNRS, Lyon
Examineurs :	E. Dellacherie, Pr Emérite, INPL A. Durand, Pr, INPL C. Kelche, DR CNRS, Nancy M. Léonard, CR CNRS, Nancy

Les travaux de recherche présentés dans ce mémoire ont été réalisés au Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire à Nancy et d'autre part au Laboratoire de Neurosciences Comportementales et Cognitives à Strasbourg.

Je remercie Madame Edith Dellacherie, Directeur de ce laboratoire lors de mon arrivée et Professeur Emérite à l'Ecole Nationale Supérieure des Industries Chimiques (ENSIC) pour m'y avoir accueilli et pour avoir accepté de présider ce jury de thèse.

Je lui suis particulièrement reconnaissant pour avoir participé aux réunions concernant ce projet durant ces trois années, et je lui adresse tous mes remerciements pour la confiance, les encouragements et les conseils scientifiques qu'elle m'a apportés.

Je remercie Madame Dellacherie Edith, Professeur Emérite à l'ENSIC

Je remercie également Madame Brigitte Jamart, Directeur actuelle du laboratoire et Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure des Industries Chimiques (ENSIC)

Je tiens à remercier Mr Cassel, Directeur de Recherche au CNRS, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe. Je le remercie pour sa gentillesse et ces réflexions sur le monde qui nous entoure.

Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de juger ce travail et d'en être rapporteur.

Mes remerciements vont aussi à Monsieur Chevalier Yves, Directeur de Recherche CNRS à ESCPE Lyon, pour avoir accepté de juger cette thèse.

Je suis très sensible à l'honneur que me fait Monsieur Kelche Christian, Directeur de Recherche au CNRS, pour avoir accepté de faire parti de mon jury.

Je tiens tout particulièrement à remercier Madame Michèle Léonard, Chargée de Recherche au CNRS, pour avoir encadré ce travail. Je lui suis reconnaissant de la rigueur et de la qualité scientifique des conseils qu'elle m'a prodigués. Je tiens à exprimer mes remerciements pour son aide et son engagement pendant cette quatrième année de rédaction rythmée entre la thèse et les Sapeurs Pompiers.

Je tiens à témoigner ma reconnaissance à Madame Schimchowitsch Sarah, Chargée de Recherche au CNRS (LN2C) pour avoir participé à l'encadrement de cette thèse. Je la remercie pour ces conseils scientifiques. D'un point de vue personnel, il est assez difficile de dire en quelques mots le bien que j'en pense. Merci pour son soutien psychologique et pour ces nombreuses discussions existentielles, qui m'ont permis de grandir et de prendre des décisions.

Je remercie également Monsieur Durand Alain, Jeune Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure des Industries Chimiques (ENSIC) pour avoir participé à l'encadrement de cette thèse malgré son emploi du temps très chargé.

J'adresse particulièrement mes remerciements à Martine Clémence, jeune maman et Master (Science de la vie et santé) pour son travail de qualité lors de ma 3<sup>ème</sup> année de thèse. Merci également pour sa gentillesse et nos échanges.

Je tiens également à remercier Christophe Muller Christophe, doctorant au LN2C, pour ces conseils, son aide et sa participation complète à ce projet.

Je ne pourrais oublier de remercier mes amis Ahmed Laroui, doctorant au LCPM, et Cécile Nouvel, Maître de Conférence à l'ENSIC, pour leur soutien et nos soirées.

Je tiens plus généralement à remercier les autres membres du LCPM et plus particulièrement Six Jean-Luc, Patrick Hubert, Jean-Marie Grosse, Marie-Begué Emmanuelle, Marie-Christine Grassiot, Dominique Stork, Jeanine Fourier, Robert Clément, Alain Petit et mes collègues doctorants, Ludo, Man, Charbel, Cécile et Elise.

Enfin, j'ai également une pensée amicale pour les membres du LN2C qui m'ont accueilli avec une très grande gentillesse.

# Sommaire

Introduction	1
Chapitre I: Les hydrogels et le SNC	5
Chapitre II: Synthèse	43
Chapitre III: Physico-chimie	69
Chapitre IV: Etude <i>in vivo</i>	101
Conclusion	132
Annexes	135
Références bibliographiques	146
Nomenclature et liste des abréviations	174
Figure	175

# *Introduction générale*

## *Introduction générale*

En France, on dénombre aujourd'hui plus de 40 000 paraplégiques et tétraplégiques. Chaque année, les accidents de la route et les chutes professionnelles sont responsables de 1 500 nouveaux cas de handicaps moteurs.

Lors de ces accidents, des lésions traumatiques cérébrales provoquent la perte partielle ou totale de l'activité motrice volontaire permanente. Ceci est dû au fait que les terminaisons axonales des neurones qui conduisent l'influx nerveux, sont endommagées.

Chaque année pour 100 morts sur la route, on dénombre aussi 93 handicaps lourds dont 49 par atteinte cérébrale, 28 par problèmes orthopédiques et 16 paralysies définitives.

Un traumatisme cérébral peut aussi trouver son origine dans une chirurgie invalidante, nécessaire pour traiter certaines tumeurs. Le geste chirurgical, permettant d'enlever la masse tumorale, reste le meilleur moyen de l'éradiquer. Cependant, une atteinte au cerveau ou dans la moelle osseuse est souvent une opération mutilante.

La restauration des fonctions du cerveau ou de la moelle épinière après lésion, reste encore un réel défi pour les équipes médicales et scientifiques. Les travaux récents réalisés dans ce domaine, sont orientés dans leur majorité des cas vers des modèles de lésion médullaire. Ces travaux sont porteurs de nombreux espoirs.

Il y a une trentaine d'années, la régénération neuronale était considérée comme impossible dans le système nerveux central, mais probable dans le système nerveux périphérique.

Les obstacles majeurs à la régénération au niveau du système nerveux central semblent provenir de la formation, au niveau de la lésion, d'une cicatrice gliale physiquement et chimiquement infranchissable, ainsi que de la présence de molécules inhibitrices de la croissance neuritique. D'autre part, en présence d'une cavité lésionnelle, la progression des cônes de croissance au travers de la cavité est impossible. Il faut donc fournir un support mécanique adéquat aux axones en voie de régénération pour leur permettre de franchir la cavité en direction de leur cible.

Notre travail s'inscrit dans la stratégie de l'utilisation d'un biomatériau à base d'alginate comme support de régénération des voies nerveuses lésées du système nerveux central, qui peut être associé ou non à un traitement pharmacologique permettant d'inhiber les mécanismes cellulaires participant à la non régénération des voies nerveuses lésées du SNC.

## Introduction générale

Ce travail vise à élaborer un matériau de comblement des cavités lésionnelles du système nerveux. Ce matériau devra pouvoir être introduit facilement dans la cavité en épousant sa forme. De plus, il sera le support mécanique de la régénération des voies nerveuses durant la totalité du temps nécessaire. Enfin, ce matériau pourra contenir des molécules participant à un traitement pharmacologique.

Cette thèse représente au laboratoire le premier travail dans le cadre de ce projet qui a fait appel à des compétences pluridisciplinaires. Ce projet de recherche a été rendu possible grâce à la collaboration étroite entre le Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire (LCPM) et le Laboratoire de Neurosciences Comportementales et Cognitives (LN2C). Le LCPM a apporté ses compétences dans le domaine de l'élaboration et de la caractérisation des biomatériaux de comblement. Le LN2C a pris en charge le volet relatif à l'évaluation biologique de ces biomatériaux: interaction avec les cellules vivantes, implantation, rôle dans la régénération neuronale. Les essais biologiques réalisés *in vivo* ont été effectués avec des populations de rats.

Par rapport à des applications médicales et neurochirurgicales chez l'Homme, les travaux présentés se situent encore très en amont. Néanmoins, ils ouvrent la voie à de possibles stratégies thérapeutiques. Pour le moment, il n'existe, en effet, pas de solution efficace pour les personnes atteintes de lésions traumatiques invalidantes.

La régénération des voies nerveuses lésées du système nerveux chez le rat nécessite dans le meilleur des cas, un temps, estimé à plus d'un an. En comparant ce temps de régénération à la durée d'un travail de thèse, soit trois ans, nous voyons que la mise au point des caractéristiques chimiques et physico-chimiques optimales du biomatériau n'a pu se faire qu'en parallèle de l'étude *in vivo*, au regard des temps nécessaires pour observer une éventuelle régénération des voies nerveuses lésées chez le rat.

Le LCPM possède une longue expérience dans l'élaboration de biomatériaux à partir de polysaccharides d'origines diverses. Récemment une thèse avait démontré l'intérêt de l'alginate de sodium (polysaccharide extrait des algues brunes) dans l'obtention de biomatériaux pouvant servir à la réparation du cartilage. Ces résultats ont servi de point de départ aux travaux décrits dans ce mémoire.

## Introduction générale

En plus de son abondance et de son faible coût, l'alginate présente des propriétés uniques qui en font une matrice très utilisée comme matériau de comblement et d'encapsulation.

Les macromolécules d'alginate de sodium, une fois modifiées par la fixation covalente de groupements hydrocarbonés, acquièrent la capacité à s'auto-associer en milieu aqueux. Pour des concentrations suffisantes, cette auto-association forme un réseau de macromolécules qui s'étend dans tout le volume de la solution considérée. Cette dernière adopte un comportement mécanique macroscopique qui s'éloigne de celui d'un liquide visqueux pour devenir celui d'un hydrogel aux propriétés visco-élastiques. Les propriétés mécaniques de cet hydrogel vont varier selon la nature et le nombre des groupements hydrocarbonés fixés le long des chaînes de l'alginate de sodium. Des travaux précédents ont permis d'établir les relations entre la structure chimique des polysaccharides modifiés et le comportement rhéologique des hydrogels formés en milieu aqueux. Ces informations ont été précieuses pour le démarrage de ce travail afin de faire face aux difficultés posées par l'application visée. Ces difficultés sont de deux types: avoir un biomatériau qui conserve ses propriétés mécaniques sur une durée d'un an minimum dans des conditions *in vivo*, adapter la structure chimique de ce biomatériau afin qu'elle soit optimale pour la régénération neuronale, ainsi que pour les études biologiques visant à l'étudier.

Dans la première partie de ce mémoire, nous présenterons les différents types d'hydrogels physiques et chimiques à base de polysaccharides. Nous détaillerons la place de l'alginate dans l'ingénierie tissulaire. Nous aborderons la notion de biocompatibilité et présenterons des applications potentielles, comme matériau de comblement et système d'encapsulation. Enfin, nous dresserons un bilan de la recherche dans le domaine de la régénération des voies nerveuses lésées du système nerveux central après avoir rappelé quelques notions de base sur le SNC.

La synthèse des dérivés hydrophobes de l'alginate de sodium est décrite dans le chapitre II. Deux familles de dérivés de l'alginate de sodium sont préparées par fixation covalente de groupements hydrocarbonés aliphatiques en C<sub>12</sub>. Ces deux familles diffèrent par la nature des fonctions chimiques reliant les groupements C<sub>12</sub> aux chaînes de polysaccharide: dans un cas des esters et dans l'autre des amides. Si la synthèse des esters d'alginate est connue au laboratoire, la mise au point des dérivés amides (ou alginamides) a constitué l'enjeu principal de cette partie du travail.

## Introduction générale

Dans des conditions convenables de concentration, les dérivés de l'alginate forment, en milieu aqueux, des solutions très visqueuses, voire des gels visco-élastiques. Le comportement rhéologique de ces hydrogels et son évolution avec la structure chimique et la concentration de l'alginate modifié, font l'objet du chapitre III. Etant donné les travaux antérieurs réalisés au laboratoire, nous avons orienté cette partie du travail vers la mise en évidence d'effets spécifiques aux applications d'implantation *in vivo*: stabilité du comportement rhéologique sur plusieurs mois, sensibilité à la force ionique du milieu physiologique, sensibilité à la présence d'ions calcium, cinétique de reprise de viscosité après implantation.... Une étude plus systématique des relations entre caractéristiques structurales et propriétés rhéologiques est déjà disponible pour les alginates esters dans les travaux antérieurs.

Le chapitre IV présente l'étude *in vivo* relative à l'implantation d'un hydrogel d'alginate ester et d'un alginamide associé ou non à un traitement pharmacologique par voie intrapéritonéale (ip) d'aminoguanidine et de putrescine (AGP) chez des rats présentant des lésions au sein du système nerveux central. Nous nous attarderons à présenter la démarche expérimentale retenue, les questions sous-jacentes, et les solutions apportées à chaque stade du projet.

Notre étude *in vivo* présentera les résultats comportementaux et l'analyse morphologique obtenus selon différentes approches et en particulier une approche combinée c'est-à-dire l'implantation d'un biomatériau et d'un traitement pharmacologique administré par voie intrapéritonéale.

Seront également présentés les résultats relatifs préliminaires à l'encapsulation d'AGP dans des hydrogels d'alginate ester et d'alginamide. A terme, ces travaux visent à implanter en une seule étape un biomatériau qui serait lui-même chargé en principes actifs.

*Chapitre I :*  
*Les hydrogels et le SNC*

## **I. Introduction**

La recherche de nouveaux biomatériaux (prothèses, matériaux de comblement, formes pharmaceutiques nouvelles, tissus ou organes artificiels, systèmes diagnostiques.....) est fondamentale pour le secteur biomédical et constitue de ce fait un domaine en pleine évolution. Cette recherche requiert une approche pluridisciplinaire, en associant chimistes, physico-chimistes, biologistes, médecins...

Les biomatériaux ont été développés dans le but, à terme, de préserver l'intégrité et le confort de vie des personnes souffrant de déficiences fonctionnelles graves, ou victimes de traumatismes. Il s'agit de dispositifs d'assistance corporelle, capables de suppléer les fonctions des organes lésés. Le domaine des biomatériaux recouvre une grande variété d'applications biomédicales, puisqu'ils peuvent être, à la fois des matériaux temporaires de réparation tissulaire, des matériaux implantables permanents destinés à remplacer de manière définitive un élément corporel déficient ou des matériaux constitutifs de systèmes d'assistance extra corporelle. Les biomatériaux regroupent aussi bien des matériaux métalliques, minéraux ou synthétiques (alliages métalliques, céramiques, polymères synthétiques) que des polymères naturels d'origine animale ou végétale (tels certaines protéines comme le collagène, le fibrinogène, ou des polysaccharides comme la cellulose, l'alginate ou le chitosane), et plus récemment des matériaux hybrides associant un matériau inerte à une matrice biologique.

Pour notre part, après quelques rappels sur les polymères naturels, nous présenterons différentes familles d'hydrogels issus de polysaccharides et de protéines. Ces hydrogels, forment un réseau tridimensionnel et sont dans certains cas utilisés comme biomatériaux supports pour la régénération tissulaire.

Dans un second temps, nous décrirons, au moyen de quelques exemples, la place de l'alginate dans le domaine de l'ingénierie tissulaire. Nous avons choisi ce polymère car il représente le matériau qui a servi de base aux recherches exposées dans ce mémoire.

Nous terminerons en présentant le contexte scientifique de notre étude qui concerne la régénération des voies nerveuses lésées au sein du Système Nerveux Central (SNC) par

implantation d'un biomatériau tuteur de croissance. Après avoir exposé quelques notions biologiques et la problématique concernée, nous nous attacherons à décrire quelques biomatériaux et traitements pharmacologiques en voie de développement.

## II. Les polymères naturels

Les polymères naturels utilisés pour des applications médicales incluent principalement deux catégories de molécules : les polysaccharides comme l'alginate, le chitosane, le hyaluronate, ou encore certains dérivés de la cellulose ainsi que des protéines telles que le collagène, la gélatine.

Dans cette présentation, nous ne décrirons que les principaux polymères ayant déjà fait l'objet d'études en tant que matériaux supports pour l'ingénierie tissulaire.

### II.1. Les polysaccharides

- L'alginate est un polysaccharide polyanionique naturel, qui se trouve dans la paroi cellulaire de toutes les algues brunes. Il peut être extrait de certaines de ces algues brunes (*Macrocystis pyrifera*, *Laminaria digitata*, *Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum*) et peut également être produit à partir de bactéries (*Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas aeruginosa*). Dans ce dernier cas, la structure moléculaire de l'alginate obtenu est mieux contrôlée.

En 1955, Fischer et Dörfel [Fischer, 1955] ont mis en évidence l'existence de deux acides uroniques dans la macromolécule d'acide alginique: l'acide  $\beta$ -D-mannuronique (M) et l'acide  $\alpha$ -L-guluronique (G). Haug et Coll. [Haug, 1974] ont montré que les alginates sont constitués de ces deux monomères associés en 1 $\rightarrow$ 4, selon un enchaînement irrégulier de blocs de trois types :

- un bloc homopolymère de résidus mannuronates –M-M-M-,
- un bloc homopolymère de résidus guluronates –G-G-G-,
- un bloc de résidus mannuronates et guluronates alternés –M-G-M-.

La figure I-1 représente la structure de ces deux acides uroniques. Les propriétés physico-chimiques des solutions et des gels d'alginate en milieu aqueux dépendent de la structure du

polysaccharide, c'est-à-dire de la proportion de résidus mannuronates par rapport aux résidus guluronates (noté M/G) ainsi que du nombre et de la longueur des blocs MM, GG et MG [Haug, 1967], [Draguet, 2000].

Les alginates trouvent de nombreuses applications anciennes, actuelles ou en devenir dans différents types d'industries:

- industries agro-alimentaires (glace et dessert, sauce)
- industries cosmétiques (soin du visage, dentifrice)
- industries pharmaceutiques (pommade pour le traitement des brûlures, pansements, encapsulation de principes actifs.....)
- industrie du textile (fixation des colorants), du papier, du traitement de l'eau....

Ces applications sont la conséquence des propriétés de l'alginate. Celui-ci est un agent de texture polyvalent. Il peut être un épaississant (contrôle de la viscosité), un gélifiant, un stabilisant (notamment par rapport à la chaleur), mais aussi un réducteur de cristaux (produits surgelés) et un protecteur (films alimentaires).

L'alginate est considéré comme un polymère biocompatible au regard de certaines applications. Il est agréé par la FDA, principalement comme excipient dans le domaine médical (traitements ophtalmologiques, enrobage de principes actifs, suppositoires, sirops...).

Des travaux en cours, visant la mise au point de matériaux à base d'alginate, particulièrement pour l'ingénierie tissulaire, seront décrits dans le paragraphe V.

- Le hyaluronate de sodium, présenté figure I-2, est un polysaccharide présent dans de nombreux tissus conjonctifs, chez l'ensemble des vertébrés. Les principales formes de hyaluronate commercialisées sont extraites de crête de coq, de cordon ombilical ou d'humeur vitreuse. L'acide hyaluronique peut également être obtenu par fermentation à partir de bactéries *Streptococcus zooemidemicus*. Ce polysaccharide est composé d'un enchaînement linéaire non ramifié de motifs disaccharidiques constitués d'acide D-glucuronique lié en  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3) à la N-acétyl- $\beta$ -D-glucosamine. Les motifs sont associés les uns aux autres en  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4).

En raison de sa présence dans de nombreux tissus conjonctifs chez les vertébrés, l'acide hyaluronique est très adapté aux applications biomédicales visant le traitement de lésions au

niveau de tissus comme la peau ou le cartilage. Il a également des applications en chirurgie ophtalmique (transplantation de cornée, cataracte, glaucome), chirurgie esthétique (comblement des rides) et en cosmétique (réhydratant). Dans ces applications, l'acide hyaluronique joue le rôle de principe actif et non celui d'excipient, à la différence de l'alginate. Son coût représente néanmoins un inconvénient.

Les études en cours, visant le développement de nouveaux traitements dans le domaine des pathologies du cartilage, sont très nombreuses en raison notamment des propriétés rhéologiques remarquables du hyaluronate et de sa très bonne biocompatibilité [Dausse, 2003]. Sur le plan biologique, le hyaluronate présente une interaction notable avec les chondrocytes. Il agit sur leur activité de prolifération et de synthèse. Ainsi, la présence de hyaluronate au sein d'un biomatériau peut permettre, non seulement, d'induire la réhabilitation cellulaire de ce matériau *in vivo*, mais aussi, dans certains cas de stimuler la prolifération cellulaire et d'activer la synthèse de la matrice extracellulaire.

La Société Fidia, qui commercialise des hyaluronates, a déposé un nombre important de brevets sur des dérivés amphiphiles d'acide hyaluronique. Les hydrogels obtenus à partir de ces dérivés sont étudiés pour des applications dans le domaine biomédical, telles que le traitement de certaines tumeurs [Fusenig, 2004], de pathologies du cartilage [Callegaro, 2004 a,b]...

Notons qu'au laboratoire, un grand nombre de dérivés amphiphiles du hyaluronate ont été synthétisés, caractérisés et utilisés pour des applications qui concernent la réparation du cartilage [Dausse, 2003], [Pelletier, 2000, 2001].

- La chitine (figure I-3) est l'un des polymères naturels les plus abondants après la cellulose. C'est un constituant de la carapace des crustacés et insectes. On peut également trouver de la chitine dans certains champignons. C'est un polysaccharide linéaire constitué d'un enchaînement  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) d'unités glucosamine avec un degré élevé de N-acétylation.

Le chitosane, principal dérivé de la chitine, est obtenu par déacétylation partielle en milieu alcalin (figure I- 4). Ce polymère est polycationique. Les propriétés du chitosane dépendent de sa masse molaire et de la proportion en unités déacétylées. Le chitosane est soluble dans les acides minéraux et organiques suite à la protonation du groupe  $\text{NH}_2$ , dès lors que le pH est inférieur à 5,5 environ. Le chitosane trouve un certain nombre d'applications

dans l'industrie cosmétique (hydratant), de la diététique (suppléments alimentaires) et le traitement des eaux. Il présente une activité antimicrobienne et une capacité à absorber les ions métalliques lourds.

A notre connaissance, il n'est pas agréé par la FDA pour des utilisations dans le domaine médical.

Sur le plan de la recherche, les hydrogels de chitosane sont néanmoins très étudiés pour des applications dans les domaines biomédical et pharmaceutique, notamment pour la libération de molécules actives [Mi, 1999], [Berger, 2004a] en raison de sa biocompatibilité présumée.

Les travaux de Mi [Mi, 1999] exploitent leurs propriétés dans le domaine de l'encapsulation pour la libération d'agents anti-cancer. Cette libération est fonction du pH et se fait par diffusion à travers la structure poreuse de l'hydrogel, laquelle varie en fonction des conditions environnementales (figure I-5).

L'encapsulation d'oligonucléotides est également une application importante du chitosane dans le cadre de la thérapie génique. En s'associant au chitosane, les polynucléotides négativement chargés se retrouvent sous une forme compactée, ce qui facilite leur incorporation au niveau cellulaire [Borchard, 2001].

Différents dérivés amphiphiles du chitosane ont également été étudiés. Par exemple, en milieu aqueux, les chaînes de chitosane hydrophobisé par des chaînes alkyles en C<sub>16</sub> s'assemblent en vésicules polymères monolamellaires en présence de cholestérol [Sludden, 2000]. Ces vésicules sont biocompatibles, hémocompatibles et susceptibles d'encapsuler des médicaments hydrosolubles.

La lyophilisation des solutions de chitosane modifié permet l'obtention d'éponges ou de particules qui sont proposées pour la libération contrôlée de médicaments, susceptibles en particulier de franchir les barrières hémato-encéphaliques. Ainsi, Martin a montré la possibilité d'encapsuler un dérivé de la denbufylline dans le traitement de maladies vasculaires cérébrales [Martin, 2003].

Ce système d'encapsulation n'est néanmoins pas universel comme montré dans les travaux de Sludden [Sludden, 2000]. Ce chercheur a étudié leur potentiel comme système de libération de la bléomycine, composé anti-cancer et molécule modèle. Les résultats de cette

étude montre un profil de libération non idéal pour cette molécule avec une libération quasi instantanée après administration dans l'organisme.

- L'agarose est un polysaccharide extrait des algues marines rouges. C'est un copolymère alterné de 3,6-anhydro-L-galactose en liaisons  $\alpha$  (1→4) et de D-galactose en liaisons  $\beta$  (1→3) (figure I-6).

On retrouve ce polysaccharide dans des applications alimentaires (propriétés gélifiantes et intérêt diététique) mais aussi dans le domaine des biotechnologies sous forme de gels (milieu de culture, électrophorèse en gel d'agarose, gel pour la chromatographie...). Les principales propriétés de ces gels sont la résistance mécanique, la thermoréversibilité, la stabilité chimique (micro-organisme, attaque enzymatique, pH), le gonflement...

- La cellulose est le polysaccharide naturel le plus abondant. C'est une chaîne macromoléculaire très longue, composée de molécules de glucose (figure I-7). Chaque molécule d'anhydroglucose a trois groupes hydroxyle qui peuvent être substitués et qui ont des réactivités différentes. A l'état naturel, la cellulose est un composé cristallin, de masse moléculaire élevée. A cause de son insolubilité dans l'eau et dans les solvants organiques, la cellulose est en général utilisée sous forme de dérivés (carboxyméthyl, hydroxypropyl...).

La cellulose et certains de ses dérivés sont utilisés dans l'industrie alimentaire, l'industrie pharmaceutique (enrobage de principes actifs pour des administrations par voie orale, excipient dans certaines formulations injectables par voies intra musculaire ou intra articulaire, poudre sirop, gels...). On trouve d'autres applications dans le domaine médical telles que des membranes d'hémodialyse ou encore des implants ophtalmiques mais aussi dans différentes autres industries (papier, fibre, explosif, biocarburant).

## **II.2. Les protéines**

Les protéines sont des macromolécules biologiques ayant des propriétés et des fonctions plus ou moins spécifiques. Ce sont des polymères pouvant avoir une haute masse molaire, constitués d'un enchaînement spécifique de 20 acides  $\alpha$ -aminés différents. La composition et la séquence en acides aminés, appelées structure primaire, sont généralement uniques et

spécifiques à chaque protéine. Les liaisons hydrogène entre les groupements carbonyle et amide de la chaîne polypeptidique, conduisent à diverses structures secondaires telles que les conformations en hélices  $\alpha$  et en feuillets  $\beta$ . Les associations ioniques et hydrophobes, auxquelles s'ajoutent les liaisons hydrogène et les ponts disulfure donnent naissance à une structure d'ordre supérieur, la structure tertiaire propre à chaque chaîne de polypeptide. Enfin, deux ou plusieurs chaînes peuvent s'associer entre elles pour former une structure quaternaire.

En fonction de leur organisation spatiale, il convient de distinguer trois catégories de protéines:

- les protéines très solvatées et à chaîne flexible. C'est le cas en particulier de la caséine de lait et de nombreuses protéines après dénaturation.
- les protéines fibrillaires, à l'inverse, ont une structure régulière très rigide (hélice  $\alpha$ , feuillet  $\beta$ ). Ces protéines sont allongées jusqu'à former dans certains cas des fibres (fibrinogène, collagène).
- les protéines globulaires constituent le cas intermédiaire d'un point de vue structural. Ce sont des protéines dont la forme est celle d'une sphère ou d'un ellipsoïde peu allongé. Elles sont constituées de parties rigides (hélices  $\alpha$ , feuillets  $\beta$ ) et de zones moins ordonnées. Les protéines globulaires sont denses et sont souvent représentées sous la forme d'une pelote compacte. Un grand nombre de protéines connues appartiennent à cette catégorie: albumine, globuline, enzymes...

- Le collagène, glycoprotéine fibrillaire, est un matériau intéressant pour des applications biomédicales. Il est présent dans la plupart des tissus humains et est le principal composant de la matrice extracellulaire des os, du cartilage, des tendons, des ligaments, de la peau... La structure de base des 19 types de collagènes existants est composée de 3 chaînes polypeptidiques qui s'associent pour former un arrangement en triple hélice. Les brins de collagène peuvent s'agréger pour former des fibres stables [Lee C.H, 2001]. Sous l'action de la chaleur, le collagène se dénature et les trois brins de tropocollagène se dissocient. Au refroidissement, ils forment une nouvelle structure appelée gélatine. Cette transformation est irréversible.

Le collagène se retrouve principalement dans le domaine de la chirurgie plastique. Il permet après injection d'estomper les rides du visage. Néanmoins, le risque d'allergie est important. Il est également utilisé dans des pansements pour plaies cutanées.

- La fibrine est une protéine élastique, insoluble et filamenteuse issue du clivage enzymatique du fibrinogène sous l'action de la thrombine, lors de la coagulation sanguine. Le fibrinogène est une protéine du plasma sanguin.

- Des recherches concernant l'obtention de polypeptides qui «imitent» certaines de ces protéines naturelles sont également réalisées. Les polypeptides sont synthétisés à partir de combinaisons variées d'acides aminés, la difficulté étant de contrôler leur séquence. Certains auteurs proposent une stratégie de synthèse de polypeptides, à partir d'amorceurs organonickel, avec un contrôle de la séquence des acides aminés et une large gamme de masses molaires [Deming, 1997].

Une revue de Han [Han, 2004] présente les développements récents des agents de couplage en synthèse organique pour la formation des peptides. Sont notamment cités dans ces travaux l'utilisation de carbodiimide et du 2 chloro-1-méthylpyridinium (CMPI) comme agent de couplage. Mukaiyama [Mukaiyama, 1979] utilisait dès 1979 le CMPI pour la synthèse peptidique.

Ces deux agents de couplage sont ceux que nous avons retenus pour la synthèse de nos dérivés alginamides qui sera présentée dans le chapitre suivant.

### **III. Les hydrogels à base de polysaccharides**

L'hydrogel est un type particulier de gel formé par un réseau tridimensionnel de polymère hydrophile dans lequel le solvant de gonflement est de l'eau. Sa principale caractéristique est sa capacité à gonfler en présence d'eau et à se contracter lorsque celle-ci s'évapore ou lorsque le solvant devient de moins bonne qualité (effet de sel, température). Suivant la nature des pontages mis en œuvre dans le réseau, il est possible de distinguer les hydrogels chimiques et les hydrogels physiques.

Il existe un grand nombre de polysaccharides d'origine animale, végétale ou bactérienne capables de former des gels, soit de manière spontanée sous l'influence de paramètres extérieurs (pH, ions, température...), soit après modification chimique du squelette hydrocarboné. Les polysaccharides possèdent, en effet, de nombreux groupements réactifs fonctionnalisables (hydroxyle, acide carboxylique, amine), ce qui permet d'envisager de nombreuses réactions de modification chimique, pour des applications notamment dans le domaine biomédical. En outre, du fait de leur abondance naturelle, ils sont souvent peu coûteux et leur utilisation à grande échelle (alginate, cellulose, pectine...) constitue un moyen de valoriser les ressources naturelles.

Dans un premier temps, nous détaillerons les hydrogels physiques en nous attardant sur leur mode de préparation et leurs principales propriétés physico-chimiques.

Ces gels physiques sont des gels dans lesquels les chaînes macromoléculaires sont réticulées entre elles par l'intermédiaire d'interactions ioniques, de liaisons hydrogène ou encore d'interactions hydrophobes.

Dans un second temps, nous présenterons de même les hydrogels chimiques obtenus par diverses réactions. Ces gels chimiques sont des réseaux réticulés de manière covalente, donc irréversible.

### **III.1. Les gels physiques**

Les gels physiques résultent de l'enchevêtrement de chaînes macromoléculaires en solution, formant des zones de jonctions réversibles. Généralement, il s'agit de gels dans lesquels les chaînes macromoléculaires sont réticulées entre elles par l'intermédiaire d'interactions ioniques, de liaisons hydrogène ou encore d'interactions hydrophobes. Dans certains cas, ces zones d'association sont stimulables sous l'effet du pH ou de la T°C par exemple.

#### **III.1.1 Hydrogels réticulés par interactions ioniques**

Les hydrogels physiques peuvent se former par interaction ionique entre un polysaccharide chargé et des ions le plus souvent divalents de charge opposée (figure I-8).

L'alginate, le chitosane sont deux polysaccharides qui forment des gels physiques par interactions ioniques en présence d'ions polyvalents.

Cette méthode de préparation d'hydrogels physiques est extrêmement douce et simple. La formation de ces hydrogels, très souvent biocompatibles, représente une alternative à la formation d'hydrogels chimiques nécessitant l'utilisation d'agents de réticulation souvent toxiques ou de longues étapes de purification.

- Les alginates ont été étudiés de nombreuses fois pour leurs propriétés à former des gels en présence de cations divalents. Il s'agit d'une gélification ionotropique. Ce phénomène est dû à la complexation, par les cations divalents, d'une partie des fonctions carboxylate et hydroxyle pouvant appartenir à des chaînes macromoléculaires différentes, comme schématisé figure I-9 et I-10 [Smidsrod, 1990], [Rees, 1972]. Dans les hydrogels d'alginate de calcium, la formation du gel est due à la chélation de l'ion  $\text{Ca}^{2+}$  dans les cavités électro-négatives formées par les groupements carboxylate des résidus guluronates selon le modèle "egg-box". Suivant la force des interactions ioniques, le pouvoir chélatant et la taille des cations, un réseau tridimensionnel se forme et l'alginate gélifie. Les cations monovalents et  $\text{Mg}^{2+}$  ne provoquent pas la gélification de l'alginate. La force du gel dépend de la nature du cation, les gels les plus forts étant obtenus avec  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  [Smidsrod, 1972].

La gélification s'accompagne fréquemment de phénomènes de synérèse, dus à la contraction du réseau et l'expulsion d'une fraction plus ou moins importante d'eau; dans ce cas, le volume occupé par le gel est inférieur au volume de la solution de départ.

Le procédé le plus simple pour préparer un gel d'alginate consiste à ajouter directement un sel de calcium dans une solution d'alginate de sodium. Cependant, du fait de l'échange rapide entre les ions  $\text{Na}^+$  et les ions  $\text{Ca}^{2+}$ , l'homogénéisation du milieu est difficile et les gels obtenus ne sont pas uniformes.

Un deuxième procédé consiste à obtenir les gels par dialyse. La solution d'alginate est introduite dans une membrane de dialyse et mise au contact d'une solution de sel de calcium. Il y a alors diffusion lente des ions  $\text{Ca}^{2+}$  à travers la membrane. Toutefois, les gels formés dans ces conditions sont également hétérogènes, en raison d'une migration de l'alginate de sodium vers le front de gélification. Cette hétérogénéité peut cependant être significativement

réduite si l'alginate est au préalable dissous dans une solution contenant des ions non gélifiants de type  $\text{Na}^+$ .

Pour pallier cet inconvénient, un troisième procédé reposant sur l'électrodialyse a été proposé par Shchipunov [Shchipunov, 2000]. L'échange des cations à travers la membrane d'un compartiment externe à un compartiment interne contenant la solution d'alginate a lieu sous l'effet d'un courant électrique. On obtient des gels homogènes en faisant circuler le courant électrique alternativement de part et d'autre du compartiment. Le second avantage de cette méthode est la formation de gels optiquement transparents, en raison de la grande homogénéité de réseau.

L'inconvénient majeur des gels d'alginate de calcium est leur faible stabilité en présence d'agents chélatants du calcium et en présence d'électrolytes non gélifiants. En effet, les hydrogels de calcium sont déstabilisés en présence de  $\text{Na}^+$ , dès lors que le rapport  $\text{Na}^+/\text{Ca}^+$  est suffisamment élevé. Ce rapport varie de 3 pour les alginates pauvres en motifs guluronique à 25 pour les alginates les plus riches en motifs guluronique [Gombotz, 1998].

De même, la présence d'ions phosphates (souvent utilisés dans les tampons pour les applications biologiques) déstabilise rapidement le réseau d'alginate de calcium.

- Le deuxième polysaccharide présenté ici comme exemple est le chitosane. Celui-ci peut former des gels physiques par interactions ioniques avec des polyanions de petite ou grande masse molaire [Berger, 2004a, 2004b].

Les contre-ions, de petite masse molaire, les plus employés sont le pyrophosphate, le tripolyphosphate (TPP), le tétrapolyphosphate, l'octapolyphosphate, l'hexametaphosphate,  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  et  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ . Bodmeier et Coll. ont été les premiers à étudier la gélification ionotropique du chitosane avec le TPP pour l'encapsulation de médicaments [Bodmeier, 1989]. Le TPP est le polyanion le plus couramment utilisé pour la réticulation ionique du chitosane, comme le calcium pour l'alginate [Aral, 1998], [Lim, 1998]. D'autres polyanions de masse molaire élevée sont également utilisés tels que l'acide polyaldéhydecarbonique et le poly(1-hydroxy-1-sulfonate-2-propène) ainsi que des contre-ions hydrophobes tels que le sulfate d'octyle, le sulfate de lauryle, le dioctylsulfosuccinate. Dans ce dernier cas, les interactions hydrophobes qui se mettent en place entre les chaînes alkyle des contre-ions contribuent également au mécanisme de gélification.

Quelle que soit la masse molaire des anions, le processus de gélification est dû à la formation de réticulations ioniques inter et intramoléculaires [Janes, 2001]. Un paramètre important à considérer pour la formation de l'hydrogel est le pH pendant la réaction de réticulation. En effet, si le pH est trop élevé, les charges positives du chitosane sont neutralisées et le système précipite. Afin d'éviter la précipitation du chitosane, le pH de la solution ne doit pas être supérieur à 6.

A noter qu'il est possible d'optimiser les propriétés physico-chimiques des gels de chitosane en modifiant la charge du polymère, le taux d'enchevêtrement des chaînes, la nature des contre-ions [Berger, 2004a, b]...

L'inconvénient principal de ces hydrogels de chitosane reste le manque de stabilité mécanique au vu de la réversibilité des liaisons ioniques de réticulation mises en place.

### **III.1.2 Hydrogels formés à partir de polysaccharides chimiquement modifiés par interactions hydrophobes**

Certains polysaccharides, comme par exemple le hyaluronate, ne gélifient pas de manière spontanée en présence d'ions ou sous l'influence de la température ou du pH. Ainsi, pour former des hydrogels à partir de ces polysaccharides, on peut avoir recours à une modification chimique, par exemple en greffant sur la chaîne polysaccharidique des groupements hydrophobes (figure I-11). D'autres polysaccharides tels que l'alginate peuvent être modifiés de la même façon pour obtenir des gels aux propriétés différentes de celles des gels formés par interactions ioniques.

#### **III.1.2.1. Synthèse**

Au sein de notre laboratoire, des dérivés amphiphiles de hyaluronate de sodium ont été préparés en greffant des chaînes alkyle longues (12 ou 18 carbones) sur le squelette polysaccharidique au moyen de liaisons ester [Pelletier, 2000, 2001].

D'autres polysaccharides peuvent être modifiés de manière similaire pour obtenir des dérivés amphiphiles. Des hydrogels de dérivés amphiphiles de pectine ou d'alginate ont également été préparés au laboratoire en fixant des chaînes C<sub>12</sub>, C<sub>16</sub> et C<sub>18</sub> sur le squelette polymère [Pelletier, 2000], [Miralles-Houzelle, 2001], [Rastello, 2004], [Léonard, 2004]. La

figure I-12 illustre cette réaction qui conduit à des dérivés dont les chaînes alkyle sont greffées par le biais de liaisons ester.

En utilisant non pas un dérivé alkylbromé comme précédemment mais un cardodiimide hydrosoluble, l'EDC, Galant et Coll. ont synthétisé des alginates amphiphiles en fixant des chaînes amino alkyles en C<sub>8</sub> *via* des liaisons amide [Galant, 2006] comme illustré figure I-13.

De même, il est également possible d'obtenir du chitosane hydrophobisé [Desbrieres, 1996, 2004] en faisant réagir les fonctions amine du chitosane avec les fonctions aldéhyde terminal de chaînes alkyle, suivi d'une amination réductrice (figure I-14).

Dernier exemple de polymère hydrophobisé, des dérivés amphiphiles ont été préparés par modification chimique des fonctions hydroxyle de l'hydroxyéthylcellulose et de l'hydroxypropylcellulose. Les segments hydrophobes fixés peuvent être soit des chaînes hydrocarbonées, soit des chaînes perfluorées [Hwang, 1993].

Cette liste n'est pas exhaustive. D'autres polymères, tels que le dextrane, ou le pullulane ont également fait l'objet de modifications telles que celles décrites ci-dessus. Toutefois, ces polymères, même modifiés de la sorte, forment rarement des gels en raison de la neutralité de la chaîne de polysaccharide; le plus souvent, on observe directement une précipitation du polymère lorsque le taux de modification augmente.

### **III.1.2.2. Propriétés physico-chimiques**

Les polysaccharides forment des solutions de viscosité plus ou moins élevée selon leur concentration dans l'eau, le degré d'enchevêtrement et la masse molaire des chaînes polymères. La viscosité de ces solutions aqueuses peut être plus ou moins modifiée la fixation de groupes hydrophobes sur le squelette polysaccharide, en raison de la mise en place d'interactions hydrophobes intra- et inter-moléculaire. En solution diluée, les chaînes macromoléculaires de ces polymères amphiphiles sont éloignées les unes des autres et en général des interactions hydrophobes intrachânes se mettent majoritairement en place d'où une diminution de la viscosité. En régime semi-dilué, il existe une concentration en polymère

à partir de laquelle les chaînes macromoléculaires sont suffisamment proches les unes des autres pour favoriser la formation des interactions interchaîne. Ainsi la viscosité du milieu augmente par rapport à celle du polymère précurseur à la même concentration. Ce phénomène s'intensifie très rapidement avec la concentration, jusqu'à la formation d'un réseau tridimensionnel dans lequel toutes les chaînes de polymère sont reliées entre elles.

La nature chimique des groupements hydrophobes immobilisés et leur taux de fixation influencent également les propriétés physico-chimiques des polymères amphiphiles et donc leur aptitude à former des hydrogels.

A titre d'exemple, pour des concentrations en polymère comprises entre 7 et 10 g/L et pour des taux de fixation en chaînes alkyles -greffées *via* des liaisons ester- compris entre 13% et 16% pour les dérivés d'alginate en C<sub>12</sub>, ou 3% et 6% pour les dérivés d'alginate en C<sub>18</sub>, les dérivés amphiphiles forment des gels forts en milieu aqueux et sont rhéofluidifiants [Rastello, 2004].

Illustrant ces propriétés associatives en solution, Bu et Coll. [Bu, 2006] montrent également la possibilité de former des gels physiques avec un alginate hydrophobisé par des chaînes alkyles en C<sub>8</sub> *via* des liaisons amide, pour un taux de fixation en chaînes alkyles de l'ordre 31% et à des concentrations évoluant de 10g/L à 20g/L dans l'eau.

De même, les propriétés rhéologiques du chitosane hydrophobisé [Desbrieres, 2004], peuvent ainsi être modulées en fonction de la longueur de la chaîne, du taux de modification, de la concentration et de la température, voire du pH dans certains cas de modification. Ainsi, le chitosane modifié par greffage de polylactide et de polyglycolide donne lieu à la formation d'interactions hydrophobes dans l'eau par l'intermédiaire de ces chaînes latérales polyesters. [Qu, 2000]. Un gonflement réversible fonction du pH des matériaux est observé si la longueur de ces chaînes ou le taux de substitution sont correctement contrôlés. Au pH le plus bas, les groupements amine sur le squelette polysaccharidique se protonent, provoquant une répulsion entre les charges du polysaccharide et un gonflement maximal du gel est observé. Le taux de gonflement sous la forme protonée dépend également des teneurs en polyglycolide / polylactide.

Les propriétés rhéologiques des polymères modifiés par greffage des chaînes alkyle, dépendent également de la répartition des chaînes greffées, répartition statistique ou répartition par blocs. Par exemple, Volpert dans le cadre d'une étude sur les polymères

d'acrylamide, synthétisé par copolymérisation radicalaire d'acrylamide et d'acrylamide hydrophobisé, conclue à une augmentation des interactions hydrophobes, lorsque que le greffage se fait par blocs en comparaison à un greffage statistique, toutes autres conditions identiques [Volpert, 1996]. De plus, une augmentation de la longueur des blocs accroît la densité des microdomaines hydrophobes formés, ce qui augmente la force des zones de jonction et qui par conséquent conduit à une augmentation marquée de la viscosité.

### **III.1.3 Hydrogels et température**

D'une manière générale, les gels thermoréversibles sont des gels dont les propriétés en solution varient avec la température. Ces gels sont qualifiés de thermosensibles lorsque la transition sol-gel se passe sous l'influence d'une élévation de la température.

De nombreuses solutions aqueuses de polymères naturels forment une phase gélifiée quand la température diminue et se solubilisent au chauffage. C'est le cas de la gélatine (protéine préparée par hydrolyse partielle du collagène) et de polysaccharides tels que l'agarose, le carrhagénane et le gellane.

Par exemple, l'agarose est un polysaccharide qui possède des propriétés gélifiantes. Lorsque la température est supérieure à 40°C, Des chaînes sont désordonnées. Pour des températures inférieures à 40°C, les chaînes s'ordonnent, forment des hélices qui s'agrègent par la suite [Aymard, 2001].

A l'inverse, d'autres polymères, deviennent thermosensibles et conduisent à la formation de gels quand la température augmente.

Dans un polymère thermosensible, les substituants ont une hydrophobie modérée, contrôlée par la température. Ils sont tels que la macromolécule conserve une certaine hydrophilie pour empêcher la précipitation du système et restent relativement hydratés à des T° inférieures à la T° critique. Lorsque la T° augmente et passe au dessus de la T° critique, cette hydratation est en partie perdue et les interactions hydrophobes se mettent en place. Il est également possible d'optimiser ce comportement thermosensible par ajout de sels ou de solvants.

La synthèse de polymères thermosensibles a principalement été optimisée en prenant comme référence le comportement physico-chimique en solution des polymères de la famille de la cellulose et du poly(N-isopropylacrylamide).

Ces polymères suscitent un vif intérêt, particulièrement dans le domaine médical, pour la libération contrôlée de principes actifs ou encore la formation de gels *in situ* après injection au niveau de cavités lésionnelles.

Les dérivés de la cellulose utilisés pour la préparation d'hydrogels sont des éthers ou des esters tels que la méthylcellulose, la carboxyméthylcellulose, l'acétate de cellulose ou l'hydroxypropylméthylcellulose. Les propriétés du polymère dépendent à la fois du taux de substitution et de la nature des substituants. Un grand nombre de ces dérivés ont la particularité de former des gels thermosensibles.

Les solutions de méthylcellulose forment des gels opaques entre 40°C et 50°C [Sarkar, 1979], [Heymann, 1935]. L'utilisation d'une solution de NaCl diminue la température de transition des solutions de méthylcellulose à 32-34°C.

Autre exemple de systèmes thermosensibles, l'association du chitosane avec du phosphate de glycérol permet la formation d'un hydrogel présentant une température de transition sol-gel voisine de 37°C [Molinari, 2002]. En effet pour un pH voisin de 7,2, les solutions de chitosane deviennent thermosensibles par addition de sels de polyol. Ainsi, les solutions de chitosane restent liquides en dessous de la température ambiante en présence de phosphate de glycérol et forment un gel lorsque la température augmente.

Un dernier exemple concerne l'utilisation du Poly(N-isopropylacrylamide), (PNIPAAm) en association avec des polysaccharides. Le PNIPAAm est un polymère connu pour avoir des propriétés fonction de la température (LCST proche de 32°C). Certains auteurs ont associé ce polymère à de l'alginate non réticulé ou réticulé pour obtenir la formation d'un réseau semi-interpénétré ou interpénétré, lui même sensible aux modifications de température [Sperling, 1981], [Prabaharan, 2006], [Akiyoshi, 2000].

### **III.2. Les gels chimiques**

Les hydrogels chimiques à base de polysaccharides sont généralement obtenus par polymérisation de macromonomères, préparés par greffage chimique d'un monomère sur le

squelette polysaccharidique, ou après réticulation à l'aide de réactifs difonctionnels. Ces gels chimiques sont des réseaux réticulés de manière covalente. Ils ne se dissolvent ni dans l'eau, ni dans les solvants organiques, à moins que les liaisons chimiques ne soient rompues. Seul leur taux de gonflement peut varier en fonction du milieu dans lequel ils se trouvent.

### III.2.1 Réactions entre groupements fonctionnels

La réticulation chimique est utilisée pour obtenir des gels stables à la dilution ou aux variations de pH, de T° ou de force ionique.

Ainsi, la réticulation chimique permet par exemple d'accroître la stabilité des gels d'alginate. L'utilisation de gels chimiques d'alginate permet de conserver les propriétés mécaniques contrairement aux gels réticulés ioniquement qui perdent plus de 60% de leur force mécanique initiale après 15h d'incubation en milieu physiologique. Lee et Coll. ont réticulé l'alginate avec des diamino poly(éthylène glycol), une dihydrazine d'acide adipique ou encore un ester méthylique de L-Lysine. En rhéologie, ces auteurs ont ainsi mis en évidence que les propriétés mécaniques ainsi que le taux de gonflement peuvent être contrôlés indépendamment les uns des autres, en fonction de la longueur de la chaîne de l'agent réticulant et du degré de réticulation [Lee, 2000].

Un autre exemple concerne la réticulation de l'alginate de calcium avec l'épichlorhydrine. Le calcium peut ensuite être éliminé à l'aide d'un agent séquestrant tel que l'EDTA [Moe, 1991].

Des gels chimiques d'alginate peuvent également être préparés par réticulation de l'alginate de sodium en présence de glutaraldéhyde dans le méthanol [Kulkarni, 2000a].

Bu et Coll. ont développé une méthode de réticulation, assez complexe, basée sur la réaction de condensation de Ugi [Bu, 2004]. Ce mécanisme est présenté figure I-15a et I-15b. L'étape déterminante pour cette réaction est sans aucun doute liée à la propriété unique des isonitriles à subir une  $\alpha$ -addition. Au cours de cette réaction, l'atome de carbone de l'isonitrile évolue d'une configuration divalente à une configuration tétravalente (imidate) en formant 2 liaisons covalentes nouvelles. Cette synthèse fait intervenir un aldéhyde, une diamine, l'alginate et un isonitrile. Ce procédé peu employé a notamment été utilisé pour la synthèse d'un hydrogel d'alginate permettant l'immobilisation d'enzymes.

Les hydrogels physiques de chitosane sont relativement instables en milieu acide (milieu gastrique). La réticulation chimique permet de résoudre ce problème en augmentant la stabilité et en prévenant la dissolution des hydrogels de chitosane. Comme tous les autres polysaccharides, le chitosane peut être réticulé de manière covalente avec le glutaraldéhyde [Denkbas, 2002], [Mi, 2000b]. Le glutaraldéhyde est le dialdéhyde le plus souvent employé pour réticuler les groupes amines car il forme des liaisons résistantes à des pH et des températures extrêmes, en nombre d'autant plus important que la concentration en agent réticulant et le temps de réticulation augmentent [Berthold, 1996]. De plus, il semblerait que la biocompatibilité des hydrogels ne soit pas altérée par la réticulation chimique si le réactif et les sous-produits de réaction sont correctement éliminés. En effet, le problème majeur du glutaraldéhyde est sa toxicité [Ballantyne, 2001].

La réticulation chimique permet de moduler la porosité des hydrogels. Ainsi, Genta a pu contrôler la libération du kétoprofen en diminuant la porosité de l'hydrogel de chitosane préparé par réticulation chimique. Un rapport kétoprofen/chitosane et une concentration en glutaraldéhyde adéquats doivent être utilisés pour obtenir la vitesse de libération désirée [Genta, 1997a].

Il est également possible de préparer des hydrogels de hyaluronate en faisant réagir en milieu aqueux des hydrazides difonctionnels sur les groupements carboxylate du polysaccharide, en présence de carbodiimide [Prestwich, 1998] (figure I-16).

Francesco [Francesco, 1994] et Gamini [Gamini, 2002] ont utilisé le 2-chloro-1-méthylpyridinium iodure (CMPI) pour réticuler le hyaluronate. En effet, le CMPI permet d'activer les fonctions carboxylate du polysaccharide. Les polymères obtenus appartiennent à la famille des ACP, « auto-cross-linked polysaccharides », c'est-à-dire qu'aucune fonction chimique n'est introduite au niveau des ponts de réticulation. Il se forme ainsi un réseau tridimensionnel de chaînes de hyaluronate réticulées chimiquement entre elles (voir chapitre II, figure II-11b). Ces hydrogels sont essentiellement utilisés pour la préparation de vecteurs de principes actifs mais aussi comme matériau de comblement [Hou, 2005].

### III.2.2 Polymérisation de macromonomères

Les gels chimiques de polysaccharides peuvent être obtenus par polymérisation ou photopolymérisation de macromonomères, portant des groupements (photo)polymérisables par voie radicalaire.

A titre d'exemple, des hydrogels à base de dextrane ont été obtenus par polymérisation radicalaire de dérivés du dextrane [Cadée, 2000]. Ces dérivés sont préparés par greffage de monomères méthacrylate sur le squelette du polymère. De très nombreux autres hydrogels à base de polysaccharides ont été obtenus en suivant des schémas réactionnels comparables.

Dans le cadre d'applications biomédicales, l'avantage de la photopolymérisation par irradiation UV-visible présente l'avantage de pouvoir injecter le polymère en solution au niveau de la lésion puis de le réticuler *in situ* en utilisant la lumière visible ou ultraviolette dans un second temps. Elle permet de faire de la polymérisation radicalaire d'une manière rapide dans des conditions ambiantes ou physiologiques.

Ainsi, le hyaluronate et l'alginate substitués par des groupements méthacrylate (à partir d'anhydride méthacrylique) forment des hydrogels après photopolymérisation ( $\lambda=514$  nm, pendant 30 secondes). Dans les travaux de Smeds et Coll., l'amorceur est un mélange d'éosine Y et de triéthanolamine dans de la 1-vinylpyrrolidone. Cette étude montre la possibilité de formation d'hydrogels *in situ* [Smeds, 2001].

Des travaux sur l'alginate doublement substitué, d'une part par des groupements méthacrylate et d'autre part par des chaînes alkyle, ont été effectués au laboratoire, dans l'optique de préparer des biomatériaux de comblement pour la réparation du cartilage [Amargier-Huin, 2005]. L'objectif visé était d'obtenir un gel non réversible en milieu aqueux mais présentant des propriétés rhéofluidifiantes suffisantes pour permettre son injection sous forme liquide lors de l'application d'une contrainte sur la seringue. La capacité de ces produits à former des hydrogels réticulés chimiquement, sous l'action de la lumière a été montrée. Cependant, il a également été montré qu'il n'y avait pas obligatoirement coexistence des interactions hydrophobes et de la réticulation chimique. En effet, les résultats ont mis en évidence le fait qu'un dérivé réticulé chimiquement et un dérivé doublement réticulé

présentaient en rhéologie des valeurs du module élastique et du module visqueux du même ordre de grandeur.

#### IV. Les hydrogels à base de protéines et de polypeptides

Des hydrogels, utilisés pour l'ingénierie tissulaire, ont également été préparés à partir de polymères naturels tels que les protéines et les polypeptides.

Il semblerait que la porosité des gels de collagène soit un paramètre très favorable à la prolifération cellulaire et à la synthèse des protéoglycanes. D'après Kawamura et Coll., ceci permet d'obtenir rapidement (2 semaines) un matériau, d'une part, suffisamment rigide pour être implanté et, d'autre part, conduisant *in vivo* à un tissu de réparation de structure proche de celle du cartilage [Kawamura, 1998]. L'incorporation de chondrocytes ou de facteurs de croissance dans ces gels améliore les propriétés du néocartilage formé.

La stabilité mécanique des hydrogels de collagène peut être renforcée par réticulation chimique (glutaraldéhyde, formaldéhyde, carbodiimide, diphenylphosphorylazide) [Lee C.R, 2001], [Park, 2002a], [Chevallay, 2000], par des traitements physiques (irradiation UV, lyophilisation, chauffage) [Lee C.R., 2001], [Schoof, 2001] et également en mélangeant le collagène avec d'autres polymères (hyaluronate, PLA, PGA, copolymères PLA-PGA, chitosane, POE) [Lee CR, 2001],[Park, 2002a], [Tan, 2001], [Chen, 2001, 2003] [Huang, 2001].

Néanmoins, le collagène, dérivé protéique d'origine animale, peut provoquer des réactions immunologiques dans l'organisme [Bruckner, 1994].

Un autre exemple est celui des gels de fibrine. La préparation de gels de fibrine peut être réalisée à partir de fibrinogène en présence de thrombine et de calcium, de façon industrielle (Biocol\*, LFB, France) ou à partir de plasma. Cependant, la caractéristique importante de la fibrine est une instabilité associée à une solubilité croissante *in vitro* en raison d'une réaction de fibrinolyse. Ceci peut donc représenter un problème pour des applications dans lesquelles ce matériau jouerait le rôle d'un matériau de comblement [Fussenegger, 2006]. Des travaux sont actuellement en cours pour tenter d'optimiser la composition de la fibrine en jouant sur la concentration de fibrinogène, la concentration de thrombine, et la force ionique du milieu,

dans l'objectif d'obtenir des gels plus stables. Des essais dans le domaine du cartilage sont en cours [Eyrich, 2007].

Certains peptides sont capables de s'auto-assembler en hydrogels stables à basse concentration en peptides (0,1%-1%) dans des conditions en sel et de pH physiologiques. Ces peptides sont caractérisés par des séquences alternativement hydrophiles et hydrophobes. Ils forment des feuilletts  $\beta$  quand ils sont solubilisés dans l'eau. Ces feuilletts  $\beta$  s'assemblent en réseau en présence de sel pour former des hydrogels [Kisiday, 2002].

Ces hydrogels ont été utilisés pour la réparation du cartilage. Il a été montré que dans ces hydrogels, les chondrocytes restent différenciés et conservent leur fonctionnalité.

La synthèse de polypeptides issus du génie génétique permet également d'obtenir des séquences variées de polypeptides avec des propriétés bien définies (élasticité, dégradabilité, interactions cellulaires) [O'Brien, 1993]. L'introduction de certaines séquences d'acides aminés a permis, soit de former des hydrogels sensibles au pH et à la température (polypeptides imitant la soie, séquence Glu-Ala) [Petka, 1998], soit de former des matrices extracellulaires artificielles (polypeptides imitant l'élastine, séquence Gly-Val-Pro-Gly) [McMillan, 2000].

Ces hydrogels trouvent de nombreuses applications, notamment dans le domaine de la croissance cellulaire [Holmes, 2000] et offrent de réels espoirs dans le domaine des thérapies cellulaires [Langer, 1999].

## **V. La place des alginates dans l'ingénierie tissulaire**

L'ingénierie tissulaire peut se définir comme l'ensemble des techniques et des méthodes s'inspirant des principes de l'ingénierie et des sciences de la vie pour développer des substituts biologiques pouvant restaurer, maintenir ou améliorer les fonctions des tissus. La recherche dans ce domaine utilise les connaissances de domaines variés, tels que la culture de cellules, les polymères et les sciences de la vie.

Ce paragraphe a pour objectif d'établir un bilan sur le potentiel d'utilisation des alginates dans le domaine biomédical et en particulier dans le domaine de l'ingénierie tissulaire. Dans un premier temps, nous nous intéresserons à la biocompatibilité de l'alginate puis dans un

second temps, nous décrivons quelques unes des applications potentielles de ce polymère en tant que matériau de comblement, dans lequel on peut envisager l'incorporation de cellules ou de principes actifs.

### **V.1. Alginate et Biocompatibilité**

Le terme « biocompatible » signifie d'une part que le matériau n'est pas à l'origine de phénomènes locaux ou systémiques néfastes pour la santé du receveur et d'autre part que les tissus receveurs et les liquides interstitiels ne sont pas susceptibles d'altérer le matériau (sauf lorsque cela est souhaité) au détriment de ses propriétés mécaniques ou de ses qualités intrinsèques, ou encore de générer des produits de dégradation ou de corrosion toxiques. Vert résume cette définition ainsi : « Un polymère biocompatible se définit comme un système compatible avec les systèmes vivants » [Vert, 2000].

D'une manière générale, la biocompatibilité d'un système polymère ne se résume pas à la biocompatibilité du polymère parent. Le procédé permettant l'obtention du système utilisable est aussi un facteur à prendre en compte. Nous avons vu dans les paragraphes précédents que les méthodes utilisées pour former les hydrogels peuvent être de différentes natures: photopolymérisation [Kim, 1999], réticulation enzymatique [Crescenzi, 2002], réticulation ionique [Martinsen, 1989], réticulation par interactions hydrophobes résultant d'un greffage de chaînes alkyles ou réticulation chimique par le glutaraldéhyde, les polyépoxydes ou les isocyanates [Shalaby, 1994].

Dans ces procédés, on utilise fréquemment des agents chimiques, comme par exemple les agents de réticulation. Mais la toxicité de l'agent réticulant est parfois un obstacle à l'utilisation de ces hydrogels dans l'organisme. A titre d'exemple, le glutaraldéhyde et les polyépoxydes sont reconnus pour être toxiques [Kuijpers, 2000]. D'autres agents réticulants comme les carbodiimides sont également toxiques. S'ils sont mal éliminés, ces différents agents de réticulation peuvent avoir des effets désastreux sur l'organisme, même à très faible concentration [Speer, 1980].

De manière plus inattendue, les hydrogels d'alginate, réticulés physiquement par pontage ionique, avec du  $\text{Ca}^{2+}$ , peuvent avoir des effets cytotoxiques autant que les hydrogels obtenus

par réticulation chimique [Lee K.Y., 2001]. La présence d'ions calcium peut en effet perturber l'équilibre ionique en diffusant et contrarier certaines réactions biologiques. Sank et Coll. [Sank, 1989] ont montré qu'une concentration excessive en calcium *in vitro* inhibe la croissance cellulaire. De même, Rosdy [Rosdy, 1990] a montré que des pansements commerciaux d'alginate de calcium présentaient par contact direct une certaine cytotoxicité pour les fibroblastes ainsi que pour certaines cellules épidermiques. Ces pansements sont toutefois largement utilisés pour le traitement des plaies en favorisant la coagulation.

Il a également été démontré que l'administration d'alginate sous différentes formes se heurte souvent aux réactions du système immunitaire. Le TNF (Tumor Necrosis Factor) et l'interleukine 1 sont deux cytokines à activité pro-inflammatoire, synthétisées par les cellules du système immunitaire. Selon Draget, l'induction de ces deux cytokines dépend du contenu en mannuronate dans l'échantillon d'alginate. Les fragments riches en mannuronate, non impliqués dans la formation du gel, déclencheraient la réponse immunitaire. Ainsi, il semblerait que les alginates polymannuroniques stimulent la production de certaines cytokines (IL-1, IL-6, TNF), alors que les alginates riches en unités guluronate pourraient inhiber cette stimulation [Draget, 1997].

D'autres travaux sont néanmoins plus réservés et tendent à prouver que les contaminations externes sont la cause de la réponse immunitaire, plus que le taux en mannuronate de l'échantillon lui-même [Klöck, 1997]. Orive et Coll. [Orive, 2002] ont étudié la biocompatibilité de capsules d'alginate-Poly(L-Lysine)-alginate, capsules trouvant notamment des applications dans l'encapsulation de nucléotides [Gonzalez, 2002]. Ils se sont attachés à démontrer que concernant la réponse du système immunitaire, la pureté de l'alginate est un critère plus important à prendre en compte que la composition de l'alginate lui-même. En effet, selon ces auteurs, l'alginate brut contient des polyphénols toxiques pour les cellules, et des endotoxines, stimulateurs du système immunitaire [Skjak-Break, 1989]. Ces alginates doivent donc subir différentes étapes de purification et de stérilisation [Klöck, 1994], dont une filtration stérilisante.

Aujourd'hui, pour contrer les risques de rejet par le système immunitaire, des alginates ultrapurs, exempts de polyphénols et d'endotoxines, sont commercialisés, avec un rapport mannuronate/guluronate (M/G) toujours spécifié.

Néanmoins, malgré toutes les précautions qui peuvent être prises lors de la préparation d'hydrogels d'alginate, il faut rester prudent avec les hypothèses concernant la biocompatibilité. Cette dernière dépend également d'autres facteurs liés au receveur et au matériau. L'espèce, l'héritage génétique, le site d'implantation et le micro-environnement sont des paramètres intrinsèques au receveur, non modifiables par le chimiste et le biologiste et qui peuvent influencer la réponse immunitaire. Concernant le matériau, d'autres paramètres interviennent dans la biocompatibilité, tels que la porosité, le temps de contact avec les tissus et le processus de dégradation [Fournier, 2003], [Laurencin, 1994]. La certitude de la biocompatibilité d'un dérivé de l'alginate ne saurait donc se passer d'expériences *in vitro* et *in vivo*, dans des conditions proches de celles employées pour les applications envisagées.

## **V.2. Applications**

### **V.2.1 Matériau de comblement**

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

Les hydrogels d'alginate ont une place de choix en ingénierie tissulaire en tant que matériau de comblement temporaire puisqu'ils peuvent être obtenus simplement par gélification du polysaccharide en présence d'ions calcium.

Les hydrogels d'alginate de calcium ont été très largement étudiés dans le domaine de l'ingénierie du cartilage. Chang et son équipe ont enrichi un hydrogel d'alginate de calcium avec des chondrocytes et ont injecté cet hydrogel au niveau de la lésion. Les résultats des tests *in vivo* montrent que les chondrocytes sont viables et produisent des protéines après quelques semaines [Chang, 2001], [Mierisch, 2003], [Park, 2000], [Fragonas, 2000]. Ainsi, la synthèse d'une nouvelle matrice cartilagineuse est possible.

L'alginate de calcium peut également être associé au hyaluronate, incapable de former des hydrogels, pour former une matrice hybride utilisable comme matériau de comblement

[Pelletier, 2001], [Gigant-Huselstein, 2003]. La nouvelle matrice bénéficiera des avantages biologiques liés à la présence du hyaluronate.

Malheureusement, il ne suffit pas d'implanter un biomatériau pour obtenir la réponse souhaitée. Afin d'obtenir des réponses cellulaires spécifiques comme l'adhésion, la prolifération, ou encore la migration et de diriger la formation du nouveau tissu par identification biomoléculaire, le développement des biomatériaux s'est orienté vers la conception de matériaux biomimétiques. Une identification biomoléculaire peut être obtenue en modifiant la chimie du matériau implanté, par exemple en greffant sur le polysaccharide des séquences peptidiques adéquates.

Certains polysaccharides doivent ainsi être modifiés pour se rapprocher de la matrice extracellulaire et permettre notamment une bonne adhérence cellulaire [West, 1997], [Drury, 2003]. Le peptide le plus usuellement greffé est un amino-acide de séquence Arg-Gly-Asp appelé plus communément RGD [Cui, 2006]. Rowley et Coll. ont greffé des peptides (GRGDY) sur l'alginate par l'intermédiaire d'un carbodiimide, l'EDC. Ils concluent à une bonne adhérence cellulaire vis-à-vis de myoblastes squelettiques de types C2C12 [Rowley, 1999], [Loeb sack, 2001].

On peut également greffer des protéines de la matrice extra cellulaire telle que la laminine ou la fibronectine [West, 1997].

Certains de ces nouveaux biomatériaux sont actuellement testés dans le domaine des systèmes nerveux et cardiovasculaire, et apparaissent comme très prometteurs [Shin, 2003].

### **V.2.2 Encapsulation dans les hydrogels d'alginate**

Depuis plusieurs dizaines d'années, l'utilisation d'alginate pour l'encapsulation est envisagée dans de nombreuses applications : encapsulation de cellules modifiées ou non, d'oligonucléotides [Aynié, 1997], de principes actifs dont on veut contrôler la libération. En effet, les conditions de gélification des alginates (gélification ionotropique) sont très douces et il n'est pas nécessaire d'avoir recours à des solvants organiques ou à des hautes températures.

Toutefois, l'encapsulation durable de principes actifs moléculaires des petites tailles dans les gels d'alginate est difficile en raison de la structure relativement poreuse du matériau qui

conduit à une libération rapide du principe actif encapsulé. A l'inverse, les alginates sont souvent utilisés pour l'encapsulation de macromolécules (protéine par exemple) et de cellules.

### **V.2.2.1. Encapsulation de cellules**

La transplantation de cellules encapsulées permet d'envisager le traitement de nombreuses déficiences tissulaires (enzymatiques, hormonales ou métaboliques) sans avoir recours au greffage d'organe nécessitant un traitement immunosuppresseur, le but étant de minimiser les risques de rejet.

Le principe consiste à protéger les cellules étrangères contre le système immunitaire par une membrane artificielle (capsules). Malgré la simplicité du concept, les progrès dans le domaine de l'immuno-isolation se sont souvent heurtés à des problèmes de biocompatibilité des systèmes injectés [De Vos, 2006, 2002]. Les risques de non biocompatibilité sont en effet multiples: activation non spécifique du système immunitaire, conséquence de l'intervention chirurgicale nécessaire à l'implantation, réponse du système immunitaire contre la capsule, réponse des cellules enveloppées et réponse due à la vascularisation faisant suite à l'implantation des capsules.

Néanmoins, les exemples d'encapsulation de cellules dans l'alginate pour de telles applications sont relativement nombreux.

Ainsi, l'encapsulation de cellules recombinantes a été envisagée pour le traitement de maladies endocrines, métaboliques et génétiques. La cause de ces maladies est très souvent l'absence ou le dysfonctionnement d'un gène. Il s'agit alors d'apporter à la cellule le gène déficient, mais on se heurte alors jusqu'ici à des phénomènes de rejet par le système immunitaire. Ainsi, il a été envisagé de réintroduire des cellules génétiquement modifiées (après une manipulation *in vitro*) chez le donneur lui-même. De telles cellules ont été par exemple encapsulées dans des membranes d'alginate-poly-(L-lysine). Cela a permis d'éviter les processus de rejet et d'assurer une libération entretenue de la protéine manquante après transplantation [Sun, 1993].

De nombreux travaux sont développés dans le cadre des traitements du diabète, destinés à l'administration contrôlée d'insuline aux diabétiques [De Vos, 2006, 2002], et notamment des

études cliniques [Calafiore, 2006]. Des recherches prometteuses concernent l'isolation et la purification de cellules pancréatiques endocrines et leur encapsulation dans des systèmes alginate-poly-(L-lysine), assurant la diffusion de l'insuline par le biais d'une membrane semi-perméable qui permet la diffusion des nutriments mais non le passage des cellules du système immunitaire [Bohman, 2007], [Elliott, 2007].

Certaines stratégies ont permis d'améliorer la biocompatibilité de l'alginate. Ainsi, les expériences menées par Hardikar et Coll. [Hardikar, 1999], relatives aux traitements du diabète sur des souris, chez qui on a transplanté des îlots de Langerhans encapsulés dans des microbilles constituées d'une matrice alginate-chitosane, ont montré l'intérêt d'une telle association alginate-chitosane pour limiter le rejet par le système immunitaire. Il semblerait que le chitosane ait un effet inhibiteur sur la croissance des fibroblastes à la surface des particules, laquelle est considérée comme ayant des effets négatifs car la diffusion de l'oxygène et des nutriments dans la capsule est dans ce cas réduite, ce qui conduit à une nécrose du tissu enveloppé.

Pour leur part, Emerich et Coll. ont montré la possibilité d'encapsuler des cellules du plexus choroïde qui régule une partie de la production et la composition du liquide céphalorachidien, de façon durable dans des billes d'alginate pour permettre la libération de facteurs neurotrophiques, dans le cadre de la maladie de Huntington, affection cérébrale héréditaire [Emerich, 2006].

#### **V.2.2.2. Encapsulation de principes actifs**

Les exemples de la littérature concernant les systèmes permettant l'encapsulation de molécules dans des hydrogels d'alginate sont très nombreux. Citons par exemple l'administration orale de vitamines hydrosolubles [Murata, 2002], de nicardipine [Takka, 1998], de protéines [Vandenberg, 2001].

Au sein de notre laboratoire, des travaux réalisés par Rastello [Rastello, 2002] ont montré qu'il était possible d'encapsuler durablement et de manière quantitative des protéines (BSA et hémoglobine) dans les particules d'alginate modifié par fixation de chaînons hydrophobes

(C<sub>12</sub> et C<sub>18</sub>) sur le squelette alginique. Les protéines sont piégées de manière quasiment irréversible par effet hydrophobe dans la particule d'alginate modifié, ce qui n'est pas le cas dans les gels d'alginate de calcium. Un tel système peut présenter un intérêt dans le cas où une encapsulation durable est souhaitable.

Les microsphères d'alginate peuvent être également utilisées pour la vaccination orale. Différents antigènes comme l'ovalbumine ont été encapsulés et ainsi protégés des acides et enzymes de l'estomac une fois les vecteurs ingérés. De plus, ces microsphères présentent l'avantage d'être capturées par les plaques de Peyer où les réponses immunitaires sont induites [Bowersock, 1998a; Bowersock, 1998b]. L'alginate présente en effet une propriété de bioadhésion au niveau des muqueuses, ce qui est un avantage pour la libération de médicaments.

Dans le cadre de nos travaux, une application particulièrement intéressante concerne l'encapsulation de NGF (Nerve growth factor) dans des particules d'alginate [Maysinger, 1992]. Le NGF appartient à la famille des facteurs neurotrophiques. Ces substances ont un effet sur la réorganisation des circuits neuronaux. Le NGF stimule les neurones en agissant sur la croissance des dendrites et des synapses, ce qui améliore la survie de ces neurones. Maysinger et Coll. étudient les effets de NGF encapsulés dans un modèle de dégénération cholinergique central. Leurs résultats ont souligné les possibilités thérapeutiques expérimentales de ces systèmes de libération pour l'administration des facteurs neurotrophiques dans le SNC.

L'alginate est également utilisé depuis peu dans certaines pathologies de l'encéphale, notamment contre certaines tumeurs du Système Nerveux Central [Kuijlen, 2006]. Dans ces pathologies, les patients ont des taux de survie faible malgré la chirurgie et la radiothérapie. La méthode de micro-encapsulation peut alors être employée pour libérer en continu un certain nombre d'agents cytotoxiques à proximité de la tumeur. Les premiers résultats d'implantation de capsules vides d'alginate ont montré une biocompatibilité des capsules avec le tissu.

## **VI. La régénération dans le système nerveux central**

### **VI.1. Limites concernant la régénération de voies nerveuses lésées dans le SNC**

#### **VI.1.1 Notions biologiques**

Le système nerveux central (SNC) a un rôle de réception, de traitement, d'intégration et d'émission de messages nerveux [Duconseille, 1997] [Kollb, 2002].

Il coordonne les mouvements musculaires, contrôle le fonctionnement des organes, véhicule les informations sensorielles et motrices vers les effecteurs, et, chez les animaux dotés d'un cerveau, est impliqué dans les processus cognitifs et émotionnels. Chez les vertébrés, on distingue traditionnellement le système nerveux central constitué de l'encéphale et de la moelle épinière, du système nerveux périphérique constitué pour sa part des nerfs crâniens sensori-moteurs, des nerfs rachidiens et du système entérique.

Le système nerveux central est composé de deux types de cellules : les cellules gliales et les cellules nerveuses appelées neurones. Ces derniers, spécialisés dans la transmission de l'information, possèdent deux types de prolongements : (i) les dendrites, qui recueillent l'information et l'acheminent vers le corps cellulaire; (ii) l'axone, généralement long et unique, qui conduit l'information du corps cellulaire vers d'autres neurones avec qui il fait des connexions spécialisées appelées synapses.

Les oligodendrocytes, les cellules microgliales et les astrocytes constituent l'ensemble du microenvironnement glial des neurones du SNC. Les astrocytes sont responsables du support mécanique et de la survie des neurones. Ils forment un réseau en trois dimensions dans lequel sont maintenus les neurones par le biais de molécules d'adhérence, les Ng-CAM. Ils favorisent la survie et le développement des neurones en leur fournissant des nutriments, des facteurs neurotrophiques..., participant également à l'homéostasie du milieu extracellulaire, notamment par leur capacité à réguler la concentration potassique et en intervenant dans le métabolisme et la recapture de certains neurotransmetteurs comme le GABA. Enfin, le réseau astrocytaire semble constituer un système de transmission non synaptique jouant un rôle majeur dans la modulation des activités neuronales. Le marqueur immunocytochimique le plus fréquemment utilisé pour détecter la présence d'astrocytes est la GFAP (glial fibrillary acidic protein).

Les oligodendrocytes synthétisent la gaine de myéline qui entoure les axones de nombreux neurones, processus qui accélère la conduction nerveuse. La microglie constitue quant à elle une ligne de défense immunitaire. Activée au cours de diverses atteintes du SNC, elle participe à la défense des tissus cérébraux et à la réaction inflammatoire.

## **VI.1.2 Problématique de la régénération**

Depuis qu'il a été démontré, contrairement à un dogme longtemps établi, que les neurones du système nerveux central (SNC) chez les Mammifères adultes possèdent des capacités intrinsèques de régénération, de nombreux axes de recherche se sont développés pour tenter d'apporter une solution au problème crucial de réparation neuronale impliquée dans les pathologies neurodégénératives ou les traumatismes lésionnels.

Jusqu'aux années 1970, en effet, il était établi qu'au terme du développement cérébral, la croissance neuritique et les processus de régénération devenaient impossibles. Ramón y Cajal, neurobiologiste espagnol ayant beaucoup travaillé sur le sujet, démontre au début du siècle dernier, que contrairement aux fibres nerveuses périphériques qui ont la capacité de repousser, les axones du SNC opèrent une « régénération abortive », caractérisée par un bourgeonnement limité du cône de croissance suivi d'une rétraction du neurite. En réalité, il est à présent certain que cette limitation n'est pas un caractère intrinsèque des neurones du SNC, mais provient d'un environnement non permissif, par exemple au niveau d'un site lésionnel. Ainsi, des études ont montré que l'implantation de greffons de nerf périphérique permet la croissance et la régénération de neurones centraux axotomisés [David, 1985]. En conséquence, la problématique de la restauration fonctionnelle du SNC se pose désormais en terme de détermination des conditions adéquates à fournir aux neurones pour leur régénération. Les processus post-lésionnels inhibiteurs sont de plusieurs types. D'une part, la formation rapide d'une cicatrice gliale constitue une barrière à la fois physique, s'opposant à la migration du cône de croissance, et chimique, inhibant l'élongation neuronale. Cette cicatrice gliale est caractérisée par une hyperplasie et une hypertrophie des astrocytes réactifs. D'autre part, la présence de molécules inhibitrices de la croissance neuritique a été mise en évidence au niveau de la myéline des oligodendrocytes. Contrairement à la myéline permissive synthétisée par les cellules de Schwann dans le système nerveux périphérique [Schwab, 2005], la myéline du SNC s'oppose aux processus de plasticité neuronale. Enfin, en

présence d'une cavité lésionnelle, la progression des cônes de croissance par adhésion au support environnemental est impossible. Il faut donc fournir un support physique aux neurones pour permettre la croissance et la progression des neurites en voie de régénération. C'est ce qui a conduit au développement et aux tests de différents matériaux de comblement ou pont de régénération.

## **VI.2. Approches expérimentales**

### **VI.2.1 Les ponts de régénération**

L'utilisation de matériaux comme pont de régénération, dans le but de soutenir la repousse neuronale en permettant aux fibres lésées de reconnecter leur structure cible, fait l'objet de nombreux travaux.

Plusieurs types de ponts ont été évalués, d'origine biologique (bloc de tissu fœtal, segment de nerf périphérique ...), ou de synthèse (chambre de régénération conçue à partir de techniques de tubulisation, avec les tubes polymères creux et tubes polymères pleins constitués d'une matrice de polymère supplémentée en cellules et/ou en facteurs neurotrophiques) [Friedman, 2002], [Gilbert, 2003], [Menei, 2005] et les hydrogels. Ce paragraphe s'attardera à présenter les avancées de la recherche dans le domaine des hydrogels. Il se terminera par l'établissement du cahier des charges d'un pont de régénération idéal tel que nous l'avons défini au regard des différents éléments rencontrés dans la littérature.

Les matrices à base de polymères jouent un rôle majeur dans les thérapies cellulaires et la production de biotissus. La capacité des neurones à croître au sein d'un tel environnement a été démontrée dans différentes études. Ainsi, des cellules souches neuronales encapsulées dans une matrice implantable de PLGA présentent des extensions et une migration hors de la matrice avec innervation du tissu hôte, les cellules hôtes innervant réciproquement les cellules contenues dans la matrice [Park, 2002b]. Des travaux récents ont montré que des précurseurs neuronaux encapsulés dans des matrices tridimensionnelles d'hydrogels bioéliminables de polyéthylène glycol (PEG, également appelé POE, poly (oxyde d'éthylène)) sont capables de produire leur propre environnement cellulaire pour assurer leur survie, leur prolifération et leur différenciation en neurones sensibles au neurotransmetteur GABA [Mahoney, 2006].

Des matrices injectables à base d'alginate modifié par fixation covalente de peptides [Dhoot, 2004], de fibrine, d'agarose, de collagène [Wang, 2006], de hyaluronate, ou d'hydrogels dérivés de peptides sont également en cours d'étude pour l'encapsulation de cellules neuronales.

Parmi les matériaux naturels utilisables figurent également l'alginate de sodium, l'acide hyaluronique, l'agarose et le collagène de type I.

Après avoir testé avec succès un alginate de sodium 1%, réticulé avec de l'éthylène diamine et du carbodiimide comme agent de couplage, dans des études de réparation du nerf sciatique chez le Rat, l'équipe de Suzuki a implanté ce matériau chez des rats ayant subi une section de la moelle épinière. Elle a pu montrer qu'il constitue un support de croissance pour les fibres nerveuses et permet la formation de projections fonctionnelles au travers et au-delà de la lésion ainsi que des connections synaptiques avec les neurones cibles [Suzuki, 1999a et b].

Une étude récente a par ailleurs démontré l'excellente biocompatibilité d'un copolymère d'acide hyaluronique et de poly-D-lysine permettant *in vitro* une bonne adhérence cellulaire, et présentant *in vivo* une parfaite intégration avec migration des astrocytes sans cicatrice gliale [Tian, 2005]. Au sein de la même équipe, un hyaluronate réticulé à l'EDC et modifié avec de la laminine a donné des résultats encourageants après implantation de l'hydrogel dans une cavité réalisée dans l'hémisphère droit (section coronale) [Hou, 2005]. Ces chercheurs ont montré une infiltration cellulaire, une diminution de la cicatrice gliale ainsi qu'une croissance de fibres nerveuses après 12 semaines.

D'autres stratégies basées sur des mélanges de polymères permettant d'optimiser les propriétés sont en cours d'étude. Citons les travaux de Zhang [Zhang, 2007] sur un hydrogel de hyaluronate et de gélatine, montrant une bonne biocompatibilité avec le tissu hôte et une migration cellulaire à l'intérieur du gel.

Des travaux récents [Jain, 2006] ont montré la possibilité d'utiliser des gels d'agarose thermo-réversibles après lésion de la moelle épinière. Ces gels présentent l'avantage de combler parfaitement la cavité puisqu'ils sont injectés sous forme liquide. Ils sont susceptibles d'être enrichis en facteurs neurotrophiques (tels que le BDNF) et de libérer graduellement ces molécules. Cependant, les auteurs rapportent l'absence de fibres nerveuses pénétrant dans ce réseau 3-D.

Le collagène de type I, composant majeur de la matrice extracellulaire dans lequel on a encapsulé des neurotrophines a également été l'objet de nombreuses recherches. Pour exemple, Houwelling et Coll. [Houweling, 1998] ont étudié l'influence de l'encapsulation de neurotrophine-3 (NT-3) dans un gel de collagène permettant un rétablissement fonctionnel partiel dans leur modèle d'étude.

Nous terminerons ce paragraphe par la présentation de Matrigel, un gel fabriqué par Becton Dickinson à partir de cellules sarcomateuses et contenant des protéines matricielles dont la laminine et le collagène IV, ainsi que des facteurs de croissance. Il existe également des implants à base de fibronectine [Ju, 2007] associée ou non à des facteurs de croissance neurotrophiques, des colles de fibrine et les PHA (Poly( $\alpha$ -hydroxy acide)).

Une large variété de polymères synthétiques a par ailleurs été évaluée [Novikova, 2003]. Des hydrogels partiellement biodégradables et bio-éliminables de PEG ont permis la libération de neurotrophines, favorisant une repousse neuritique [Piantino, 2006]. Ce PEG présente l'avantage d'être injecté à l'état liquide et d'être réticulé dans un second temps par photopolymérisation [West, 1997]. Ces gels ont permis d'obtenir une cinétique de libération modulable par la densité du réseau de réticulations, ce qui a conduit à la fabrication de microsphères d'hydrogel contenant de multiples neurotrophines, chacune ayant sa propre vitesse de libération [Burdick, 2006]. D'autres matériaux, non biodégradables, sont utilisés dans les travaux de recherche pour le traitement des lésions du SNC, comme certains polymères acryliques (PHPMA, PHEMA, PHEMA-co-MMA). Neurogel, fabriqué par la société canadienne Organogel, est un PHPMA réticulé qui, implanté au niveau de la moelle épinière chez le Rat, forme un pont vascularisé au travers duquel s'effectue la régénération des axones ascendants et descendants [Woerly, 2001]. L'équipe canadienne qui a mis au point ce gel a également consacré de nombreux travaux à la mise au point d'hydrogels à partir de PHEMA, PGMA, PHPMA imprégnés de collagène pour le traitement de lésions cérébrales [Woerly, 1990]. Sa collaboration avec des chercheurs du LN2C a conduit à l'élaboration d'un hydrogel de méthacrylamide (PHPMA) [Duconseille, 1997, 1999] servant de support de croissance pour les neurones sectionnés. L'implantation de PHPMA enrichi avec des groupements N-acétyl-glucosaminés dans une cavité lésionnelle cérébrale chez le Rat, réalisée au niveau des voies septo-hippocampiques dorsales, a montré une bonne intégration de l'hydrogel dans le tissu hôte après un an d'implantation, avec infiltration par des vaisseaux

sanguins, des astrocytes, et un réseau de laminine, fibronectine et neurofilaments. En combinant l'implantation du matériau à une greffe homotypique de cellules septales foetales, les déficits comportementaux et électrophysiologiques produits par la lésion ont été atténués. Les études morphologiques réalisées ont montré que la présence de l'hydrogel a permis aux fibres neuronales issues des cellules greffées de franchir la cavité lésionnelle et d'atteindre leur structure cible. Cependant, la synthèse de cet hydrogel implique l'utilisation de monomères toxiques, ne le rendant utilisable que sous forme polymérisée, en tant que gel préformé préalablement taillé aux dimensions de la cavité. De plus, il n'était pas envisageable d'encapsuler des cellules ou principes actifs pour optimiser ce matériau.

Des hydrogels de POE ont alors été testés au LN2C, synthétisés à partir d'un matériau de base moins toxique, pour une meilleure biocompatibilité. Utilisés en tant que support de culture cellulaire, ces hydrogels ont permis le développement d'extensions neuritiques dès 24 heures *in vitro*, les neurones étant capables de connecter leurs cellules cibles spécifiques [Naraghi, 1998]. Cependant, le développement cellulaire n'a été possible qu'à la surface de ces biomatériaux, aucune infiltration de l'hydrogel n'ayant pu être mise en évidence. Ainsi, le POE, utilisé en tant que gel préformé, semble constitué d'un réseau de mailles trop rigide pour permettre l'envahissement cellulaire.

En conclusion, nous pouvons dire que la recherche dans ce domaine est en plein essor, pour trouver les matériaux les mieux adaptés et développer les moyens de les optimiser au mieux.

## VI.2.2 L'action pharmacologique

De récentes découvertes ont permis de progresser dans l'identification des facteurs inhibiteurs de la régénération neuritique au niveau du SNC, en particulier les récepteurs et mécanismes de signalisation intracellulaire qui participent à ces effets. De nouvelles cibles thérapeutiques ont ainsi pu être envisagées pour contrecarrer l'effet de ces facteurs. Trois types de molécules inhibitrices ont été identifiées : la protéine membranaire Nogo, la MAG (myelin-associated glycoprotein) et OMgp (myelin-oligodendrocyte glycoprotein). Bien qu'elles ne possèdent pas de séquences communes, elles se lient avec une affinité similaire à un même récepteur NgR de Nogo, lié à la membrane. La cascade de signalisation conduit à l'activation des protéines GTPase de la famille Rho. Élément clé de la voie de signalisation

négative, Rho induit une rétraction des cônes de croissance et s'oppose à la régénération neuritique en agissant sur le cytosquelette d'actine, *via* l'activation de sa kinase effectrice, la Rho kinase ROCK. Des inhibiteurs spécifiques de Rho et ROCK sont en voie de développement, notamment le Y-27632, dont les effets *in vitro* sur la croissance neuronale ont été démontrés [Ramer, 2004]. D'autres travaux récents se sont focalisés sur un système à base de hyaluronate biodégradable permettant la libération d'un anticorps dirigé contre le récepteur NgR, avec des résultats *in vitro* encourageants [Tian, 2005].

Par ailleurs, la voie de l'AMPC semble capable de neutraliser les effets inhibiteurs des protéines de la myéline. L'AMPC présente des effets susceptibles de mimer celui des neurotrophines, jouant ainsi un rôle déterminant dans les mécanismes de plasticité et de régénération neuronale. Cette action de l'AMPC *via* sa protéine kinase A effectrice pourrait, dans un premier temps, avoir un effet direct sur le cytosquelette en inactivant Rho, et dans un second temps activer la transcription de l'Arginase I. Cette dernière est une enzyme clé de la synthèse des polyamines qui sont impliquées dans la croissance et le développement des neurones, et dont l'augmentation intracellulaire va s'opposer à l'action inhibitrice sur la régénération neuronale de la voie Rho. La figure I-17 illustre ces différents mécanismes.

L'administration combinée de putrescine et d'aminoguanidine représente une stratégie prometteuse. En effet, malgré des effets bénéfiques certains sur la régénération et la protection neuronale, une augmentation de la concentration en polyamines, notamment en putrescine, produit des effets cytotoxiques dus à des phénomènes oxydatifs. L'aminoguanidine, un inhibiteur de la polyamine oxydase, testé dans différents modèles de lésion cérébrale, participe à la réduction des processus dégénératifs et apoptotiques grâce à son action antioxydante [Moochhala, 2004]. L'aminoguanidine est par ailleurs un inhibiteur sélectif de la forme inductible de NOS (Nitric Oxide Synthase), enzyme impliquée dans les processus pathologiques, et qui, activée, peut produire des excès de monoxyde d'azote (NO) ayant une influence délétère sur la régénération neuronale. Ainsi, des effets toxiques, des dommages neuronaux, une inhibition de la réplication d'ADN et des phénomènes d'apoptose sont induits par de fortes concentrations de NO. L'association thérapeutique de la putrescine et de l'aminoguanidine permettant de bénéficier des effets positifs individuels de chaque principe actif, pourrait potentialiser ces effets. L'aminoguanidine est en effet susceptible d'atténuer les

effets toxiques des polyamines tandis que la putrescine pourrait contrebalancer une action délétère de l'aminoguanidine sur la neurogénèse. Cette bithérapie est actuellement en cours d'évaluation au LN2C. Les résultats sont prometteurs, le traitement pharmacologique, administré par voie intrapéritonéale, entraînant une nette atténuation des déficits sensorimoteurs et de l'hyperactivité locomotrice chez des rats ayant subi une lésion par aspiration de la voie fimbria-fornix, composante infracalleuse des voies septo-hippocampiques dorsales [Schimchowitsch, 2006], [Muller, 2007]. Sur le plan morphologique, le traitement a montré des effets neuroprotecteurs, attestés par le nombre accru de neurones exprimant la ChAT (Choline AcetylTransferase, enzyme de synthèse de l'acétylcholine) dans la région septale et la réduction des plages de nécrose dans le thalamus. L'optimisation du mode d'administration du traitement, la voie intrapéritonéale nécessaire au passage de la barrière hématoencéphalique, pourrait conduire à envisager l'encapsulation de ces molécules dans un hydrogel avant implantation. Ceci pourrait en effet permettre, grâce à une libération contrôlée *in situ*, d'optimiser les effets des molécules du fait de leur immédiate disponibilité. Les doses administrées en ip, de 10 mg/kg/jour pour la putrescine et 320 mg/kg/jour pour l'aminoguanidine, pourraient alors être réduites de façon significative.

### VI.2.3 Le cahier des charges d'un pont de régénération idéal

L'objectif est de concevoir un implant capable, d'une part, de combler la lésion en assumant les exigences mécaniques et, d'autre part, de servir de tuteur à la régénération tissulaire. Pour cela, un cahier des charges des biomatériaux de comblement peut être défini.

Le biomatériau idéal en tant que pont de régénération [Geller, 2002], [Duconseille, 1999] doit :

- combler la lésion pour remédier à la discontinuité du tissu.
- posséder des propriétés de résistance mécanique et de déformation se rapprochant le plus possible du tissu cérébral.
- garder ses propriétés mécaniques au cours du temps.

- être malléable, c'est-à-dire par exemple rhéofluidifiant, pour pouvoir être facilement implanté et s'adapter au mieux à la forme de la lésion.
- reprendre sa consistance initiale de gel très rapidement pour se maintenir dans la cavité.
- être stérilisable par des méthodes conventionnelles et être stable à la stérilisation.
- être éventuellement biodégradable, mais dans un laps de temps suffisamment long, de l'ordre d'une année, pour pouvoir jouer son rôle mécanique tant que le tissu de réparation n'est pas totalement reconstitué.
- être hydrophile et suffisamment poreux pour servir de support à un envahissement cellulaire, sa porosité devant alors être un compromis entre les exigences mécaniques et l'aptitude à induire la pénétration cellulaire.
- être biocompatible, non toxique, non immunogène et non carcinogène.
- si possible, posséder des propriétés vectrices, afin de permettre l'administration conjointe d'un traitement pharmacologique (aminoguanidine et putrescine).
- être compatible avec un enrichissement moléculaire et/ou cellulaire pour optimiser ses propriétés en tant que support de croissance et de développement cellulaire.
- résister à la désagrégation en milieu liquide, pour conserver ses propriétés mécaniques dans la cavité lésionnelle, remplie de liquide céphalo-rachidien constamment renouvelé.

Le matériau doit être évalué selon les critères énoncés dans ce cahier des charges, par des caractérisations physico-chimiques et mécaniques, des mesures de cytotoxicité et de biocompatibilité poussées *in vitro*, puis *in vivo*, et par des essais pharmacologiques *in vivo* chez l'animal, avant de pouvoir être testé comme approche thérapeutique chez l'humain.

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

## **VII. Conclusion**

Dans ce chapitre, nous avons examiné un certain nombre de polysaccharides, en nous attardant sur la préparation d'hydrogels et leurs utilisations dans le domaine biomédical. Cette liste n'est bien sûr pas exhaustive mais nous nous sommes limités aux polysaccharides les plus courants.

Au cours de ces dernières années, de nombreuses recherches ont été réalisées dans le domaine de l'ingénierie tissulaire, qui soulignent l'intérêt que peuvent avoir les hydrogels d'alginate pour des applications dans ce domaine.

Compte tenu de tous ces travaux, un alginate modifié, formant en solution un hydrogel stable, nous a semble être un bon candidat potentiel comme biomatériau pour la régénération des voies nerveuses lésées dans le SNC. Pour cela, on peut définir un cahier des charges, au regard des propriétés intrinsèques du polymère, de la problématique concernant la régénération et de l'avancée des traitements dans ce domaine, en y associant en particulier les traitements pharmaceutiques, développés par le Laboratoire de Neurosciences Comportementales et Cognitives, susceptibles de favoriser la survie cellulaire, la récupération post-traumatique et les processus de plasticité neuronale.

<b>I.</b>	<b>INTRODUCTION</b>	<b>.5</b>
<b>II.</b>	<b>LES POLYMERES NATURELS</b>	<b>.6</b>
II.1.	Les polysaccharides	6
II.2.	Les protéines	10
<b>III.</b>	<b>LES HYDROGELS A BASE DE POLYSACCHARIDES</b>	<b>.12</b>
<b>III.1.</b>	<b>Les gels physiques</b>	<b>13</b>
III.1.1	Hydrogels réticulés par interactions ioniques.....	13
III.1.2	Hydrogels formés à partir de polysaccharides chimiquement modifiés par interactions hydrophobes .....	16
III.1.2.2.	Propriétés physico-chimiques.....	17
III.1.3	Hydrogels et température .....	19
<b>III.2.</b>	<b>Les gels chimiques</b>	<b>20</b>
III.2.1	Réactions entre groupements fonctionnels.....	21
III.2.2	Polymérisation de macromonomères .....	23
<b>IV.</b>	<b>LES HYDROGELS A BASE DE PROTEINES ET DE POLYPEPTIDES</b>	<b>.24</b>
<b>V.</b>	<b>LA PLACE DES ALGINATES DANS L'INGENIERIE TISSULAIRE</b>	<b>.25</b>
V.1.	Alginate et Biocompatibilité	26
V.2.	Applications	28
V.2.1	Matériau de comblement.....	28
V.2.2	Encapsulation dans les hydrogels d'alginate.....	29
V.2.2.1.	Encapsulation de cellules .....	30
V.2.2.2.	Encapsulation de principes actifs .....	31
<b>VI.</b>	<b>LA REGENERATION DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL</b>	<b>.33</b>
VI.1.	Limites concernant la régénération de voies nerveuses lésées dans le SNC	33

## *Chapitre I: Les hydrogels et le SNC*

VI.1.1	Notions biologiques.....	33
VI.1.2	Problématique de la régénération.....	34
<b>VI.2.</b>	<b>Approches expérimentales</b>	<b>35</b>
VI.2.1	Les ponts de régénération.....	35
VI.2.2	L'action pharmacologique.....	38
VI.2.3	Le cahier des charges d'un pont de régénération idéal.....	40
<b>VII.</b>	<b>CONCLUSION</b>	<b>.42</b>

*Chapitre II :*  
*Synthèse*

## I. Introduction

L'objectif de ce travail a consisté à préparer des dérivés amphiphiles associatifs de l'alginate de sodium capables de former des gels en solution aqueuse, pour des applications dans le domaine de la santé, et plus précisément, pour des utilisations dans le traitement des lésions du système nerveux central. Les travaux précédemment réalisés au LCPM sur l'alginate de sodium [Rastello, 2002], [Pelletier, 1999] ont servi de point de départ à ce travail pour la préparation de nouveaux dérivés originaux de l'alginate, qui seront désignés ici sous le terme « alginamides ».

Jusqu'à présent, les dérivés d'alginate utilisés au laboratoire étaient obtenus par fixation de chaînes alkyle sur les groupements carboxylate du polysaccharide *via* la formation de fonctions ester (alginates esters) [Rastello, 2002], [Pelletier, 1999]. Ces dérivés amphiphiles présentent des propriétés associatives qui dépendent très fortement du taux de substitution du polymère par les chaînes alkyle, et de la nature de ces chaînes. De ce fait, les alginates esters peuvent, à une concentration suffisante, former des hydrogels en solution aqueuse par la mise en place d'« interactions hydrophobes » intermoléculaires entre les chaînes alkyle greffées alors que dans le cas de l'alginate natif, le processus de gélification nécessite l'emploi de cations bivalents comme le  $\text{Ca}^{2+}$ . Cependant, ces alginates esters ne sont pas suffisamment stables en solution aqueuse et subissent au cours du temps une dégradation par hydrolyse de la liaison ester entre l'alginate et les chaînons alkyle. C'est pourquoi dans ce travail, compte tenu du cahier des charges de l'application visée, nous avons souhaité fixer les chaînons alkyle sur les fonctions carboxylate de l'alginate par l'intermédiaire de liaisons amide plus stables, de manière à obtenir un hydrogel dont les propriétés se maintiennent sur une période de plusieurs mois.

Après avoir rappelé les travaux antérieurs effectués au laboratoire, nous décrirons de manière détaillée les protocoles expérimentaux utilisés avant d'aborder la discussion des résultats.

## **II. Matériels et méthodes**

### **II.1. Préparation des dérivés amphiphiles associatifs de l'alginate natif**

#### **II.1.1 L'alginate natif: caractérisation structurale**

L'alginate de sodium utilisé pour cette étude a été fourni par la société Sigma-Aldrich, lot 112K0939 (Alginic Acid, Sodium Salt, Medium Viscosity). Il a pour origine l'algue *Macrocystis pyrifera* et possède une masse molaire moyenne en nombre de 160 000 g/mol et un indice de polymolécularité de 1,28 (déterminés par chromatographie d'exclusion stérique couplée à la diffusion de la lumière, SEC-MALLS, réalisée en milieu aqueux). La teneur en eau de la poudre d'alginate de sodium a été évaluée à 3% en masse environ.

L'alginate est constitué d'un enchaînement de motifs acide guluronique et acide mannuronique distribués soit en blocs homopolymères polyG ou polyM, soit en blocs hétéropolymères poly MG, avec une alternance d'unités M et d'unités G. Les propriétés physicochimiques des gels d'alginate en milieu aqueux dépendent de leur masse molaire et de leur structure, c'est-à-dire de la proportion de motifs M par rapport aux motifs G (figure II-1) ainsi que de leur distribution au sein des chaînes. Le rapport M/G peut être déterminé par différentes techniques dont le dichroïsme circulaire, basé sur la propriété qu'ont les molécules asymétriques optiquement actives de faire tourner le plan de polarisation d'un faisceau de lumière incidente. Si la molécule étudiée est traversée par une lumière polarisée circulairement, en raison d'un indice de réfraction différent pour les lumières polarisées droite et gauche et d'une absorption différente des composantes droite et gauche du faisceau incident, le rayon émergent est polarisé elliptiquement. En faisant varier la longueur d'onde incidente, on obtient un spectre de dichroïsme circulaire  $\psi_\lambda = f(\lambda)$ , avec  $\psi_\lambda$  l'ellipticité et  $\lambda$  la longueur d'onde. Les mesures de dichroïsme circulaire ont été réalisées sur un dichrographe CD6<sup>TM</sup> (Jobin Yvon Optics & Spectroscopy), au Laboratoire de Maturation des ARN et Enzymologie Moléculaire de l'université Henri Poincaré à Nancy.

*Protocole expérimental :*

*Les solutions d'alginate natif ont été préparées à 1g/L dans l'eau ultra-pure (milliQ, système de filtration Millipore). Ces solutions sont analysées dans une cuve en quartz ronde de trajectoire optique 2 mm. Les mesures sont effectuées, à température ambiante, en faisant*

varier la longueur d'onde de 190 à 300 nm par pas de 2 nm, pour un temps d'intégration de 0,2s. Pour chaque solution, nous avons réalisé 5 spectres afin d'établir un spectre moyen duquel est soustrait le spectre moyen de l'eau. Les résultats ont été traités à l'aide du logiciel commercial CD maxTM.

## II.1.2 Alginate ester

La synthèse des alginates esters est réalisée en 3 étapes [Rastello, 2002], [Pelletier, 1999], [Houzelle, 1998] (figure II-2). La première étape consiste à transformer l'alginate de sodium en son sel de tétrabutylammonium (TBA) *via* un passage en milieu acide sous forme d'acide alginique: environ 70% des groupements carboxyliques sont transformés en carboxylates de TBA. Le polymère devient alors soluble dans des solvants organiques aprotiques polaires tels que le diméthylsulfoxyde (DMSO), solvant utilisé dans la seconde étape de la synthèse. Lors de cette seconde étape, une réaction de substitution nucléophile entre des alcanes bromés et les fonctions carboxylate de l'alginate conduit à leur estérification partielle alors que les fonctions carboxylate non estérifiées restent sous forme de sel de TBA. Enfin, la troisième étape consiste en un traitement du polymère par une solution aqueuse de NaCl, ce qui permet l'échange des ions  $TBA^+$  associés aux fonctions carboxylate par des ions  $Na^+$ .

### *Protocole expérimental :*

- *Le polysaccharide (5g) est obtenu sous forme acide par échange cationique en milieu hétérogène dans un mélange éthanol 70% / HCl 12N (95ml / 5ml), à 4 °C, pendant 1/2h. Après filtration (filtre borosilicate n°4), l'alginate sous forme acide est lavé avec l'éthanol 70% (500 ml) jusqu'à l'élimination complète du chlorure de sodium formé au cours de la réaction (vérification par test  $AgNO_3$  0,1N sur les solutions de lavage), puis finalement lavé à l'acétone (300 ml). Après séchage sous vide à température ambiante pendant 2h, l'alginate résultant est mis en suspension dans 500 ml d'eau et neutralisé par une solution d'hydroxyde de tétrabutylammonium 0,15M jusqu'à pH 7, puis lyophilisé. Par potentiométrie, on peut ensuite déterminer que dans ces conditions, environ 70% des groupements carboxyliques sont protonés lors du traitement acide avant d'être neutralisés sous la forme de carboxylates de tétrabutylammonium (TBA).*

- *L'alginate sous forme de sel de tétrabutylammonium est dissous dans le DMSO (1% en masse) à l'aide d'une agitation magnétique, à température ambiante, pendant 24h. Puis, le dérivé bromé  $C_nH_{2n+1}Br$  est ajouté pour obtenir le taux de fixation recherché. La réaction se fait sous agitation magnétique, à température ambiante, pendant 24h.*

- *Une solution de NaCl 2,5N (12,8% en volume) est ajoutée au mélange réactionnel, soumis à une forte agitation à l'aide d'un ultra-turrax (5000 tr/min, 5 minutes). Afin de favoriser l'échange entre ions  $TBA^+$  et  $Na^+$ , le mélange est laissé sous agitation pendant 1 heure puis il est versé dans l'éthanol 70% (80% en volume) pour précipiter l'alginate de Na modifié. L'ensemble est soumis à l'action de l'ultra-turrax (5000 tr/min, 15 minutes). Après filtration (filtre borosilicate n°4), l'alginate modifié est lavé avec de l'éthanol 70% jusqu'à l'élimination complète du chlorure de sodium en excès et finalement lavé à l'acétone. Après séchage sous vide à température ambiante pendant 3 jours, le dérivé final est stocké à 4°C.*

### **II.1.3 Alginamide**

La synthèse des dérivés alginamides met en jeu la réaction entre les fonctions carboxylate de l'alginate et une amine primaire qui formera les greffons, la dodécylamine dans notre cas, par l'intermédiaire d'un agent de couplage. L'agent de couplage permet d'activer les fonctions carboxylate de l'alginate en formant un ester actif susceptible de réagir rapidement sur la fonction amine. En nous référant à des résultats déjà décrits dans la littérature, deux voies de synthèse, l'une en milieu organique et l'autre en milieu aqueux tamponné, ont été successivement envisagées en utilisant deux agents de couplage: l'iodure de 2-chloro-1-méthylpyridinium (CMPI), réactif organosoluble fourni par la société Fluka, et chlorhydrate de 1-éthyl(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide (EDC), carbodiimide hydrosoluble, fournie par la société Sigma-Aldrich. La structure chimique de ces réactifs est représentée sur la figure II-3.

#### **II.1.3.1. Méthode au CMPI en milieu organique**

Le protocole de synthèse des alginates amphiphiles utilisant le CMPI pour former l'intermédiaire réactif est inspiré des travaux de Barbucci et Coll. [Barbucci, 2000, 2002, 2004]. Ces auteurs décrivent la synthèse de nouveaux gels d'alginate ou de hyaluronate, obtenus par réticulation chimique des chaînes de polysaccharides au moyen d'une diamine (le

## Chapitre II : Synthèse

1,3-diaminopropane), dans la diméthylformamide (DMF). D'après les auteurs, la diamine réagit par ses deux extrémités sur les fonctions carboxylate préalablement activées par le CMPI pour former une réticulation chimique.

Le protocole de synthèse comporte trois étapes (figure II-4):

La première étape de la synthèse consiste à transformer l'alginate de sodium en son sel de TBA (comme dans le cas des alginates esters). Le polymère devient ainsi soluble dans des solvants organiques aprotiques tels que le DMSO ou la DMF, ce qui facilite sa réaction avec des composés hydrophobes comme la dodécylamine utilisée.

La deuxième étape de synthèse consiste à activer les fonctions carboxylate au moyen du CMPI pour former des esters actifs et faire réagir *in situ* la dodécylamine.

La dernière étape consiste à échanger les ions TBA<sup>+</sup> par les ions Na<sup>+</sup> et à purifier le produit par lavages successifs à l'éthanol 70% et à l'acétone.

La première étape est identique à celle de la synthèse des alginates esters, la seconde étape d'activation et de réaction des fonctions carboxylate de l'alginate avec les fonctions amine a du être optimisée pour contrôler le taux de substitution obtenu. Lors de cette seconde étape, l'alginate même sous forme de sels de TBA est soluble dans relativement peu de solvants, dont le DMSO et la DMF. Par contre, la dodécylamine est peu soluble dans le DMSO et la DMF, ce qui revient à dire que la modification de l'alginate de sodium en alginamide est une réaction qui se déroule en milieu relativement hétérogène.

### *Protocole expérimental :*

- *Formation de l'alginate TBA*

*Le polysaccharide (5g) est obtenu sous sa forme acide par échange cationique en milieu hétérogène éthanol 70% / HCl 12N (95ml/5ml), à 4°C, pendant 1/2h. Après filtration (filtre borosilicate n°4), l'alginate sous forme acide est lavé avec de l'éthanol à 70% (500 ml) jusqu'à l'élimination complète du chlorure de sodium formé au cours de la réaction (vérification par test avec AgNO<sub>3</sub> 0,1N), et finalement lavé à l'acétone (300 ml). Après séchage sous vide à température ambiante pendant 2h, l'alginate résultant est mis en suspension dans 500 ml d'eau puis neutralisé par une solution d'hydroxyde de tétrabutylammonium 0,15M jusqu'à pH 7, puis lyophilisé. Par potentiométrie, on peut ensuite*

déterminer que dans ces conditions, environ 70% des groupements carboxyliques sont sous forme de carboxylates de tétrabutylammonium.

- Formation de l'ester activé par le CMPI et réaction avec la dodécylamine

L'alginate sous forme de sel de tétrabutylammonium (2 g) est dissous dans la DMF (1% w/v) (ou dans le DMSO dans certains cas) à l'aide d'une agitation mécanique à température ambiante pendant 24h dans un réacteur. Le réacteur est mis dans la glace, 45 minutes, avant ajout des réactifs (CMPI et de dodécylamine).

La dodécylamine est dissoute dans un volume de 100 ml de DMF et laissée sous agitation magnétique pendant une heure, puis la quantité de triéthylamine nécessaire (ratio molaire identique à celui de la dodécylamine) est ajoutée à cette solution de dodécylamine. La quantité de CMPI nécessaire selon le taux de greffage attendu est ensuite dissoute dans un volume de 50 ml de DMF.

Ces solutions de CMPI et de dodécylamine (ou éthanol amine dans certains cas) sont placées 1h dans la glace puis ajoutées simultanément à la solution d'alginate-TBA. On veille à laisser le réacteur de nouveau 45 minutes dans la glace après ajout des réactifs. Le mélange réactionnel est ensuite maintenu sous agitation mécanique, à température ambiante (25°C) pendant 24h.

Dans le cas où le solvant utilisé est le DMSO, et non la DMF, le protocole est identique mais le DMSO cristallisant dès 18°C, les réactions ne peuvent être effectuées qu'à 25°C.

- Mise sous forme de sel de sodium à partir du dérivé sous forme de sel de TBA

Une solution de NaCl 2,5N (60 ml) est ajoutée au mélange réactionnel, soumise à l'action d'un ultra-turrax (11000 tr/min, 5 minutes). Afin de favoriser l'échange des ions  $TBA^+$  et  $Na^+$ , le mélange est laissé sous agitation pendant 1 heure. Puis le mélange est versé dans l'éthanol 70% (400% v/v) pour précipiter l'alginate modifié et l'ensemble est soumis à l'action de l'ultra-turrax (11000 tr/min, 20 minutes). Après filtration (filtre borosilicate n°4), l'alginate modifié est lavé et filtré 3 fois successivement avec l'éthanol 70% jusqu'à l'élimination complète du chlorure de sodium en excès et des produits secondaires de la réaction. Le produit est finalement lavé à l'acétone. Après séchage sous vide à température ambiante pendant 3 jours, le dérivé final est stocké à 4°C.

Des blancs de synthèse ont également été préparés Il s'agit d'alginate natif ayant subi l'ensemble des étapes de la synthèse excepté l'ajout d'agent de couplage et /ou d'amine.

### II.1.3.2. Alginamide marqué à la fluorescéine

L'objectif de cette synthèse était d'obtenir un alginamide fluorescent, utilisable pour les études biologiques réalisées dans le cadre de ce travail (cf. chapitre IV).

La sonde choisie est la fluorescéinamine. En nous basant sur les caractéristiques des dextrans FITC commercialisés, nous avons visé un taux de greffage de la sonde équivalent à quatre molécules de FITC pour mille motifs uroniques, en tenant compte, pour calculer la quantité de fluorescéine à ajouter à l'alginate, d'un rendement purement arbitraire de fixation de la sonde fluorescente de l'ordre de 80%.

La difficulté première de cette synthèse est de greffer la sonde fluorescente (figure II-5) sur l'alginate de façon covalente, sans modifier de manière significative les propriétés du polysaccharide.

La deuxième difficulté consiste à modifier le polymère fluorescent par des chaînes alkyle de façon à obtenir un dérivé amphiphile fluorescent avec des propriétés rhéologiques comparables à celles d'un polymère non fluorescent possédant un taux équivalent de chaînes alkyle.

L'approche expérimentale retenue a consisté à effectuer la modification du polysaccharide en deux temps : dans un premier temps, il s'agit de greffer la sonde fluorescente sur l'alginate natif puis dans un second temps de greffer les chaînes alkyle sur l'alginate fluorescent obtenu.

La synthèse mentionnée ci-dessous ne représente qu'une variante de la synthèse présentée pour la modification de l'alginate en alginamide en milieu organique.

La première étape de la synthèse consiste à transformer l'alginate de sodium en son sel de tétrabutylammonium (TBA) comme précédemment.

La deuxième étape de synthèse, consiste à ajouter une faible quantité de CMPI de façon à activer une faible proportion des fonctions carboxylate et à faire réagir *in situ* la fluorescéinamine.

La troisième étape de la synthèse consiste à rajouter une quantité plus importante de CMPI (aux concentrations préalablement déterminées) au mélange précédent pour activer un nombre plus grand de fonctions carboxylate et à faire réagir *in situ* la dodécylamine.

Enfin la dernière étape permet d'échanger les ions TBA<sup>+</sup> par les ions Na<sup>+</sup> puis de purifier le polymère obtenu par lavages successifs à l'éthanol 70% et à l'acétone.

La fluorescéinamine est fournie par la société Acros Organics.

*Protocole expérimental :*

- *Formation de l'alginate TBA*

*Cette étape est identique à celle décrite précédemment*

- *Formation de l'ester activé par le CMPI et réaction avec la sonde fluorescente*

*L'alginate sous forme de sel de tétrabutylammonium (2 g;  $4,80 \cdot 10^{-3}$  mole d'unité saccharide) est dissous dans le DMF (1% en masse) à l'aide d'une agitation mécanique à température ambiante pendant 24h dans un réacteur. Le réacteur est ensuite placé dans la glace, 45 minutes, avant ajout des réactifs (CMPI et de la fluorescéinamine)*

*La fluorescéinamine (8 mg;  $23,99 \cdot 10^{-6}$  mole), soit 1 fluorescéine/200 unités saccharide, est dissoute dans un volume de 10 ml de DMF et laissée sous agitation magnétique pendant une heure, puis la quantité de triéthylamine nécessaire (0,003 ml;  $23,99 \cdot 10^{-6}$  mole, ratio molaire identique à celui de la fluorescéinamine) est ajoutée à cette solution de fluorescéinamine. La quantité de CMPI (6,1 mg;  $23,99 \cdot 10^{-6}$  mole) nécessaire est ensuite dissoute dans 10ml de DMF.*

*Les solutions de CMPI et de fluorescéinamine sont placées 1h dans la glace avant d'être ajoutées, de façon quasiment instantanée, au réacteur sous agitation magnétique. Les béchers contenant la solution de CMPI et de fluorescéinamine sont lavés avec un volume de 10 ml de DMF pour minimiser les pertes. On veille à laisser le réacteur 45 minutes dans la glace après ajout des réactifs. Puis on laisse la réaction se poursuivre à température ambiante (25°C) pendant 24h.*

- *Formation de l'ester activé par le CMPI et réaction avec la dodécylamine*

*La réaction est ensuite poursuivie à l'identique, en remplaçant la fluorescéine par la dodécylamine et en augmentant la quantité de CMPI de manière adéquate.*

- *Mise sous forme de sel de Sodium à partir du dérivé sous forme de sel TBA*

*Ces deux étapes sont identiques à celles décrites dans le paragraphe II.1.3.1.*

### II.1.3.3. Méthode à l'EDC en milieu aqueux tamponné à pH 6

Le 1-ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC) et la dicyclohexylcarbodiimide (DCCI) sont des carbodiimides fréquemment utilisées comme agents de couplage pour l'obtention de liaisons amide, notamment en synthèse peptidique [Rowley, 1999 ; March, 1985]. L'EDC est soluble dans l'eau. Cependant, étant donné l'insolubilité de la dodécylamine dans l'eau, la réaction de modification de l'alginate de sodium en alginamide est également une réaction en milieu hétérogène pour cette seconde voie de synthèse.

Dans le premier temps de la réaction, il y a la formation d'une O-acylurée, (figure II-6 a) suivie dans un second temps par l'attaque nucléophile de l'amine conduisant à la formation de l'amide.

Un des inconvénients majeurs de cette méthode est une réaction secondaire qui conduit, par une migration intramoléculaire du groupement RCO vers un atome d'azote (N) de la carbodiimide, à une N-acylurée, non souhaitée (figure II-6b) [Balcom, 1989].

#### *Protocole expérimental :*

*L'alginate natif (2 g) est dissous à 1% en masse dans un tampon morpholine éthane sulfonique acide (MES), 0,2 M dont le pH a été préalablement ramené à 6. La solution est laissée sous agitation pendant 12 h. Puis, à cette solution, est ajoutée l'amine sous forme solide dans les proportions désirées. Après dix minutes, l'EDC est ajoutée également sous forme solide. Le milieu est alors laissé sous agitation magnétique pendant 24h. Le polymère est ensuite précipité dans l'éthanol 70% (80% V/V) sous l'action d'un ultra-turrax (15minutes) ce qui permet ensuite de le récupérer par filtration sur büchner, après lavage à l'éthanol, au toluène, puis à l'acétone. Le polymère est ensuite purifié par une semaine de dialyse contre une solution de NaCl (10g/L) puis une autre semaine contre de l'eau. Finalement, le polymère est récupéré par lyophilisation.*

## II.2. Nomenclature

Les nomenclatures suivantes ont été adoptées pour permettre l'identification de chaque polymère préparé :

- Pour les alginates esters :

$T-AA-C_{12}$        $T$  : taux de substitution, exprimé en moles de  $C_{12}$  pour 100 moles de motifs saccharidiques

- Pour les alginamides :

$T-AA_N-C_{12}$        $T$  : taux de substitution exprimé en moles de  $C_{12}$  pour 100 moles de motifs saccharidiques

Dans certains cas, pour faciliter la comparaison des alginamides entre eux, nous serons également amenés à utiliser la nomenclature suivante :

$T-AA_N-C_{12}-x\text{ CMPI}-y\text{ amine}$

$T$  : taux de substitution obtenu, exprimé en moles de  $C_{12}$  pour 100 moles de motifs saccharidiques

$x$ : quantité de CMPI exprimée en moles de CMPI pour 100 moles de motifs saccharidiques

$y$ : quantité d'amine exprimée en moles d'amine pour 100 moles de motifs saccharidiques

## II.3. Méthodes de caractérisation des dérivés obtenus

### II.3.1 Détermination des masses molaires

Différents blancs de synthèse ont été préparés, afin de suivre l'évolution des masses molaires de l'alginate au cours des différentes étapes. Les résultats obtenus donnent des informations sur la stabilité du squelette alginate tout au long de ces étapes.

Les mesures sont réalisées par chromatographie d'exclusion stérique couplée à la diffusion de la lumière laser multi-angles (MALLS), notée SEC-MALLS.

La théorie relative à la SEC-MALLS est donnée en annexe 1 à la fin de ce mémoire.

*Protocole expérimental :*

- *Le poids sec des échantillons est déterminé afin de préparer des solutions de concentration précise. L'éluant NaNO<sub>3</sub> 0,1N utilisé, est préparé avec de l'eau milliQ (système de filtration Millipore), puis filtré sur membrane Millipore de 0,1 µm. Nous avons vérifié que, dans ces conditions, les polymères étaient élués quantitativement. Le débit de la pompe est fixé à 0,7 ml/min, et 24 heures sont nécessaires pour que le système soit équilibré. Les solutions de polymère sont préparées la veille dans l'éluant utilisé, à des concentrations de 1g/l, puis filtrées juste avant l'injection sur des filtres Millex GS (Millipore) de 0,22 µm. Les solutions sont injectées deux fois et les chromatogrammes sont traités automatiquement selon la méthode de Zimm.*

- *Equipement : Le diffusiomètre laser multiangle dit MALLS (Multi-Angle Laser Light Scattering) est couplé à une série de colonnes chromatographiques d'exclusion stérique. Le système de chromatographie d'exclusion stérique est constitué de:*

- *une pompe Waters 590,*
- *un dégazeur (Degazys DG 1310, Uniflow),*
- *une boucle d'injection de 200 µl,*
- *une série de colonnes Shodex (SB-806, 805, 804 HQ) avec une pré-colonne de même type.*

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

## **II.3.2 Détermination des taux de substitution**

### **II.3.2.1. Alginate ester**

Les taux de fixation en chaînes alkyle C<sub>12</sub> (rapport molaire chaînes alkyle/100 motifs saccharidiques) ont été déterminés par chromatographie en phase gazeuse après hydrolyse des liaisons ester. Cette méthode de dosage a été mise en œuvre au laboratoire pour l'analyse de pectine modifiée par des chaînes alkyle C<sub>12</sub>, C<sub>16</sub> et C<sub>18</sub>, mais aussi pour l'alginate et le hyaluronate de sodium modifiés par des chaînes C<sub>12</sub> et C<sub>18</sub> [Pelletier, 1999].

Un aliquot de polymère modifié subit une hydrolyse en milieu basique (NaOH 0,1M) pendant 4h à température ambiante. Les chaînes C<sub>12</sub> sont libérées sous forme d'alcool (dodécanol) et leur extraction se fait par ajout de toluène. Le dodécanol contenu dans le toluène est ensuite dosé par chromatographie en phase gazeuse, après étalonnage de la colonne.

*Protocole expérimental :*

- *Préparation des solutions étalons*

250 ml d'une solution de tétradécanol (étalon interne) à 5 mg/ml dans le toluène sont préparés. 1 fiole de 50 ml et 5 fioles de 10 ml contenant respectivement 50, 20, 40, 60, 80, 100 mg environ exactement de dodécanol sont complétées jusqu'au trait de jauge par la solution de tétradécanol. Les solutions sont bien homogénéisées.

- *Etalonnage de la colonne et préparation des solutions à analyser*

100 mg de polymère modifié sont dissous dans 1 ml NaOH 0,4N et 4 ml d'eau. L'hydrolyse des liaisons ester a lieu pendant 4 heures à température ambiante.

3 ml de la solution étalon contenant 1 mg/ml de dodécanol dans la solution de tétradécanol préparée précédemment sont ajoutés. Pour bien dissoudre les chaînes alkyle dans le toluène, le mélange est vigoureusement agité à l'aide d'un agitateur de type Vortex pendant 2 minutes.

Le mélange est centrifugé pendant 20 minutes à 5000 tr/min pour séparer les 2 phases.

Les deux phases sont laissées en équilibre pendant une nuit, puis la phase organique est prélevée pour effectuer l'analyse en chromatographie. On injecte 0,2 µl de phase organique.

- *Matériels*

Le chromatographe utilisé (Shimadzu GC 17 AAF) est équipé d'une colonne SE30 de 2 m de longueur et d'un détecteur à ionisation de flamme. Les températures de l'injecteur et du détecteur sont fixées à 280°C. La température de la colonne est à 233°C pour doser le dodécanol. Le débit de l'azote est 25ml/min. Les chromatogrammes sont traités à l'aide du logiciel VP 4.2

### II.3.2.2. Alginamide

Les liaisons amide ne peuvent pas être hydrolysées comme précédemment décrit pour les alginates esters. Nous avons donc employé d'autres méthodes.

#### II.3.2.2.1 Analyse élémentaire

Cette méthode de dosage par analyse élémentaire est basée sur la mesure du taux d'azote effectué par le Service Central d'Analyse du CNRS à Vernaison à partir de 5 mg d'échantillon de polymère. Le principe consiste à brûler un échantillon préparé dans un jet d'oxygène pur à 950 °C/1150°C. Le dioxyde d'azote produit est réduit en azote élémentaire que l'on mesure à l'aide d'un Détecteur Thermo-Conductive (TDC). Les autres gaz libérés sont piégés sur des pièges spécifiques et libérés séquentiellement par la technique (Purge and Trap) afin d'être mesurés. Cette méthode est précise et efficace et permet la détermination de la composition élémentaire d'un échantillon en Carbone, Azote, Soufre, Hydrogène, et Oxygène.

Le pourcentage d'azote dans chaque échantillon nous permet de déterminer le taux de chaînes alkyle, grâce à l'azote de la fonction amide.

#### II.3.2.2.2 RMN <sup>1</sup>H après hydrolyse

La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) du proton <sup>1</sup>H ou du carbone <sup>13</sup>C est souvent utilisée pour la détermination quantitative des taux de modification en chaînes alkyle sur des squelettes polymères. Cette technique est efficace pour des polymères synthétiques tels que des polyacrylates de sodium modifiés par des amines à chaînes aliphatiques longues [Magny, 1992]. La RMN <sup>1</sup>H est également utilisée par certains auteurs pour caractériser des polymères naturels tels que le galactomannane modifié par des chaînes alkyle [Sierakowski, 2000] ou le dextrane de faible masse modifié par des chaînes alkyle ou phénoxy.

Mais dans le cas de polysaccharides d'origine naturelle et de masse molaire élevée tels que l'alginate utilisé ici, cette technique ne peut pas toujours être employée pour des analyses quantitatives. En effet, les protons de l'alginate ont des temps de relaxation longs et hétérogènes en raison de l'irrégularité de la structure, ce qui génère un élargissement et une superposition des pics. De plus, l'intensité globale des protons des chaînes alkyle apparaît supérieure à celle des protons du squelette alginate alors que leur nombre est moins important. Ceci est essentiellement lié au fait que les protons du massif polymère possèdent des temps de

relaxation plus longs car portés par des chaînes polymères peu mobiles. Pour ces deux raisons, une estimation quantitative du taux de substitution en chaînes alkyle de l'alginate ne peut donc être obtenue par comparaison directe des différents signaux.

Pour que l'analyse RMN soit quantitative, il est donc nécessaire d'hydrolyser préalablement le polymère, soit pour casser en partie les chaînes du squelette d'alginate, dans le but de diminuer sa masse molaire, soit pour hydrolyser les fonctions amide.

La première stratégie adoptée vise à hydrolyser les liaisons osidiques du polymère de manière à réduire la taille des chaînes macromoléculaires.

Grasdalen et Coll. [Grasdalen, 1981] soulignent dans leurs travaux que l'hydrolyse de l'alginate en milieu acide (pH=3), à 100°C pendant 20 à 60 min permet de diminuer la viscosité de la solution, ce qui traduit une diminution de la longueur des chaînes d'alginate. Cette méthode d'hydrolyse est ensuite utilisée pour caractériser la structure de l'alginate par RMN du  $^{13}\text{C}$ .

Heyraud [Heyraud, 1996] décrit également la préparation d'oligoalginate (essentiellement des trimères d'acide uronique) à partir d'alginate par traitement du polysaccharide en milieu acide HCl  $10^{-3}\text{M}$ , à 100°C pendant 5 à 7 h. La composition des oligoalginates est ensuite obtenue par  $^{13}\text{C}$  RMN et  $^1\text{H}$  RMN, ce qui permet de remonter à la séquence des motifs guluronique et mannuronique de l'alginate de départ.

*Protocole expérimental n°1 :*

*50 mg d'alginate modifié sont dissous dans 25 ml d'HCl (0.002 M) sous agitation pendant 20 h à 100°C. Après une heure de refroidissement, une quantité connue de solution d'étalon interne de phtalate de sodium (fourni par Aldrich, 1 ml à 4 g/L) est ajoutée et la solution est lyophilisée. 25 mg du produit obtenu sont ensuite dissous dans 1 ml de  $\text{D}_2\text{O}$ .*

*Les mesures de RMN sont réalisées à 25°C à l'aide d'un spectromètre Bruker Avance 300, le champ est de 300,13 MHz pour les RMN  $^1\text{H}$ . Les concentrations en produits utilisés sont de 25g/L pour la RMN  $^1\text{H}$ .*

Une deuxième stratégie consiste à hydrolyser les liaisons amide reliant les chaînes alkyle au polymère puis à extraire au chloroforme les chaînes alkyle contenues dans le milieu. En effet, la dodécylamine est parfaitement soluble dans le chloroforme, qui est non miscible à l'eau. L'étalon interne utilisé est ici la pyridine, également soluble dans le chloroforme.

*Protocole expérimental n°2 :*

*50 mg d'alginate modifié sont dissous dans 25 ml d'HCl (1 M) sous agitation pendant 20 heures à 100°C. La solution est ensuite amenée à pH 12 afin que l'amine soit sous forme non protonée. 15 ml de chloroforme sont ajoutés et la solution est mise sous agitation pendant 1 heure, pour réaliser une extraction des chaînes alkyle. La séparation de phase est réalisée à l'aide d'une ampoule à décanter. Le chloroforme ainsi prélevé est centrifugé, pour enlever toute trace d'eau, à 5000 tr/min pendant 1 h 15. L'étalon interne, la pyridine, est ajouté, en quantité précisément connue.*

*Les mesures sont réalisées à 25°C à l'aide d'un spectromètre Bruker Avance 300. Les Champs 300,13 Mhz pour les RMN <sup>1</sup>H. Les concentrations en produits utilisés sont de 25g/L pour la RMN <sup>1</sup>H.*

### **II.3.3 Etude rhéologique préliminaire**

Dans ce chapitre, des études rhéologiques préliminaires nous ont permis de suivre l'évolution des propriétés des polymères synthétisés afin d'en optimiser la synthèse.

Une étude rhéologique plus approfondie des dérivés amphiphiles synthétisés sera traitée dans le chapitre III. La théorie relative à la rhéologie est donnée en annexe 2 à la fin de ce mémoire.

*Protocole expérimental :*

*L'alginate natif ainsi que les différents dérivés obtenus sont dissous aux concentrations souhaitées dans de l'eau ultra-pure (milliQ, système de filtration Millipore) sous agitation à température ambiante pendant 24 heures. Les solutions sont ensuite centrifugées à 5000 tr/min pendant 30 minutes pour éliminer les éventuelles bulles d'air formées au cours de l'agitation.*

*Pour les solutions peu visqueuses, les mesures en régime oscillatoire sont effectuées à l'aide d'un rhéomètre à contrainte imposée AR 2000 (Advanced Rheometer), équipé d'une géométrie couette. La température est maintenue à 25°C ± 0,1°C Les mesures de G' et G''*

sont réalisées en fonction de la fréquence entre 1 et 1000 rad/s, pour une contrainte de 1 Pa, dans le domaine de linéarité des échantillons.

Pour les solutions plus visqueuses voire viscoélastiques (gels), les mesures en régime oscillatoire sont réalisées à l'aide d'une géométrie cône-plan (diamètre 40 mm), à la même température et dans les mêmes conditions.

### **III. Résultats et discussion**

#### **III.1. Structure de l'alginate de départ**

Les alginates peuvent présenter des structures très différentes selon l'algue dont ils proviennent et la période de récolte de cette algue. La structure de l'alginate joue un rôle déterminant sur sa capacité à gélifier en présence de cations divalents.

La réponse de l'alginate observée vers 200-220 nm en dichroïsme circulaire, est provoquée par des effets stéréochimiques dans les unités acides uroniques sur la transition  $n \rightarrow \pi^*$ . Ainsi tous les glycosides des acides D-uroniques présentent une bande positive à 212 nm et tous ceux des acides L-uroniques, une bande négative à cette même longueur d'onde. Pour l'alginate, le spectre de dichroïsme circulaire est en première approximation une combinaison de ceux des différentes unités monomères. La détermination du rapport M/G par dichroïsme circulaire consiste, selon la méthode de Morris, à mesurer le rapport des hauteurs p et t correspondant respectivement au pic positif vers 200 nm et au pic négatif vers 212 nm (figure II-7a). Morris a établi des courbes de corrélation (figure II-7b) reliant le rapport M/G au rapport p/t [Morris, 1980].

Le spectre obtenu pour notre alginate est donné sur la figure II-8. Il a été réalisé 5 fois avec une parfaite reproductibilité. Le rapport p/t est de 0,887, ce qui conduit à un rapport M/G de 1,86. L'alginate utilisé pour nos études contient donc environ 65% de motifs mannuronate et 35% de motifs guluronate.

### **III.2. Les alginamides obtenus en présence de CMPI**

#### **III.2.1 Examen de la modification éventuelle du squelette polysaccharide**

A chaque étape de la synthèse, nous avons suivi l'évolution des masses molaires moyennes de l'alginate par SEC-MALLS afin de détecter une éventuelle dégradation du squelette alginique *via* des scissions de chaînes. Cette étude a été réalisée sur les produits obtenus après chaque étape de synthèse puis purifiés par précipitation. (Nous nous sommes limités aux intermédiaires solubles dans l'éluant de la CES).

En fait, il s'est avéré que ni les polymères obtenus en présence de l'agent de couplage sans ajout d'amine ( $AA_N-C_{12-x} \text{ CMPI-}_0$ -amine), ni les dérivés hydrophobisés de l'alginate ( $\tau AA_N-C_{12-x} \text{ CMPI-}_Y$  amine), ni les alginamides préparés à partir d'éthanol amine n'ont pu être étudiés par cette technique en raison de leur faible solubilité dans l'eau.

D'ores et déjà, on peut conclure que la réaction de l'alginate avec le CMPI conduit à la synthèse de dérivés insolubles, indépendamment de la présence d'amine.

Cette étude s'est donc limitée à vérifier la stabilité chimique du squelette alginique lors du passage de sa forme alginate de sodium à alginate de tétrabutylamonium. Nous avons constaté une légère dégradation de l'alginate après la première étape de la synthèse, de manière similaire à celle observée par Rastello dans une étude antérieure: l'alginate de sodium évolue d'une masse molaire moyenne en nombre de 160 000 g/mol à une masse molaire en nombre de 150 000 g/mol (tableau II-1).

#### **III.2.2 Détermination des taux de substitution**

Pour quantifier le nombre de greffons alkyle  $C_{12}$  fixés sur le polysaccharide, deux méthodes ont été utilisées : la RMN et l'analyse élémentaire.

##### **III.2.2.1. Dosage RMN**

Cette technique ne peut être appliquée que si on hydrolyse les polymères. Plusieurs protocoles ont été suivis.

Le spectre des dérivés alginamides (en suivant le protocole n°1, c'est-à-dire coupure de la chaîne polysaccharide) présente de nombreux massifs (figure II-9).

Nous nous intéressons aux pics des chaînes alkyle, aux alentours de 1,2 ppm et à ceux du phtalate (étalon interne introduit) situé entre 7 et 8 ppm, dont la valeur de l'intégration fait référence en permettant le calcul du taux de greffage (tableau II-2).

Nous constatons que les valeurs de taux de greffage mesurés par RMN du  $^1\text{H}$  ne sont pas reproductibles. Nous avons examiné les spectres et tenté d'optimiser différents paramètres de l'analyse : allongement des délais de relaxation (temps entre deux impulsions), ajustement de la ligne de base, mais ceci n'a pas amélioré la reproductibilité des résultats. Avec ce protocole, il est probable que malgré l'hydrolyse acide pendant 20 heures à 100°C, il reste des résidus non solubles dans  $\text{D}_2\text{O}$ , comme par exemple des petits fragments oligosaccharides modifiés par la dodécylamine.

En conséquence, nous avons essayé le second protocole, mis au point dans le but de dégrader les liaisons amide formées entre les chaînes alkyle et le polysaccharide, puis d'extraire ces dernières au chloroforme -solvant non miscible à l'eau - pour pouvoir les doser. En fait, lors de l'extraction de la phase aqueuse au chloroforme, nous avons obtenu une émulsion huile/eau, stabilisée vraisemblablement par la présence de quelques fragments d'alginate amphiphile dans la phase aqueuse, ce qui empêche toute quantification précise du taux de modification. Nous retrouvons ici la conséquence d'une hydrolyse incomplète des chaînes des liaisons amide.

Les spectres RMN obtenus sont donc difficilement exploitables pour déterminer les taux de substitution, ce qui nous a conduit à recourir à l'analyse élémentaire.

### **III.2.2.2. Analyse élémentaire**

Les résultats du dosage de l'azote de quelques polymères sont également rassemblés dans le tableau II-2. Une incertitude de  $\pm 0,05\%$  sur le taux d'azote, conduit à une incertitude de  $\pm 0,7\%$  sur le taux de greffage, ce qui est une précision acceptable. Les résultats sont reproductibles. Cette méthode a été retenue pour le dosage des taux de substitution des alginamides.

### III.2.3 Etude de la liaison des chaînes alkyle sur le squelette alginique

Nous avons d'abord vérifié que les polymères obtenus ne contenaient pas de dodécylamine résiduelle (fixée de façon électrostatique non covalente au squelette alginique).

En effet, après dialyse contre du sel et différents lavages à l'eau, nous avons constaté que le taux de greffage des chaînes alkyle reste inchangé. Nous avons également montré qu'un lavage final du produit par du toluène, pour éliminer toutes traces de dodécylamine, ne modifie pas le taux de substitution.

De plus, pour un alginate « modifié » préparé sans agent de couplage, quelle que soit la quantité d'amine utilisée, le taux d'azote déterminé par analyse élémentaire est proche de 0%.

Ces différents résultats montrent clairement que les chaînes alkyle ne sont pas liées au polysaccharide par de simples interactions électrostatiques avec les groupements carboxylate de l'alginate mais qu'il s'agit bien d'une liaison de type covalent. De la même manière, nous avons vérifié dans le cas de la synthèse des alginates modifiés marqués à la fluorescéine, que la liaison entre la sonde fluorescente et le polymère est bien de nature covalente.

### III.2.4 Mise en évidence de liaisons secondaires de type ester

La caractérisation des blancs d'alginate permet de vérifier que la structure de l'alginate parent est conservée pendant la synthèse. Différents blancs de synthèse AA<sub>N</sub>-C<sub>12</sub>-xCMPI-<sub>0</sub>amine ont ainsi été préparés en l'absence d'amine, avec des quantités de CMPI variables.

Ainsi que nous l'avons fait remarquer dans le paragraphe précédent, nous avons pu observer que ces blancs de synthèse présentent pour la plupart une faible solubilité en solution aqueuse, quel que soit x (compris entre 10 et 50). Par ailleurs, les solutions aqueuses obtenues ne sont pas ou peu filtrables, alors que l'alginate natif est parfaitement soluble dans l'eau. De ce fait, il nous a été impossible de caractériser ces échantillons par SEC-MALLS.

Nous avons donc entrepris de caractériser ces blancs par des mesures rhéologiques en mode oscillatoire.

Les propriétés rhéologiques de deux blancs d'alginates AA<sub>N</sub>-C<sub>12</sub>-50CMPI-<sub>0</sub>amine préparés soit à 25°C dans le DMSO soit à 0°C dans la DMF, sont comparées à celles de l'alginate natif de départ dans la figure II-10.

Dans les deux cas, on observe pour les blancs des valeurs de modules élastiques et visqueux très supérieures à ceux de l'alginate. Par exemple, la valeur du module élastique G' de l'alginate natif à 10 g/L dans l'eau est de l'ordre de 4.10<sup>-3</sup> Pa contre 17 Pa pour le blanc

synthétisé dans la DMF à 0°C et 81 Pa pour le blanc synthétisé dans le DMSO à 25°C. De même, les modules visqueux augmentent considérablement après réaction en présence de CMPI.

On notera par ailleurs que les valeurs des modules  $G'$  et  $G''$  correspondant au blanc de synthèse préparé dans la DMF à 0°C sont toutefois inférieures à ceux du blanc obtenu à 25°C dans le DMSO, ce qui traduit vraisemblablement l'effet de la température.

Enfin, que ça soit dans la DMF ou dans le DMSO, les dérivés obtenus forment des gels dans tous les cas ( $G' > G''$ ).

La diminution de solubilité des blancs d'alginate obtenus en présence de CMPI peut s'expliquer par l'existence d'une réaction de réticulation entre les chaînes d'alginate. Ceci permet aussi d'expliquer les résultats obtenus en rhéologie.

En effet, durant la seconde étape de la synthèse, les fonctions carboxylate sont activées au moyen du CMPI pour former des esters actifs. Lors de cette étape, l'alginate TBA possède des fonctions hydroxyle qui peuvent réagir avec les esters actifs. Il se produit vraisemblablement une attaque nucléophile par les fonctions hydroxyle de l'alginate de TBA sur ces mêmes fonctions activées pour aboutir à la formation de ponts ester (figure II-11b). Dans tous les cas étudiés, cette réticulation chimique de l'alginate conduit à la formation de microgels, dispersés dans l'eau sous forme d'agrégats gonflés de solvant.

Le fait de travailler à 0°C dans la DMF semble diminuer la réticulation chimique intra- et/ou inter-chaînes des alginates, ce qui peut s'expliquer par une diminution de la réactivité, soit de l'ester actif à 0°C soit des fonctions hydroxyle de l'alginate à cette température. C'est pourquoi, par la suite, nous avons préféré travailler à 0°C dans la DMF.

Il est à noter que cette réaction secondaire de réticulation chimique n'avait pas été mise en évidence par Barbucci et Coll. dont l'objectif était d'obtenir un gel chimique de hyaluronate au moyen d'une diamine, après activation du polysaccharide par le CMPI. De ce fait, ces auteurs ont interprété la formation d'hydrogels comme résultant de la réticulation du polysaccharide par la diamine utilisée. La formation de liaisons ester n'a été à aucun moment envisagée.

Toutefois, dans des travaux plus récents, Young et Coll. [Young, 2004] décrivent la préparation de films de hyaluronate, obtenus en faisant réagir le polysaccharide en présence de CMPI ou d'EDC uniquement. Young et Coll. expliquent la réaction de réticulation du hyaluronate par la formation de liaison ester intra et inter chaînes. Pour ces travaux, ils

s'inspirent notamment des travaux réalisés par Francesco [Francesco, 1994] et Gamini [Gamini, 2002] utilisant le CMPI pour réticuler le hyaluronate.

Le mécanisme réactionnel proposé par Young et Coll. expliquant cette réticulation rejoint nos conclusions sur la réticulation des chaînes d'alginate par la formation de liaisons ester (figure II-11b).

### III.2.5 Formation des liaisons ester en présence d'amine

La formation de liaisons ester a été mise en évidence au travers de la caractérisation des blancs décrits dans le paragraphe précédent. Toutefois, on laisse les liaisons ester se former pendant 24 heures en l'absence d'amine, ce qui correspond aux résultats décrits par Young et Coll.

Ces conditions ne sont pas représentatives de celles de la synthèse des alginamides car dans ce cas, l'amine présente entre en compétition avec les fonctions hydroxyle pour réagir avec l'ester activé. Une plus grande réactivité des fonctions amine est attendue.

En présence d'amine, dont la réactivité attendue est plus grande que celle des fonctions hydroxyle, et ajoutée en excès par rapport au CMPI, on peut espérer réduire voire supprimer la présence de ces fonctions ester.

Pour estimer l'importance de la réticulation en présence d'amine, nous avons effectué des synthèses dans lesquelles la dodécylamine est remplacée par une amine beaucoup plus hydrophile, l'éthanolamine.

En dépit de différences de solubilité, nous avons supposé que l'éthanolamine réagit de manière comparable à la dodécylamine, sans pour autant conférer au polymère des propriétés associatives. Ceci permet de comparer plus facilement les propriétés rhéologiques de l'alginate modifié résultant à celles de l'alginate natif et d'évaluer les seuls effets liés à la formation des ponts ester.

Nous avons donc synthétisé deux échantillons de AA<sub>N</sub>-C<sub>12</sub> 50-CMPI 100-éthanolamine, la différence principale étant le délai entre l'ajout de l'amine et l'ajout de CMPI. Dans les deux cas, ces dérivés d'alginate obtenus sont insolubles dans l'eau et un culot de gel est récupéré après centrifugation des échantillons. Ceci permet de mettre en évidence la présence de réticulation du polymère malgré un large excès d'amine. Toutefois, l'augmentation des modules G'' et surtout G' est beaucoup moins marquée que dans le cas des blancs obtenus sans amine décrits dans le paragraphe précédent (figure II-12), ce qui confirme le fait que l'ajout d'un excès d'amine dans le milieu réactionnel réduit de manière évidente et

significative la formation de liaisons ester. Dans le cas où l'amine est ajoutée simultanément au CMPI,  $G'$  reste inférieur à  $G''$ , ce qui est caractéristique d'un comportement plus visqueux qu'élastique, en dépit de la perte de solubilité du polymère.

On peut également remarquer sur la figure II-12 que, lorsque l'ajout de l'amine s'effectue 60 minutes après celui du CMPI, le module élastique ( $G'$ ) est de 0.258 Pa à une fréquence d'1 rad/s alors que ce module n'est que de 0.017 Pa si cet ajout est instantané. En comparaison, le module élastique d'une solution d'alginate natif est de 0.004 Pa pour cette même fréquence.

Ces résultats montrent que la formation des ponts ester est très rapide et démarre instantanément dès l'ajout de CMPI. C'est pourquoi par la suite, nous avons supprimé l'intervalle de temps séparant l'ajout du CMPI de l'ajout d'amine et les deux réactifs ont été ajoutés de façon simultanée.

### III.2.6 Influence du temps de réaction

Nous nous sommes attaché à caractériser la cinétique de réaction d'un alginamide  $\tau$ -AA<sub>N</sub>-C<sub>12</sub> 37,5-CMPI 100-dodécylamine. On remarque sur la figure II-13 que le taux maximum de greffage est obtenu au bout de 16 h de réaction, pour un ratio molaire CMPI /100 unités saccharide fixé à 37,5, ce qui représente la quantité maximale de CMPI que nous avons utilisée dans les différentes synthèses. Pour des questions pratiques, le temps de réaction a été fixé à 24h ce qui assure un taux de greffage maximal.

### III.2.7 Influence des quantités de CMPI et d'amine

L'influence des quantités de CMPI et de dodécylamine sur le taux de greffage de l'alginate ainsi que sur la reproductibilité des synthèses a par la suite été étudiée de manière détaillée.

#### III.2.7.1. Influence de la quantité de CMPI

Comme le CMPI est un agent de couplage totalement soluble dans le DMSO et la DMF contrairement à la dodécylamine, sa réactivité dans le milieu réactionnel dépend peu du mode d'agitation.

Pour limiter la formation de liaisons ester, un fort excès de dodécylamine par rapport au CMPI est utilisé pour chaque synthèse. Cet excès est gardé constant et fixé à un ratio molaire

de 100 moles d'amine pour 100 moles de motifs d'alginate. Cet excès permet d'étudier l'influence des quantités de CMPI sur le taux de greffage en minimisant d'une part l'effet dû à la faible solubilité de l'amine et d'autre part la réaction de réticulation secondaire décrite dans les paragraphes précédents.

Les résultats de la figure II-14 représentent le taux de greffage de l'alginate, c'est-à-dire le nombre de moles de greffons alkyle fixés pour 100 motifs saccharidiques en fonction du ratio de CMPI ajouté pour 100 motifs saccharidiques. Comme nous l'avons déjà précisé, les taux de greffage ont été déterminés par analyse élémentaire. Il apparaît clairement que le taux de greffage augmente quand la quantité de CMPI augmente, dans le domaine étudié (5 à 37% CMPI/100 motifs saccharidiques), à quantité d'amine constante. Cette augmentation est relativement linéaire dans le domaine étudié, ce qui permet de contrôler le taux de greffage grâce au rapport molaire de CMPI employé.

Par ailleurs, nous pouvons observer que les taux de substitution en amine obtenus correspondent dans tous les cas à l'utilisation d'environ 50% seulement de la quantité de CMPI ajouté dans le milieu. On peut donc supposer que la fraction restante de CMPI, non impliquée dans la réaction de fixation de l'amine est susceptible d'être impliquée dans la formation de liaisons ester, et ceci même à fort ratio amine /CMPI

Des essais de mesure du taux de réticulation chimique par RMN du  $^{13}\text{C}$  et du  $^1\text{H}$  ont été réalisés. La difficulté est d'identifier et d'isoler sur le spectre RMN ces liaisons ester au sein du polymère. D'autres essais par IR ont été également non concluants.

Enfin, il est à noter que la reproductibilité des synthèses a été vérifiée. Pour cela, à chaque fois trois synthèses ont été réalisées dans des conditions identiques et un écart d'environ 1% (tableau II-2) a été mesuré d'une synthèse à l'autre. Ces résultats démontrent la reproductibilité des synthèses en tenant compte de l'incertitude d'environ 1% sur la mesure du taux de greffage.

### **III.2.7.2. Influence de la quantité de dodécylamine**

La dodécylamine est une amine grasse partiellement soluble dans la DMF et le DMSO. Ceci entraîne une grande importance de son état de dispersion dans le milieu réactionnel et donc en partie de la vitesse d'agitation du réacteur, toutes autres conditions égales par ailleurs.

La figure II-15 rassemble les résultats du taux de greffage de l'alginamide en fonction du ratio molaire d'amine ajoutée (par rapport à 100 motifs saccharidiques), sachant que la quantité de CMPI est fixée dans ce cas à 37.5 moles pour 100 motifs saccharidiques. Comme

précédemment, il apparaît que le taux de greffage de l'alginate augmente lorsque le ratio d'amine croît, mais jusqu'à un plateau seulement où l'excès d'amine n'influence plus le taux de substitution. Ce résultat montre clairement que tout le CMPI (37,5 mole/ 100 moles de motifs saccharidiques) n'est pas impliqué dans la formation des fonctions amide, et ceci quel que soit l'excès d'amine utilisé.

Enfin, soulignons que la répétabilité des synthèses est très difficile à obtenir lorsque les polymères sont obtenus avec des quantités molaires d'amine inférieures à celles du CMPI. Dans ce cas, il est vraisemblable que ces polymères présentent un taux de réticulation important, et ce d'autant plus que la quantité d'amine diminue.

### **III.2.7.3. Influence des quantités d'alginate de départ**

Par la suite, et afin d'obtenir des lots de polymères modifiés suffisamment importants pour réaliser une étude complète, nous avons décidé d'augmenter les quantités de polymère synthétisés d'un facteur quatre .

Comme le montre le tableau II-3, la quantité d'alginate TBA de départ de 2 à 8g n'a pas d'influence significative sur le taux de greffage.

### **III.3. Synthèse d'un alginamide fluorescent**

En vue d'analyses biologiques futures, un dérivé alginamide marqué avec une sonde fluorescente a également été synthétisé (voir partie expérimentale). Le mode opératoire suivi reste inchangé dans ses grandes lignes mais a fait l'objet d'une adaptation dans son déroulement. L'objectif est d'obtenir un dérivé alginamide comportant deux types de groupements hydrocarbonés : des groupements en C<sub>12</sub> (en très grande majorité) qui apporteront les propriétés rhéologiques associatives et des groupements fluorescents en faible quantité.

Il faut toutefois noter que le taux de substitution en chaînons alkyle et en sonde fluorescente n'est que théorique. Le dosage expérimental n'a pu être réalisé pour deux raisons: la faible solubilité du polymère ne permet pas un dosage de la fluorescéine par UV et la présence d'atome d'azote sur la sonde empêche tout dosage par analyse élémentaire pour quantifier de façon précise le taux en chaînons hydrophobes (impossibilité de distinguer l'azote provenant de la dodécylamine et de la sonde fluorescente).

### III.4. Synthèse en présence d'EDC

Dans le cas de la réaction avec l'EDC, la comparaison des taux de greffages obtenus par analyse élémentaire conduit à des résultats qui évoluent sans aucune corrélation avec le ratio molaire d'EDC (tableau II-4). Le calcul du taux de modification du polymère par analyse élémentaire étant basé sur le pourcentage massique d'azote dans le polymère, la recherche d'une ou plusieurs impureté(s) a guidé nos travaux. Ces impuretés apparaissent vers 2,9 ppm en fait sur le spectre RMN  $^1\text{H}$  (figure II-16) et leur présence peut être attribuée à la formation d'acylurée lors de la réaction de greffage, d'où une surévaluation dans la détermination du pourcentage massique d'azote et donc des erreurs sur le taux de substitution.

Malgré des étapes successives de lavage, nous n'avons pas réussi à purifier correctement le polymère.

De ce fait, nous avons décidé d'abandonner cette voie de recherche, les applications biomédicales visées nécessitant l'emploi de produits hautement purifiés.

Par ailleurs, d'après les résultats de Young et Coll (figure II-17), cette synthèse devrait conduire également à une réaction de réticulation secondaire entre les chaînes d'alginate. Toutefois, nous avons remarqué que les blancs de synthèse restaient solubles dans l'eau et présentaient une masse molaire moyenne en nombre proche de celle de l'alginate de départ (tableau II-5).

Cette réaction secondaire, si elle a lieu, est donc très limitée en comparaison de la réaction utilisant le CMPI.

#### **IV. Conclusion**

Jusqu'à présent, les alginates amphiphiles utilisés au laboratoire étaient obtenus par fixation d'une chaîne alkyle plus ou moins longue sur le polysaccharide par l'intermédiaire d'une liaison ester. Ces liaisons ester n'étant pas suffisamment stables dans le temps au regard de l'application visée, cette première partie du travail a consisté à mettre au point la fixation des chaînes alkyle sur le polysaccharide par l'intermédiaire d'une liaison amide.

La synthèse s'effectue par réaction de la dodécylamine sur les fonctions carboxylate de l'alginate en présence d'agent de couplage. Deux agents de couplages ont été envisagés, l'un soluble en milieu organique, le CMPI et l'autre hydrosoluble, l'EDC (carbodiimide). Ces voies de synthèse ont été explorées:

La synthèse utilisant l'EDC, carbodiimide hydrosoluble, s'est avérée inadaptée compte tenu des difficultés rencontrées pour purifier le polymère obtenu.

La synthèse en présence de CMPI nous a permis d'obtenir des alginamides dans une gamme de taux de greffage de 0 à 20%. Il apparaît que le taux de greffage peut être contrôlé en faisant varier la quantité de CMPI ajouté, tout en gardant constante et en large excès la quantité de dodécylamine utilisée. Cependant, il se produit une réaction secondaire de réticulation chimique de l'alginate. A l'aide de conditions opératoires appropriées, cette réticulation a pu être minimisée, sans toutefois être totalement supprimée. Les polymères préparés sont donc faiblement réticulés par des liaisons covalentes dont il n'a pas été possible de déterminer la proportion au sein des chaînes macromoléculaires. Cette caractéristique structurale devra être prise en compte dans la suite de l'étude.

<b>I.</b>	<b>INTRODUCTION</b>	<b>43</b>
<b>II.</b>	<b>MATERIELS ET METHODES</b>	<b>44</b>
<b>II.1.</b>	<b>Préparation des dérivés amphiphiles associatifs de l'alginate natif</b>	<b>44</b>
II.1.1	L'alginate natif: caractérisation structurale.....	44
II.1.2	Alginate ester .....	45
II.1.3	Alginamide.....	46
II.1.3.1.	Méthode au CMPI en milieu organique.....	46
II.1.3.2.	Alginamide marqué à la fluorescéine .....	49
II.1.3.3.	Méthode à l'EDC en milieu aqueux tamponné à pH=6.....	51
<b>II.2.</b>	<b>Nomenclature</b>	<b>52</b>
<b>II.3.</b>	<b>Méthodes de caractérisation des dérivés obtenus</b>	<b>52</b>
II.3.1	Détermination des masses molaires .....	52
II.3.2	Détermination des taux de substitution .....	53
II.3.2.1.	Alginate ester.....	53
II.3.2.2.	Alginamide .....	55
II.3.3	Etude rhéologique préliminaire.....	57
<b>III.</b>	<b>RESULTATS ET DISCUSSION</b>	<b>58</b>
<b>III.1.</b>	<b>Structure de l'alginate de départ</b>	<b>58</b>
<b>III.2.</b>	<b>Les alginamides obtenus en présence de CMPI</b>	<b>59</b>
III.2.1	Examen de la modification éventuelle du squelette .....	59
III.2.2	Détermination des taux de substitution .....	59
III.2.2.1.	Dosage RMN.....	59
III.2.2.2.	Analyse élémentaire .....	60
III.2.3	Etude de la liaison des chaînes alkyle sur le squelette alginique.....	61
III.2.4	Mise en évidence de liaisons secondaires de type ester .....	61
III.2.5	Formation des liaisons ester en présence d'amine.....	63
III.2.6	Influence du temps de réaction.....	64
III.2.7	Influence des quantités de CMPI et d'amine.....	64
III.2.7.1.	Influence de la quantité de CMPI .....	64
III.2.7.2.	Influence de la quantité de dodécylamine .....	65
III.2.7.3.	Influence des quantités d'alginate de départ.....	66

## *Chapitre II : Synthèse*

<b>III.3.</b>	<b>Synthèse d'un alginamide fluorescent</b>	<b>66</b>
<b>III.4.</b>	<b>Synthèse en présence d'EDC</b>	<b>67</b>
<b>IV.</b>	<b>CONCLUSION</b>	<b>68</b>

*Chapitre III :*  
*Physico-chimie*

## I. Introduction

La préparation d'un hydrogel à des fins de régénération des lésions du système nerveux central implique l'obtention d'un matériau biocompatible et stable *in vivo* suffisamment longtemps pour permettre l'envahissement cellulaire et la repousse neuritique qui nécessitent environ une année.

Un hydrogel injectable sous forme fluide aura tendance à épouser les formes de la lésion d'une façon beaucoup plus rapprochée qu'un matériau à consistance solide qui serait découpé avant sa mise en forme *in vivo*. Cet hydrogel doit être thixotrope c'est à dire capable de retrouver sa consistance lorsque la contrainte cesse. Ceci est nécessaire pour que le comportement du matériau présent dans la lésion soit conforme à celui qui est souhaité.

Enfin, ce polymère doit éventuellement permettre l'encapsulation, notamment celle de principes actifs et d'agents thérapeutiques.

L'ensemble de ces caractéristiques est défini dans le cahier des charges du produit visé (chapitre Introduction).

Les alginates esters (notés  $T-AA-C_{12}$ ) sont connus pour être relativement peu stables en solution car les liaisons ester ont tendance à s'hydrolyser relativement vite dans le temps (temps inférieur à 2 mois), ce qui pose un problème essentiel pour l'application visée.

Dans un premier temps, ce phénomène sera quantifié par une étude comparative de la stabilité des hydrogels d'alginate ester et d'alginamide en fonction du temps en milieu aqueux et physiologique.

Par la suite, le comportement rhéologique des solutions visqueuses et des gels formés en régime semi-dilué sera caractérisé. Les propriétés des alginates esters et des alginamides seront comparées, en reliant les différences observées aux caractéristiques structurales des deux familles de polysaccharides amphiphiles.

Au terme de ce chapitre, nous serons en mesure d'évaluer la stabilité chimique des alginamides et de préciser l'intervalle de taux de modification chimique conduisant à des propriétés rhéologiques comparables à celles des alginates esters.

## II. Matériels et méthodes

### II.1. L'alginate de sodium

Nous avons utilisé un lot d'alginate de sodium de masses molaires obtenue par SEC-MALLS:  $\overline{M}_n$  : 300 000 g/mol et  $\overline{M}_w$  : 350 000 g/mol. Seul ce lot sera utilisé à l'exception des expériences d'hydrolyse en milieu basique non tamponné (lot d'alginate de sodium:  $\overline{M}_n$  = 160 000 g/mol et  $\overline{M}_w$  = 205 000 g/mol, tableaux III-8a et III-8b).

### II.2. Etude de l'hydrolyse de l'alginate natif, des alginates esters et alginamides

Nous avons réalisé une étude préalable de vieillissement des hydrogels d'alginate ester  $_{10,5-AA-C_{12}}$  à 15 g/L et du polymère parent à 10 g/L, l'alginate natif, conservés à 37°C en milieu aqueux.

Par la suite, l'objectif de l'étude étant plus précisément d'étudier le vieillissement de nos hydrogels d'alginamide et d'alginate ester dans des conditions proches des conditions d'implantation, nous avons comparé la stabilité des hydrogels d'alginate ester  $_{6-AA-C_{12}}$  à 30 g/L, des hydrogels d'alginamide  $_{6-AA_N-C_{12}}$  à 30 g/L et du polymère parent, l'alginate natif à 30 g/L dans du liquide physiologique à 37°C. Le liquide physiologique utilisé ici étant du liquide céphalo-rachidien artificiel (LCR), fourni par la société Harvard Apparatus. Cet électrolyte défini et stérile est constitué de différents éléments, aux concentrations ioniques totales suivantes en mM:

Na (150), K (3,0), Ca (1,4), Mg (0,8), P (1,0), Cl (155).

Lors de l'utilisation des hydrogels à 37°C, dans des conditions de stérilité, deux phénomènes de dégradation chimique peuvent apparaître. D'une part, la scission des chaînes polymères au niveau des ponts glycosidiques et d'autre part, l'hydrolyse des liaisons ester ou amide entre le squelette polymère et les chaînes alkyle.

La stabilité chimique des macromolécules a été suivie au cours du temps par deux types d'analyse: la détermination de la masse molaire moyenne de l'alginate natif (par SEC-MALLS) et le dosage des groupements hydrocarbonés (par chromatographie en phase gazeuse ou analyse élémentaire selon le polymère utilisé).

Afin d'évaluer l'importance de ces phénomènes sur les propriétés mécaniques des hydrogels, nous avons réalisé également une étude rhéologique en fonction du temps d'hydrolyse. Les mesures en écoulement sont réalisées en régime permanent. La viscosité est mesurée en fonction de la contrainte. Les mesures en oscillation ont été réalisées dans le domaine de viscoélasticité linéaire de l'échantillon, c'est-à-dire à des contraintes telles qu'il n'y ait pas de perturbation structurale de l'échantillon. Les polymères sont au préalable stérilisés par UV (45 min, 254 nm) pour leur application future dans le domaine biomédical (voir paragraphe III.4.3). Cette étude a été menée au moyen d'un rhéomètre à contrainte imposée, l'AR 2000 (TA Instruments). Les mesures rhéologiques sont toutes effectuées à 25°C.

*Protocole expérimental:*

*Des solutions d'hydrogels d'alginate ester ou d'alginateamide sont préparées dans l'eau ou dans du LCR. Les solutions de polymère sont agitées 24 heures puis centrifugées à 5000 tr/min pendant 30 minutes. Ces solutions sont ensuite placées à l'incubateur à 37°C et des prélèvements sont effectués périodiquement, sur une durée d'environ 60 jours.*

### **II.3. Caractérisation de la solubilité des dérivés de l'alginate**

L'alginate de sodium est très soluble dans l'eau et permet d'obtenir des solutions plus ou moins visqueuses selon sa concentration et ses caractéristiques structurales. Par contre, il est insoluble dans la plupart des solvants organiques. Trois paramètres essentiels déterminent et limitent la solubilité des alginates de sodium dans l'eau: le pH, la force ionique du milieu et la présence d'ions gélifiants [Desprairies, 2002], [Draget, 2000], [Draget, 1997].

Des travaux précédents, relatifs aux alginates esters hydrophobisés par fixation de chaînes alkyle en C<sub>12</sub> ou C<sub>18</sub> *via* des liaisons ester [Rastello, 2002], ont montré qu'il était possible de solubiliser facilement ces polymères dans l'eau, à des concentrations variables selon le taux de substitution. Par exemple, des dérivés alginates esters 15-AA-C<sub>12</sub> sont parfaitement solubles dans l'eau à des concentrations pouvant dépasser 20 g/L.

A l'inverse, dans le cadre des études concernant les alginamides, nous avons constaté des difficultés à solubiliser les polymères en milieu aqueux, quels que soient la concentration du polymère ou son taux de greffage. Pour déterminer la solubilité dans l'eau de ces polymères, nous avons adopté le mode opératoire ci-dessous.

*Protocole expérimental:*

*Les échantillons sont dissous dans de l'eau à 2 g/L (soit 100 mg dans 50 ml) pendant 24 heures, puis centrifugés à 5000 tr/min pendant 45 minutes. Le surnageant est prélevé et lyophilisé. Des extraits secs sont réalisés avec le surnageant et le culot de centrifugation. Une mesure du taux de greffage du polymère présent dans le culot et dans le surnageant est également effectuée.*

Dans ce protocole, les concentrations en polymère choisies sont faibles de manière à minimiser la formation d'interactions hydrophobes intermoléculaires entre les chaînes de polysaccharides modifiés et empêcher la formation d'un gel. Dans ces conditions, les alginates esters sont totalement solubles.

#### **II.4. Mesure du taux de gonflement des hydrogels**

La principale particularité des gels est leur capacité à gonfler, ou en d'autres termes leur capacité à absorber une + ou - grande quantité d'eau. Le taux de gonflement massique  $Q$  est défini comme suit:

$$Q = \frac{\text{masse polymère gonflé} - \text{masse polymère sec}}{\text{masse polymère sec}}$$

Le taux de gonflement dépend essentiellement de la densité de réticulation (chimique ou physique) d'une part, de la nature des interactions polymère/polymère et des interactions polymère/solvant d'autre part.

De manière simplifiée le processus de gonflement est dû à un gradient de pression osmotique. Le solvant diffuse ainsi vers l'intérieur du réseau et celui-ci se met à gonfler. Lorsque le solvant pénètre dans le réseau, les chaînes de polymères vont s'expanser, ce qui va générer une force rétractive élastique de nature entropique due aux nœuds de réticulation. L'apparition de cette force augmente la pression à l'intérieur du réseau et lorsque cette pression devient suffisante pour contrebalancer la pression osmotique, le réseau est en équilibre avec le milieu environnant et le gel cesse de gonfler.

Dans le cadre de nos travaux de recherche, les hydrogels d'alginate ester et les hydrogels d'alginamide sont destinés à être implantés au sein du système nerveux lésé de rats adultes.

Au départ, ces hydrogels d'alginate ester et d'alginateamide sont préparés dans une solution de NaCl 0,15M. Après leur implantation, ils seront notamment en contact et infiltrés par du liquide céphalo-rachidien, contenant en particulier des ions  $Ca^{2+}$  à une concentration de 1,4 mM, ce qui peut entraîner une contraction du gel.

Par ailleurs, après un an d'implantation, des coupes de cerveau de rats seront réalisées. Ces coupes de cerveaux seront constituées de tissus mais également d'hydrogel résiduel et seront le support d'analyses permettant de conclure ou non à un processus de régénération au sein du système nerveux central. Il faut noter que ces analyses seront réalisées dans un tampon, le cacodylate de sodium 0,05M complété en calcium 5mM pour éviter l'élimination du gel après les différentes étapes de fixation et de lavage des coupes. La stabilisation de l'hydrogel sur les coupes aura vraisemblablement pour conséquence un changement de volume de l'hydrogel. Celui-ci ne doit pas perturber les analyses et masquer tout signe de régénération.

Dans ce cadre, déterminer le taux de gonflement de nos systèmes constitue une estimation préalable du comportement de ces gels dans les différentes étapes des expériences *in vivo* (implantation, analyse, ...).

Sur un plan pratique, cette étude a été réalisée à partir de billes d'alginate natif, d'alginateamide et d'alginate ester à différents taux de greffage. Le fait de travailler avec des billes facilite les mesures et permet une bonne reproductibilité des résultats. Nous avons mesuré le taux de gonflement dans différentes solutions: chlorure de sodium (0,15M) et cacodylate de sodium (0,05M) supplémentés en calcium (5 mM).

*Protocole expérimental:*

*Le polymère est dissous dans l'eau à 20g/L pendant 24 heures.*

*La solution de polymère est versée goutte à goutte dans différents piluliers contenant les solutions d'électrolytes. Il se forme ainsi au contact des solutions des billes plus ou moins facilement manipulables en fonction de la force des gels obtenus. On s'attache à ne pas former plus de trois billes par pilulier pour éviter les phénomènes d'agrégation. Le dispositif expérimental utilisé pour former les billes est composé d'une seringue de 5ml disposée sur un support fixe et vertical. La quantité de solution de polymère versée dans chaque pilulier doit*

être mesurée au moyen de la balance. Après 72 heures d'équilibre, les billes sont égouttées sur un tamis et épongées délicatement au moyen de papier absorbant avant d'être pesées.

## **II.5. Caractérisation rhéologique des alginamides et des alginates esters en milieu aqueux et en milieu salin**

Différents travaux ont déjà été réalisés au laboratoire concernant les propriétés rhéologiques en milieu aqueux de dérivés esters d'alginate ou de hyaluronate modifiés par des chaînes alkyles. Ces études ont permis de confirmer le caractère amphiphile associatif acquis et l'existence d'un réseau tridimensionnel en solution. Ce réseau est créé par les associations hydrophobes, essentiellement intermoléculaires, entre segments alkyle.

*Protocole expérimental:*

*L'alginate natif ainsi que ses différents dérivés sont dissous dans de l'eau ultra-pure (milliQ, système de filtration Millipore), sous agitation à température ambiante pendant 24 heures. Les solutions sont ensuite centrifugées à 5000 tr/min pendant 30 minutes pour éliminer les éventuelles bulles d'air formées au cours de l'agitation.*

*Pour les solutions peu visqueuses, les mesures sont effectuées en régime permanent à l'aide d'un rhéomètre à contrainte imposée AR 2000, équipé d'une géométrie couette. La température est maintenue à  $25^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ . Les mesures en écoulement sont réalisées pour des contraintes de cisaillement imposées entre 0,1 et 10 Pa.*

*Pour les solutions plus visqueuses (gels), les mesures en régime permanent et oscillatoire sont réalisées à l'aide du même rhéomètre AR 2000, équipé d'une géométrie cône-plan d'un diamètre de 40 mm. La température est maintenue à  $25^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}$ .*

*Les mesures en écoulement permanent sont réalisées pour des contraintes de cisaillement imposées entre 0,4 et 100 Pa.*

*En régime oscillatoire, les mesures de  $G'$  et  $G''$  sont réalisées en fonction de la fréquence  $\omega$  entre 1 et 100 rad/s, pour une contrainte de 1 Pa, dans le domaine de linéarité des échantillons.*

## II.6. Caractérisation de la porosité par microscopie électronique environnementale

La taille des mailles formées par le réseau polymère représente une caractéristique structurale importante pour la régénération des voies nerveuses lésées du SNC. La porosité, c'est-à-dire la taille des pores et le volume poreux total, doit permettre le passage des fibres pour qu'il y ait régénération.

Par exemple, Woerly et Coll. [Duconseille, 1997] se sont attachés à étudier précisément la structure de leur hydrogel de poly(hydroxypropylméthacrylamide) (PHPMA), notamment la porosité par différentes techniques telles que la porosimétrie au mercure ou l'adsorption d'azote (BET). Ils observent que la taille des pores est suffisante pour permettre le passage des fibres nerveuses, puisque la majorité des pores ont un diamètre de 20 à 300  $\mu\text{m}$ . A titre de comparaison, l'axone (ou fibre nerveuse) a un diamètre compris entre 1 et 15  $\mu\text{m}$ . Sa longueur varie d'un millimètre à plus d'un mètre.

Il faut toutefois remarquer que ces techniques sont réalisées sur des gels secs ce qui ne reflète pas nécessairement la réalité. De même, la microscopie électronique à balayage requiert un traitement préalable de séchage de l'échantillon du gel afin de figer sa structure et d'obtenir un produit sec. Le gel est congelé dans l'azote liquide puis, lyophilisé pendant au moins 48 heures. Le protocole de congélation est l'étape critique de la méthode et les résultats obtenus sont fonction de la cinétique de congélation. La taille des pores est contrôlée par la taille des cristaux de glace formés. Plus la congélation se fait rapidement, plus les cristaux sont petits et la porosité fine. Des études [Shapiro, 1997], [Chung, 2002] ont démontré que selon le protocole appliqué et notamment le gradient thermique appliqué, on obtient des structures très différentes. Les observations ne peuvent, en aucun cas, être représentatives de la structure du gel à l'état humide.

Pour notre part, nous avons choisi d'utiliser la microscopie électronique environnementale comme méthode d'observation. La microscopie électronique environnementale présente l'avantage de permettre une observation à pression atmosphérique sans déshydratation des échantillons. La résolution atteignable est de l'ordre de 5 nm à 30 kv.

Afin de visualiser la structure réelle en milieu physiologique, des essais de microscopie électronique à balayage environnemental (ESEM) ont été conduits sur des billes d'alginate ester, des billes d'alginate et des gels d'alginate natif en milieu physiologique (NaCl 0,15 M et  $\text{Ca}^{2+}$  1,4 mM).

Ces essais ont été réalisés au centre d'Ecologie et Physiologie Energétiques (UPR 9010) à Strasbourg.

## II.7. Etude de l'hydrolyse des liaisons ester de réticulation chimique

Lors de la synthèse des alginamides, nous avons mis en évidence l'existence d'une réaction secondaire de réticulation chimique liée à la formation de liaisons ester entre deux motifs saccharidiques. Cela rend nécessaire l'hydrolyse de ces liaisons de type ester, l'objectif initial étant d'obtenir un gel physique et non un gel chimique. Nous avons testé les effets d'une hydrolyse acide ou basique sur la stabilité de ces liaisons issues de ces réticulations secondaires.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'hydrolyse en milieu acide ou neutre dans l'eau.

*Protocole expérimental relatif à l'hydrolyse acide ou neutre:*

*Deux solutions de pH=3 et pH=7 sont préparées à partir d'HCl. Des échantillons d'alginate natif, d'alginamide et de blanc de synthèse  $0-AA_N-C_{12}$  37,5-CMPI préalablement dissous dans l'eau ultra-pure (milliQ, système de filtration Millipore) à 10 g/L sont placés dans ces solutions pendant 48 heures. Les solutions de pH acide sont ensuite neutralisées à pH=7 avec NaOH puis dialysées pour éliminer le sel formé. Tous les échantillons sont ensuite lyophilisés et caractérisés.*

Dans un deuxième temps, nous avons mené des travaux en milieu basique tamponné ou non tamponné pour des temps d'hydrolyse allant jusqu'à 24 heures.

Les études en milieu basique tamponné sont basées sur des données de la littérature relatives à la stabilité des esters d'alginate de propylène glycol, où les auteurs décrivent une dégradation des liaisons de type ester en milieu basique tamponné à pH=10 à 25°C pour des temps inférieurs à 5 heures [Gray, 1990].

*Protocole expérimental en milieu basique tamponné à pH=12 et pH= 9 (temps variables de 20 min à 5 heures):*

*L'alginate natif, le blanc de synthèse et l'alginate sont dissous dans de l'eau ultra-pure (milliQ, système de filtration Millipore) à 10 g/L. Un tampon d'hydrogencarbonate de sodium  $\text{NaHCO}_3$  0,2 M est préparé et ajusté à pH=12 ou pH=9 avec NaOH. Un volume de tampon équivalent au volume de solution de polymère est ajouté à celle-ci, les concentrations sont donc au final de 5 g/L, la concentration du tampon de 0,1M. Des prélèvements, à 20 minutes, 1 heure et 5 heures, sont effectués. Les solutions prélevées sont neutralisées à pH=7, puis dialysées et lyophilisées.*

*Protocole de l'hydrolyse en milieu basique NaOH pour t= 24 heures (pH 14 à 11):*

*Le polymère (500mg) est soumis pendant 24h sous agitation magnétique à 50ml d'une solution de NaOH à une concentration fixée (1M, 0,1M, 0,01M, ou 0,001M). Après neutralisation à pH=7 et dialyse contre de l'eau, le produit est récupéré par lyophilisation avant d'être analysé en SEC-MALLS en solution aqueuse.*

### **III. Résultats**

#### **III.1. Stabilité des alginates natifs, des alginates esters et des alginamides vis-à-vis de l'hydrolyse**

##### **III.1.1 Stabilité de la liaison ester dans l'eau**

Comme cela a été montré précédemment, l'hydrolyse des alginates ester conduit à une variation de leurs propriétés rhéologiques en solution aqueuse, avec une diminution significative de la viscosité et des modules dynamiques  $G'$  et  $G''$ . En conséquence, un suivi des propriétés rhéologiques des solutions constitue un moyen macroscopique de détecter une dégradation hydrolytique des macromolécules (scission des chaînes de polysaccharides ou hydrolyse des liaisons ester avec les groupements hydrocarbonés).

Dans un premier temps, l'évolution des propriétés rhéologiques d'une solution d'alginate natif à 10g/L est examinée au cours du temps afin de mettre en évidence une éventuelle dégradation du squelette du polysaccharide. Après 50 jours à 37°C, on ne constate pas de

différence significative des propriétés rhéologiques de l'alginate de sodium entre le début et la fin de l'étude en terme de viscosité (tableau III-1). En SEC-MALLS, aucune variation significative des masses molaires moyennes n'est observée, ce qui vient conforter les mesures rhéologiques et nous amène à conclure à l'absence de dégradation de la chaîne polysaccharide. Dans tous les cas, le module visqueux  $G''$  est supérieur au module élastique  $G'$ , ce qui correspond à une solution visqueuse.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés aux propriétés rhéologiques d'un hydrogel d'alginate ester  $_{10,5-AA-C_{12}}$  au cours du temps. Comme illustré par les figures III-1 et III-2, ces hydrogels placés à l'incubateur à  $37^{\circ}\text{C}$  montrent une modification de leurs propriétés mécaniques au cours du temps, caractérisée par une diminution des modules élastique et visqueux. A une fréquence de  $1 \text{ rad}\cdot\text{sec}^{-1}$ , le module élastique évolue de 132 Pa au 1<sup>er</sup> jour à 0,7 Pa après 50 jours. Le module visqueux évolue de 14 à 0,5 Pa. On remarque un changement progressif de comportement en solution qui passe d'un comportement de gel fort ( $G' > G''$  sur tout le domaine de fréquences) à un comportement de solution visqueuse après 50 jours.

Ces résultats traduisent de manière évidente une hydrolyse des liaisons ester à pH neutre, conforme aux travaux de Zimmermann [Zimmermann, 1945].

Les résultats que nous avons obtenus sont également conformes à ceux décrits par Pelletier dans le cadre de ses travaux sur la régénération du cartilage [Pelletier, 1999]. L'auteur note une détérioration des propriétés mécaniques, observée pour les hydrogels d'alginate ester en milieu tamponné (pH=7,4). Par des mesures en SEC-MALLS au cours du temps, l'auteur s'est attaché à montrer la faible dégradation du squelette alginique. Des dosages de taux de modification en chaînes alkyle par chromatographie en phase gazeuse ont permis de mettre en évidence la diminution du taux de substitution sur une période de 6 mois, due à l'hydrolyse des liaisons ester.

### **III.1.2 Stabilité comparative des liaisons ester et amide en milieu physiologique (LCR)**

Après 2 mois à l'étuve à  $37^{\circ}\text{C}$ , l'étude des propriétés rhéologiques de l'hydrogel d'alginamide  $_{6-AA_N-C_{12}}$  (figure III-3) montre une diminution notable des modules élastique et visqueux du polymère. A une fréquence angulaire de  $1 \text{ rad/s}$ , le module élastique est divisé

par 5 passant de 109 Pa au 1<sup>er</sup> jour à 22 Pa après 60 jours pour G'. Le module visqueux, diminue également et passe de 63 Pa à 12 Pa. On note néanmoins que le système garde un comportement de gel faible ( $G' \sim G''$ ) quelle que soit la fréquence.

D'autre part, on ne constate pas de variation du taux de chaînons alkyle du polymère 6-AA<sub>N</sub>-C<sub>12</sub> en fonction du temps après 2 mois. Le dosage par analyse élémentaire donne un taux de modification de 6% après deux mois d'étude. Les liaisons amide ne sont donc pas hydrolysées dans ces conditions d'étude, à pH neutre.

Il est donc vraisemblable que la diminution des propriétés viscoélastiques du dérivé alginamide soit directement liée à l'hydrolyse plus ou moins totale des liaisons ester responsables de la réticulation chimique de ces macromolécules.

L'étude des propriétés rhéologiques de l'hydrogel d'alginate ester 6-AA-C<sub>12</sub> (figure III-4) montre une très remarquable variation des propriétés mécaniques du polymère au cours du temps. Ce constat est tout d'abord visuel par un changement macroscopique de comportement. On passe d'un hydrogel à une solution visqueuse. L'analyse rhéologique confirme ce résultat. ( $G'' > G'$  à  $f=1 \text{ rad}\cdot\text{sec}^{-1}$ ).

Après 60 jours, on constate également une variation du taux de chaînons alkyle du polymère 6-AA-C<sub>12</sub> en fonction du temps (hydrogel à 30 g/L dans du LCR, de pH 7,4 de force ionique 0,15M, conservé à 37°C sur une période de deux mois). Le taux de chaînons alkyles dosé par chromatographie en phase gazeuse est de 2,5%, soit une diminution de plus de 50%.

De plus, nous avons confirmé que le squelette d'alginate n'est pas dégradé dans ces conditions (tableau III-2).

Cette étude apporte un nombre important d'informations:

- Les résultats relatifs à l'étude de la stabilité des hydrogels d'alginate ester 6-AA-C<sub>12</sub> en milieu physiologique confirment les résultats de la première étude sur la stabilité des hydrogels d'alginate ester en milieu aqueux. On constate en effet une perte des propriétés mécaniques, due à l'hydrolyse des liaisons ester au cours du temps.

- En milieu physiologique, l'hydrogel d'alginamide 6-AA<sub>N</sub>-C<sub>12</sub> conserve un comportement de gel. Il ne subit pas d'hydrolyse notable des liaisons amide mais on enregistre néanmoins une modification de ses propriétés mécaniques. On peut concevoir que la diminution du

module élastique et visqueux de l'hydrogel d'alginamide  $6\text{-AA}_N\text{-C}_{12}$  est le résultat de l'hydrolyse partielle ou totale des liaisons ester dues à la réaction secondaire de réticulation chimique observée lors de la synthèse, ce qui conduit à une diminution des interactions entre les macromolécules.

Il est clair que les propriétés rhéologiques initiales des hydrogels d'alginamide sont une combinaison de la contribution des interactions des chaînes alkyle entre elles et des réticulations chimiques de type ester.

Toutefois, si on émet l'hypothèse selon laquelle une grande partie des liaisons ester sont hydrolysées en milieu physiologique après un temps de deux mois, les propriétés rhéologiques des hydrogels d'alginamide  $6\text{-AA}_N\text{-C}_{12}$  sont alors liées majoritairement aux interactions des chaînes alkyles entre elles. On pourrait donc s'attendre à des modules élastique et visqueux semblables à ceux des alginates esters  $6\text{-AA-C}_{12}$  mesurés au temps  $t_0$ .

En réalité, nous observons qu'à taux de substitution équivalent, l'alginamide  $6\text{-AA}_N\text{-C}_{12}$  après hydrolyse des ponts esters, présente des propriétés viscoélastiques beaucoup moins marquées que celles de l'alginate ester  $6\text{-AA-C}_{12}$  à  $t_0$ .

A priori, les conditions de synthèse des alginates esters et des alginamides peuvent permettre d'expliquer ces résultats.

- D'une part, la synthèse permettant d'obtenir des alginates esters s'effectue en milieu homogène alors que la synthèse permettant d'obtenir des alginamides est une synthèse en milieu hétérogène. On pourrait donc penser que la distribution des chaînes alkyles au sein des chaînes d'alginate est différente.

- Par ailleurs, la synthèse des liaisons amide est simultanément accompagnée par la formation de liaisons ester d'auto-réticulation, ce qui peut également conduire à une distribution différente des chaînes alkyles le long de la chaîne de polysaccharide et à une modification conformationnelle du polymère. Sur un plan entropique, cette modification conformationnelle serait peu favorable, à la mise en place des « interactions hydrophobes intermoléculaires » entre les chaînons alkyles greffés, même après rupture des liaisons ester.

- Enfin, il est également possible que toutes les liaisons ester de réticulation ne soient pas hydrolysées, ce qui aurait également pour effet de figer la conformation de l'alginate, diminuant ainsi la probabilité de formation des interactions hydrophobes.

## **III.2. Caractérisation des alginates esters et alginamides en milieu aqueux**

### **III.2.1 Solubilité**

Les alginates esters sont solubles dans l'eau jusqu'à des concentrations de 2 g/L et avec des taux de substitution atteignant 15%.

Les dérivés alginamides ont un comportement bien différent (figures III-5 et III-6). En effet, lorsque l'alginamide est dissous dans l'eau, il se forme systématiquement des « microgels » (= particules de polymère gonflées d'eau) qui coexistent avec une phase aqueuse dans laquelle une partie du polymère est solubilisé. Les « microgels » peuvent être aisément séparés de la « solution » par centrifugation. Il apparaît que la concentration du polymère soluble dans la solution décroît quand la proportion de CMPI employée dans la synthèse augmente et donc décroît avec le taux de substitution. Selon la quantité de CMPI ajoutée durant la synthèse, la proportion de « microgels » formés peut aller de 20 à 90% de la masse de polymère introduite.

Nous avons vérifié que le taux de substitution en chaînes alkyle des macromolécules solubles s'avère identique à celui des macromolécules contenues dans les « microgels ». De toute évidence, la formation de ces « microgels » est la conséquence directe des réticulations chimiques formées durant la synthèse de l'alginamide.

En conclusion, les solutions d'alginamide sont non homogènes, comparativement à celles d'alginate ester, ce qui aura des répercussions sur leurs propriétés rhéologiques ainsi que nous le montrerons dans les paragraphes suivants.

### **III.2.2 Propriétés rhéologiques des solutions aqueuses d'alginate ester**

Les propriétés rhéologiques de type associatives des hydrogels d'alginate ester sont dues aux « interactions hydrophobes » entre les chaînes alkyles [Rastello, 2002].

En effet, l'introduction de chaînons hydrophobes sur l'alginate conduit à une augmentation plus ou moins prononcée de la viscosité des solutions au 1<sup>er</sup> plateau newtonien et des modules  $G'$  et  $G''$ . Ceci a été couramment démontré dans le cas des polymères associatifs, notamment de type HASE (Hydrophobically modified alkali Soluble Emulsions) [Tam, 2000], [English, 1999] ou HEUR (Hydrophobically Ethoxylated Urethanes) [Tam, 1998], pour des dérivés associatifs de hyaluronate de sodium [Pelletier, 2001], de pectine [Miralles-Houzelle, 2001],

de cellulose [El Ghzaoui, 2001] ou de polyacrylamides [Candau, 1999]. Cette augmentation de la viscosité et des modules  $G'$ ,  $G''$  est due à la formation d'un réseau polymère tridimensionnel dont les nœuds sont constitués d'agrégats hydrophobes intermoléculaires. En régime semi-dilué, les chaînons hydrophobes distribués le long du squelette alginique ont tendance à créer des associations intermoléculaires, entraînant la formation de points de jonction entre les chaînes macromoléculaires en solution [Aubry, 1994], [Tirtaatmadja, 1997a; 1997b]. Les interactions intermoléculaires prédominantes forment ainsi un réseau associatif temporaire qui se superpose à l'enchevêtrement des chaînes macromoléculaires [Aubry, 1994]. Ces associations intermoléculaires conduisent à la formation d'entités de volume hydrodynamique élevé et ainsi à des solutions de très haute viscosité, et éventuellement, pour des concentrations suffisantes, à des réseaux tridimensionnels réticulés physiquement, ayant des comportements plus ou moins visco-élastiques.

### **III.2.3 Propriétés rhéologiques des solutions aqueuses d'alginamide**

#### **III.2.3.1. En régime oscillatoire**

Au regard des figures III-7a, 7b et 7c, il apparaît une corrélation entre le taux de greffage des alginamides et les modules élastiques et visqueux de leurs solutions aqueuses.

Ces modules augmentent avec le taux de greffage, dans le domaine exploré allant de 3 à 20%.

Pour des taux de substitution inférieurs à 6%, le comportement observé est celui de solutions visqueuses ( $G' < G''$  et variation importante avec  $\omega$ ). Pour des taux de substitution supérieurs ou égaux à 9%, le comportement rhéologique est celui de gels viscoélastiques ( $G' > G''$  et peu de variation avec  $\omega$ ). Ainsi, à une concentration donnée en polymère, une augmentation du nombre d'interactions entre les chaînes produit une transition d'un fluide à un gel viscoélastique. Lorsque le taux de substitution dépasse 15%, le comportement rhéologique reste celui d'un « gel fort » (pour lequel  $\tan \delta \approx 0,1$ ).

#### **III.2.3.2. En régime permanent**

Le comportement en écoulement varie lui aussi de façon importante avec le taux de substitution (figure III-8a). La formation d'un réseau physique de plus en plus dense au sein

de la solution conduit à un plateau de viscosité aux faibles contraintes, dont la valeur croît avec le taux de substitution.

Pour les alginamides dont le taux de substitution est inférieur à 9%, la rupture de ce réseau survient pour une contrainte critique dont la valeur augmente avec le taux de substitution. Toutefois, on notera que cette contrainte, à partir de laquelle le réseau se déstructure, est faible, de l'ordre de quelques Pa. Le temps de relaxation macroscopique du système (calculé en faisant le rapport viscosité plateau/contrainte critique) est grand (de 100s à  $10^4$  s) mais la pente relativement faible de la courbe viscosité = f (contrainte) laisse présager l'existence de plusieurs phénomènes de relaxation.

Dans le cas des dérivés substitués à 15 et 20 %, on observe que les courbes d'écoulement sont biphasiques, avec deux contraintes critiques très différentes (dont l'une est faible, 1 à 2 Pa) et un plateau de viscosité intermédiaire. Deux temps de relaxation peuvent être calculés, l'un d'environ  $10^4$  s et l'autre très court d'environ 0,5 s.

Si maintenant on observe l'allure en écoulement du blanc  $0\text{-AA}_N\text{-C}_{12,37,5}\text{CMPI-0-amine}$  (figure III-8b), on remarque également l'existence d'une contrainte de rupture faible (1 Pa) et d'un temps de relaxation long ( $10^5$  s). Au-delà de cette contrainte critique, un comportement rhéofluidifiant est observé. Dans le domaine de contraintes exploré, aucun plateau de viscosité n'est mis en évidence vers les plus fortes contraintes.

Ces observations nous amènent à formuler les hypothèses suivantes:

- Dans le cas du blanc de synthèse, seuls des microgels de polymère réticulé chimiquement sont présents dans la solution et le temps de relaxation long correspondrait donc au temps de désassociation de ces agrégats entre eux. Ce temps est long car les agrégats sont de grandes tailles (visibles à l'oeil nu) et sont donc peu sensibles au mouvement brownien, d'où une dynamique lente. Toutefois, les forces de cohésion entre ces microgels sont faibles, ce qui explique la faible valeur de la contrainte critique.

- Dans le cas des dérivés alginamides, le temps de relaxation long correspondrait donc également aux agrégats de polymère dont la proportion augmente avec le taux de substitution. Le temps le plus court pourrait alors correspondre au temps nécessaire pour désorganiser les interactions hydrophobes. Au regard des dérivés d'alginate ester, ce dernier temps de relaxation est très court, ce qui pourrait être expliqué par un nombre plus faible de chaînes alkyles engagées dans les microdomaines hydrophobes. Ceci implique que la « force » (ou le nombre) des points de jonctions entre les agrégats d'alginamide et/ou des interactions

hydrophobes entre les chaînes d'alginamide serait moins importante que la force (ou le nombre) des interactions hydrophobes entre les différentes chaînes d'alginate ester d'où une cohésion plus faible du réseau macroscopique.

### **III.2.4 Etude comparative des propriétés rhéologiques des alginamides et des alginates esters**

#### **III.2.4.1 Régime oscillatoire**

L'influence du taux de substitution sur le module élastique mesuré à 1 rad/s à 10 g/L apparaît différente pour les deux types d'alginate modifiés (figure III-9).

Pour les alginates esters,  $G'$  n'augmente de façon prononcée que pour des taux de modification supérieurs à 7 %, alors que dans le cas des alginamides, on note une augmentation continue sur tout le domaine de taux de substitution. La différence peut être attribuée à l'existence des réticulations chimiques entre macromolécules d'alginamide. Ainsi, entre 0 et 7%, l'augmentation de  $G'$ , pour les solutions d'alginamide, pourrait provenir essentiellement des réticulations chimiques et donc de l'augmentation de taille des espèces macromoléculaires en solution.

Entre 7 et 12 %, il semblerait que les deux contributions s'additionnent globalement (réticulations chimiques et interactions physiques), en conduisant à des modules toujours plus élevés avec les alginamides. Enfin, lorsque le taux de substitution dépasse 12%, ce sont les alginates esters qui forment des gels avec des  $G'$  plus élevés. Ceci peut s'interpréter en admettant que les réticulations chimiques des alginamides deviennent si denses qu'elles imposent des restrictions conformationnelles qui limitent l'établissement d'interactions physiques intermoléculaires et donc la connectivité du réseau.

En comparant les modules élastiques et visqueux de deux solutions de dérivés d'alginate substitués à 10 % (alginamide et alginate ester, 20g/L, figure III-10), on constate un comportement viscoélastique dans les deux cas mais avec une différence significative: l'alginate ester conduit à un comportement de type « gel fort » ( $G'$  varie peu avec la fréquence et  $G'/G''$  est élevé) alors que l'alginamide ne donne pas ces caractéristiques au gel formé. On peut en effet noter que le module visqueux du dérivé alginamide est significativement supérieur à celui de l'alginate ester, ce qui est vraisemblablement lié à la présence de microgels de taille importante.

### III.2.4.2. Régime permanent

La figure III-11 représente la viscosité plateau, mesurée à faible vitesse de cisaillement, des alginates esters et alginamides à des taux de substitution différents et à une concentration de 10g/L. La viscosité au premier plateau newtonien des solutions aqueuses des dérivés esters en C<sub>12</sub> ayant des taux de fixation faibles, de l'ordre de 7 à 10%, n'est que faiblement augmentée par rapport à celle d'une solution d'alginate natif à la même concentration. Par contre, pour les alginamides modifiés en C<sub>12</sub> présentant des taux de substitution équivalents, nous constatons que la viscosité obtenue est très supérieure.

A l'inverse, pour des taux de fixation supérieurs à 10% on constate que la viscosité des solutions d'alginate ester est plus grande que celle des solutions d'alginamide. A titre d'exemple, la viscosité est de 500 000 Pa.s pour un alginate ester <sub>15-AA-C<sub>12</sub></sub> contre 40 000 Pa.s pour un alginamide <sub>15-AA<sub>N</sub>-C<sub>12</sub></sub> à 10g/L. Comme précédemment, ces résultats confirment que les nœuds de réticulation chimique, dans le cas des dérivés alginamides contribuent à limiter la mise en place des interactions hydrophobes intermoléculaires lorsque le taux de substitution dépasse 10%.

La figure III-12 illustre la différence de comportement rhéologique entre l'alginate ester <sub>10-AA-C<sub>12</sub></sub> et l'alginamide <sub>10-AA<sub>N</sub>-C<sub>12</sub></sub> à 20g/L dans l'eau. En régime permanent, il apparaît que la viscosité correspondant au plateau newtonien est à peine plus faible dans le cas de l'alginamide que dans celui de l'alginate ester. C'est surtout la valeur de la contrainte critique, à partir de laquelle la viscosité chute, qui distingue les deux polymères. Ceci rejoint le constat du paragraphe III-2.3.2. En effet, les solutions d'alginamide renferment des agrégats macroscopiques résultants de la réticulation chimique qui prennent place lors de la synthèse. Ces agrégats doivent être faiblement interconnectés. Au contraire, les alginates esters forment un réseau physique continu dans l'ensemble du volume.

A partir de ces courbes, on peut déduire le temps de relaxation le plus long du système. Ce temps est d'environ 700 s pour le dérivé ester. Dans le cas du dérivé amide, ce temps est très long, supérieur à 7000 s. Ainsi que mentionné précédemment, ceci est vraisemblablement lié au fait que la solution d'alginamide s'apparente plus à un empilement d'agrégats peu sensibles au mouvement brownien qu'à un gel continu, à la différence des alginates esters.

A l'aide des résultats de rhéologie et en se référant à la comparaison avec les alginates esters, on peut confirmer les différentes conclusions concernant les structures des gels

obtenus: les alginamides forment des réseaux physiques dans lesquels des macromolécules d'alginate sont liées chimiquement de façon assez dense et forment des agrégats qui établissent des interactions physiques faibles entre eux. Les alginates esters induisent la formation de réseaux physiques par l'intermédiaire d'interactions intermoléculaires entre les macromolécules ayant toujours leur individualité.

A faible taux de substitution, les réticulations chimiques des alginamides sont très espacées et conduisent globalement à augmenter la masse molaire et le volume occupé par les espèces macromoléculaires. Le module élastique et la viscosité des solutions aqueuses d'alginamide sont plus élevés que celui des solutions d'alginate ester du fait de ces réticulations covalentes. Dans ce domaine de taux de substitution, l'effet des groupements hydrophobes demeure limité. Pour des taux de substitution supérieurs à 10%, la réticulation chimique des alginamides devient assez dense pour conduire à la formation d'agrégats macroscopiques dans lesquels les restrictions conformationnelles sont importantes. Ceci limite l'établissement d'interactions intermoléculaires *via* les groupements hydrophobes. Les alginates esters n'ayant pas ce type de restriction conduisent à des modules et des viscosités qui peuvent être plus élevés que les alginamides de même taux de substitution.

### **III.3. Caractérisation des alginates esters et alginamides en milieu salin**

#### **III.3.1 Formation des gels en milieu salin**

Les hydrogels qui seront utilisés pour l'étude biologique (chapitre suivant) sont préparés de façon identique au protocole décrit dans le paragraphe II-2 en présence de sel (NaCl 0,15M) à une force ionique voisine de celle du milieu biologique.

La première constatation expérimentale est la difficulté de dissoudre les alginamides en milieu salin, en particulier pour des taux de greffage en chaînes alkyle C<sub>12</sub> supérieurs à 4%.

Pour favoriser au maximum la solubilisation du polymère dans des solutions de chlorure de sodium 0,15 M, ou tout au moins obtenir des solutions relativement homogènes, nous avons envisagé plusieurs approches. Nous avons tenté dans un premier temps une pré-dissolution de nos polymères dans l'eau, suivie d'une dialyse contre NaCl. Le problème rencontré concerne la difficulté de contrôler de façon répétable la concentration finale en polymère. En effet, un équilibre se produit entre le boudin de dialyse et le milieu extérieur qui provoque des changements de concentration à l'intérieur du boudin. Pour éviter ces variations

de volume, nous avons donc choisi de préparer les gels d'alginate directement par dispersion de la solution de polymère dans NaCl. Généralement, les durées de mise en solution sont longues, souvent supérieures à 24h et les gels obtenus sont encore plus inhomogènes que ceux obtenus dans l'eau, c'est-à-dire constitués d'une phase gel continue au sein de laquelle de très nombreux agrégats sont visibles. Comme précédemment, ces agrégats sont constitués de chaînes polymères fortement réticulées, et leur gonflement, du fait de la force ionique, est encore plus limité que dans l'eau pure.

Par la suite, face à ces difficultés on a travaillé avec des polymères peu greffés, en augmentant la concentration et en contrôlant la dissolution (temps et vitesse d'agitation).

Les problèmes de solubilisation des alginamides n'ont pas permis de mener une étude rhéologique comparative complète et seules les propriétés des gels retenus pour l'étude *in vivo* seront décrites et discutées.

### **III.3.2 Comparaison du comportement rhéologique de solutions d'alginamide et d'alginate ester**

Pour les applications biologiques, nous nous sommes intéressés à l'étude d'un alginate ester  ${}_6\text{AA-C}_{12}$  à 7g /L, 10 g/L, 15g/L, 20g/L et d'un alginamide  ${}_6\text{AA}_\text{N-C}_{12}$  aux concentrations de 30g/L et 40g/L. Ces valeurs de concentrations ont été retenues dans le but d'obtenir des hydrogels suffisamment forts pour assurer leur maintien au niveau de la lésion cérébrale, tout en présentant des propriétés rhéofluidifiantes suffisantes pour permettre leur injection à la seringue. Le taux de greffage retenu peut sembler faible. Cependant, nous avons souhaité utiliser des alginamides faiblement réticulés chimiquement afin de faciliter leur solubilisation. L'étude bibliographique pour tenter d'obtenir des renseignements sur les propriétés rhéologiques des tissus constituant le cerveau du rat s'est révélée peu fructueuse. Citons les travaux de Gefen [Gefen, 2003] qui illustrent la difficulté de donner des valeurs rhéologiques aux tissus. Ces valeurs sont fonction de la technique utilisée pour mesurer les tissus, de l'âge de l'animal, mais aussi de la zone de mesure et de bien d'autres critères. Très récemment, Georges et Coll. [Georges, 2006] ont décrit des modules élastiques de quelques centaines de Pa pour le cerveau de rat. Ils précisent dans leur étude que la croissance des neurones sur gels « mous » se fait aux dépens de celle des cellules gliales. Le contraire est obtenu sur des gels plus « durs ».

En conséquence, nous nous sommes limités aux critères précédents pour choisir les matériaux étudiés.

Les résultats rhéologiques des hydrogels obtenus sont présentés dans les figures III-13 à III-17.

- D'une manière générale, on observe, à taux de substitution équivalent (6%), que la concentration des solutions d'alginamide doit être très supérieure à la concentration des solutions d'alginate ester pour obtenir des propriétés rhéologiques relativement comparables en terme de viscosité et de module élastique (tableaux III-3 et III-4), et ceci bien que dans l'eau et à 10g/L, les dérivés alginamides aient une viscosité et un module élastique supérieurs à ceux des alginates esters (figures III-9 et III-11).

On peut s'interpréter ce résultat sur la base de la structure des deux types d'hydrogels. En présence d'une force ionique élevée, les microgels présents dans les solutions d'alginamide se contractent et forment des objets très compacts, qui interagissent faiblement entre eux. L'effet de la diminution de taille de ces objets sur la viscosité et le module élastique, est compensé par le renforcement des interactions hydrophobes (bien qu'elles soient peu nombreuses) et surtout par l'augmentation de la concentration. Les macromolécules d'alginate ester subissent également une contraction sous l'effet de la force ionique. Mais les interactions hydrophobes étant plus nombreuses et renforcées en présence de sel, la « force » du réseau physique formé augmente de manière beaucoup plus significative, ce qui se traduit par un effet de la concentration en polymère sur les propriétés rhéologiques beaucoup plus marqué que dans le cas des dérivés alginamides.

- Comme précédemment, la contrainte critique à partir de laquelle le réseau se déstructure est dans tous les cas beaucoup plus faible dans le cas des solutions d'alginamide que dans le cas des solutions d'alginate ester. Si l'on calcule le temps de relaxation les plus long de chaque solution, celui des réseaux alginamides est cette fois encore très supérieur à celui des réseaux d'alginate ester.

- Enfin, nous pouvons observer que les modules  $G'$  et  $G''$  des alginates esters sont relativement indépendants de la fréquence pour des concentrations supérieures à 10g/L. Dans le cas des dérivés alginamides, à 30 et 40 g/L,  $G'$  est également supérieur à  $G''$  et augmente

avec la concentration mais les deux modules évoluent également avec la fréquence, ce qui traduit l'existence dans le réseau d'autres temps de relaxation, relativement plus courts que dans le cas des réseaux d'alginate ester.

Pour conclure, les alginates esters forment des réseaux relativement bien structurés et homogènes, par le biais d'associations hydrophobes intermoléculaires qui se mettent progressivement en place lorsque la concentration de la solution en polymère augmente. Ces résultats sont tout à fait cohérents avec ceux obtenus par Rastello dans son travail de thèse [Rastello, 2002].

A l'inverse, les alginamides forment en solution diluée des micro-agrégats stabilisés à la fois par des pontages chimiques et des interactions hydrophobes. Lorsque la concentration de la solution augmente, ces agrégats se rapprochent et forment un réseau dont la stabilisation par interactions hydrophobes intermoléculaires est beaucoup plus difficile en raison de la rigidification du polymère par les pontages chimiques. De ce fait, la formation des interactions hydrophobes intermoléculaires qui se fait généralement en milieu semi dilué au dépend des interactions hydrophobes intramoléculaires, est rendue beaucoup plus difficile dans le cas des solutions d'alginamide et les agrégats (microgels) polymères reliés entre eux le sont de manière beaucoup moins cohésive, d'où la formation de gels plus fragiles et caractérisés par des contraintes de rupture beaucoup plus faibles.

### **III.4. Comportement en présence de calcium**

#### **III.4.1 Mesure des taux de gonflement en présence de calcium**

Dans la thématique des polymères à utilisation biomédicale, le taux de gonflement des hydrogels représente une donnée très importante en fonction des applications envisagées. La porosité du réseau jouera en effet un rôle très important, par exemple sur les cinétiques de libération de principes actifs encapsulés, ou encore sur la prolifération cellulaire lorsque le polymère est utilisé comme matériau de comblement.

Quantifier le changement de volume de l'hydrogel initialement préparé dans NaCl 0,15M puis infiltré par du LCR (NaCl 0,15M, Ca<sup>2+</sup> 1,4 mM) était notre premier objectif.

Mais la première constatation expérimentale concerne l'impossibilité de mesurer le taux de gonflement des alginamides en milieu NaCl 0,15 M, en raison de la fragilité des gels

formés. L'ajout de calcium pour obtenir une concentration finale de 0,0014 M renforce très légèrement la stabilité des billes et nous avons pu dans ce cas mesurer le taux de gonflement. Mais, compte tenu de l'absence de données dans NaCl 0,15M, il n'a pas été possible de quantifier le changement de volume de l'hydrogel d'alginamide, au départ dans NaCl (0,15M), puis infiltré par du liquide céphalo-rachidien (NaCl et  $\text{Ca}^{2+}=0,0014$  M) après son implantation.

Au vu des résultats du tableau III-5, on constate cependant que le taux de gonflement dans NaCl et  $\text{Ca}^{2+}=0,0014$ M est très dépendant du taux de substitution et diminue lorsque le nombre de chaînes alkyles greffées et le taux de réticulation chimique augmentent.

Quantifier le changement de volume des billes lors du traitement par une solution contenant du  $\text{Ca}^{2+}$  5 mM était le deuxième objectif de cette étude puisque l'ajout de calcium dans une solution de cacodylate sera la méthodologie retenue pour stabiliser notre hydrogel d'alginamide et éviter sa désagrégation sur les coupes de cerveau lors des incubations dans différents tampons nécessaires aux analyses biologiques.

On constate que l'ajout de calcium 5mM modifie le volume des billes de façon très significative. Pour l'alginate non modifié, le volume est divisé par 2 lorsqu'on passe d'une concentration en calcium de 1,4 mM à une concentration en calcium de 5 mM. Pour l'alginamide  $\gamma\text{-AA}_N\text{-C}_{12}$ , on remarque que le changement de volume, conséquence du changement de milieu, est d'environ 3,7. Ce polymère a en effet un taux de greffage proche du polymère implanté dans le cadre de l'étude *in vivo*. Cette diminution du volume pourra présenter de graves inconvénients lors de l'examen des coupes en cas de signe de régénération (cf. chapitre IV).

### III.4.2 Caractérisation de la porosité

La question était ensuite de quantifier la taille des pores de l'hydrogel après son implantation dans la cavité lésionnelle. Il est important de répondre à deux questions:

- après l'implantation de l'hydrogel dans la cavité lésionnelle, les pores sont-ils susceptibles d'accueillir les fibres nerveuses en régénération ?
- après traitement par le calcium, les pores de l'hydrogel sont ils susceptibles de conserver le matériel biologique sans le modifier, voire le détruire ?

L'observation au microscope environnemental n'a pas permis de déterminer la taille des pores de l'hydrogel d'alginate ester et d'alginamide à la concentration physiologique. Le manque de stabilité des billes dans ces conditions ne favorise pas l'obtention d'une bonne image (figure III- 18).

La mesure des coefficients de partage avec des pullulanes calibrés aurait pu permettre d'obtenir une idée de la taille des mailles [Mazens, 2006]. Cependant, là encore, le manque de stabilité des billes ne permet pas de doser de façon quantitative les pullulanes et donc d'obtenir un coefficient de partage fiable.

### **III.4.3 Caractérisation des hydrogels utilisés pour l'implantation**

#### **III.4.3.1. Effet de la stérilisation**

Compte tenu de l'application visée, il est clair que les matériaux destinés à être implantés doivent être stériles.

Il existe différentes méthodes de stérilisation des polymères: traitement par l'oxyde d'éthylène, rayonnements ionisants (B ou G) ou encore autoclavage. Cependant, il a été prouvé que toutes ces méthodes ont un effet délétère sur l'alginate, avec comme conséquence une modification de viscosité des solutions, une scission des chaînes de polysaccharides...

Les effets de la stérilisation par chaleur humide (autoclave) sur les propriétés rhéologiques des hydrogels de hyaluronate natif et modifiés ont été mis en évidence précédemment au laboratoire [Pelletier, 1999], [Amargier-Huin, 2005]. Les résultats montrent une altération notable des propriétés rhéologiques après stérilisation (20 minutes, 121°C). L'autoclave peut avoir des effets dégradants soit sur le squelette polysaccharidique, ou sur les liaisons ester entre les fonctions carboxylate et les chaînes alkyles. Ces auteurs proposent une augmentation de la concentration en polymère à la préparation pour pallier notamment la chute de la viscosité.

La technique de stérilisation par rayons ultra-violetts développée dans des laboratoires d'ingénierie tissulaire représente une alternative aux méthodes de stérilisation précédemment citées [Hooper, 1997], [Sintzel, 1997].

Ce traitement est une procédure simple, peu coûteuse et efficace [Philipps, 1999]. La stérilisation par rayonnement UV permet l'élimination des contaminants biologiques

(champignons, bactéries) par exposition à une dose mortelle d'énergie. Dès les années 1930, l'irradiation du sang par les rayons UV est une technique reconnue pour le traitement de certaines infections, comme la poliomyélite ou autres virus [Knott, 1948].

Cependant, différents travaux de Praschak [Praschak, 1998], Kellar [Kellar, 1979] ou encore Gritz [Gritz, 1982] ont mis malgré tout en évidence la dégradation des certains polymères, comme le polyéthylène, le polypropylène ou les polymères flexibles.

Des études ont donc été menées pour vérifier si les propriétés des polymères étaient modifiées de manière importante par exposition aux rayons UV. Fischbach et Coll. [Fischbach, 2001] ont travaillé sur des copolymères diblocs poly(oxyde d'éthylène)-b-poly-(D,L)-acide lactique pour des applications en ingénierie tissulaire: ils ont montré que la stérilisation par irradiation UV pendant une durée de 2 heures était une technique appropriée pour ces polymères, mais qu'il était nécessaire de bien contrôler la durée d'exposition aux rayons UV pour ne pas altérer leurs propriétés. En effet, un traitement prolongé (5 heures) dégrade le copolymère et altère l'adhésion des cellules sur les films de POE-b-PLA. Les mécanismes contribuant à cette dégradation peuvent être une photooxydation (mécanisme courant pour les polymères synthétiques) et un clivage des liaisons ester présentes dans les polymères biodégradables.

Wasikiewicz [Wasikiewicz, 2005] a étudié la dégradation de l'alginate et du chitosane en solution par différentes techniques, notamment par UV. L'auteur conclut à une dégradation de l'alginate, par création de radicaux libres en solution pour des temps d'exposition de 0 à 5 minutes après exposition à des rayonnements ultra violet, sans préciser la longueur d'onde utilisée (1 kW):  $\overline{M}_w$  initial = 2, 16.10<sup>6</sup> g/mol ;  $\overline{M}_w$ , 5min = 5, 37. 10<sup>4</sup> g/mol.

Le procédé de stérilisation appliqué à nos polymères à l'état solide dans le cadre de leurs implantations sera une exposition à des rayonnements ultra-violet sous lampe germicide (45 min, 254 nm).

D'après les figures III-19 et III-20, on constate que le traitement de stérilisation des polymères d'alginate ester n'a pas de conséquence significative sur leurs propriétés rhéologiques. Les résultats relatifs aux alginamides sont similaires. Aucune variation significative des propriétés rhéologiques n'a été observée. On peut conclure que ce procédé de stérilisation ne dégrade pas les chaînes de polymères, conséquence probable de l'état solide du polymère au moment de la stérilisation.

### III.4.3.2. Caractérisation rhéologique

Sont rassemblées sur les figures III-21 à III-27, les caractérisations rhéologiques à différentes concentrations des hydrogels implantés chez les animaux lésés (chapitre IV). La discussion succincte des propriétés rhéologiques suivra la chronologie d'implantation de ces hydrogels chez les animaux lésés.

Le premier hydrogel d'alginate ester  $_{7,5}$ -AA-C<sub>12</sub> appartient à la première famille d'hydrogels implantés dans le cadre de nos travaux, avant que des gels d'alginamide aient été préparés. Il n'a pas donné lieu à une étude rhéologique complète sachant que ces propriétés rhéologiques ont été très étudiées par le passé. Celui-ci se dissout sans difficulté à une concentration de 20g/L dans une solution de chlorure de sodium 0,15M. Pour des raisons pratiques (manque de polymère), l'étude rhéologique n'a été réalisée qu'à une concentration de 7 g/L. En régime oscillatoire (figure III-21), on peut toutefois mettre en évidence que  $G'$  est supérieur à  $G''$  (Tangente  $\delta$  inférieure à 1) ce qui caractérise un comportement de type solide viscoélastique, bien que la concentration en polymère soit plus faible que celle de la solution injectée.

En régime permanent (figure III-22), on constate que l'hydrogel est rhéofluidifiant, propriété déjà établie, permettant son injection au moyen d'une seringue.

La deuxième famille d'hydrogels implantés est celle des alginamides. Différents hydrogels, ont été préparés à différentes concentrations et le choix s'est arrêté sur un alginamide  $_{8}$ -AA<sub>N</sub>-C<sub>12</sub>. Les alginamides plus substitués sont beaucoup plus réticulés et de fait moins solubles dans l'eau.

L'hydrogel d'alginamide a été préparé à 20 g/L dans du chlorure de sodium 0,15 M. Des difficultés de préparation, conséquences de sa faible solubilité, ont été rencontrées.

Les figures III-23 et III-24 présentent les résultats relatifs à l'hydrogel d'alginamide. Un comportement de gel fort apparaît à la lecture des rhéogrammes.

Une donnée importante dans le cadre de nos travaux est le temps nécessaire au retour à l'équilibre de notre hydrogel après injection au niveau de la lésion. La figure III-25 représente une diminution de viscosité sous la contrainte suivie d'une reprise de structure. Un temps

d'environ 600 secondes est nécessaire à l'hydrogel pour retrouver son état d'équilibre. Ce temps est similaire au temps nécessaire pendant l'opération après injection de l'hydrogel dans la cavité pour recoudre le scalp du rat.

L'hydrogel d'alginamide fluorescent représente un outil de localisation de l'hydrogel sur les coupes de cerveau qui seront effectuées par la suite. Cependant d'un point de vue physico-chimique, le greffage en faible quantité d'une sonde fluorescente hydrophobe sur une chaîne polysaccharidique peut modifier ses propriétés rhéologiques. Ce polymère fluorescent devra avoir des propriétés rhéologiques semblables au polymère équivalent non fluorescent.

Des changements de comportement rhéologique liés soit à la sonde, soit aux réactions secondaires peuvent accompagner le greffage de ce marqueur. Dans leurs travaux, Batchelor et Coll. [Batchelor, 2002] greffent de la fluorescéineamine au moyen de l'EDC à un taux expérimental estimé à 0,5% par rapport aux motifs sucres. Les auteurs constatent une augmentation de la viscosité de leur alginate après greffage. Mais on peut concevoir que cette variation de viscosité pourrait également s'expliquer par des réactions de réticulations secondaires.

Les résultats que nous avons obtenus sont rassemblés sur la figure III-26 et la figure III-27. On remarque que la fixation d'une sonde fluorescente, au taux théorique de 4 moles de fluorescéine pour 1000 moles de motifs sucres, n'a pas d'influence visible sur les propriétés rhéologiques en régime oscillatoire et en régime permanent, la viscosité au premier plateau newtonien n'étant que légèrement supérieure.

Au vu des résultats rhéologiques, l'utilisation de ce dérivé fluorescent représente donc un modèle convenable.

### **III.5. Hydrolyse des liaisons ester de réticulation chimique**

La démarche utilisée a consisté d'abord à s'assurer que le traitement acide ou basique ne détruit ni le squelette d'alginate et ni les liaisons amide entre les greffons alkyles et l'alginate. Des mesures de masses molaires moyennes en SEC-MALLS, la réalisation d'extraits secs, le dosage des chaînes alkyles et l'analyse des propriétés rhéologiques nous ont permis de réaliser cette étude. Les polymères étudiés sont bien sûr l'alginate natif, les blancs de synthèse

(alginate modifié obtenu sans ajout de dodécylamine mais ayant subi toutes les étapes de synthèse, à 25°C dans le DMF) et enfin les alginamides.

La présence de réticulations chimiques entre les chaînes d'alginate en présence de CMPI conduit à des dérivés dont la solubilité dans l'eau est réduite et dont les propriétés mécaniques sont difficilement modulables pour répondre au cahier des charges fixé. Pour hydrolyser ces pontages chimiques, plusieurs traitements à différents pH ont été testés avec pour objectif la dégradation des liaisons d'auto-réticulation, la non dégradation de la chaîne polysaccharidique et le respect des liaisons amide entre alginate et greffons hydrophobes.

### **III.5.1 Traitement en milieu acide**

#### **III.5.1.1. Dégradation du squelette d'alginate natif**

En milieu acide, les résultats de SEC-MALLS donnant les masses molaires moyennes de l'alginate natif avant et après hydrolyse à pH=3 sont présentés dans le tableau III-6. Ils ne font apparaître qu'une légère dégradation du squelette d'alginate.

Ces résultats préliminaires étant conformes à ce qui était souhaité (non dégradation du polysaccharide), nous avons considéré plus avant l'éventuelle hydrolyse des liaisons ester.

#### **III.5.1.2. Dégradation des réticulations secondaires**

Le moyen retenu pour caractériser rapidement l'hydrolyse des liaisons ester a été d'examiner une éventuelle augmentation de la fraction soluble en milieu aqueux (cf. paragraphe III.2.1). En effet, la présence d'une quantité plus ou moins importante de « microgels » au sein de la « solution » a été attribuée aux réticulations chimiques. Nous avons donc effectué des mesures de solubilité avec des polymères avant et après hydrolyse (tableau III-7). Les résultats sont exprimés en fraction massique de polymère soluble dans la solution. Aucune augmentation importante de la fraction soluble ne peut être mise en évidence, ce qui nous indique que les conditions employées pour l'hydrolyse acide ne permettent pas de rompre les liaisons covalentes entre les chaînes d'alginate.

### III.5.1.3. Stabilité de la liaison amide

Les analyses élémentaires effectuées sur les polymères hydrolysés et non hydrolysés confirment que les liaisons amide sont stables à pH=3, puisque les taux de greffage, 10,7% et 10% respectivement, sont comparables, aux erreurs de mesure près.

### III.5.1.4. Comportement rhéologique

La figure III-28 montre l'évolution de la viscosité de l'alginate natif après traitement acide à pH=3. Les mesures de rhéologie montrent une très faible diminution de la viscosité pour le polymère d'alginate natif hydrolysé.

La figure III-29 illustre l'évolution de la viscosité en régime permanent (a) et celle des modules visqueux et élastique en régime oscillatoire (b) de l'alginate  $_{10}\text{-AA}_N\text{-C}_{12}$  après hydrolyse à pH=3. Les courbes avant et après hydrolyse sont superposées, en conséquence, l'hydrolyse acide à pH=3 pendant 48 heures n'altère pas les propriétés mécaniques du polymère d'alginate, ce qui confirme les résultats décrits précédemment.

Nous n'avons pas tenté d'hydrolyse dans des conditions plus acides car l'alginate commence à se dégrader vers pH=2 [Haug, 1966].

## III.5.2 Hydrolyse en milieu basique non tamponné

### III.5.2.1. Dégradation du squelette d'alginate natif

Les résultats sont rassemblés dans le tableau III-8. Un traitement basique à un pH supérieur à 12 dégrade de façon notable le squelette de l'alginate ce qui conduit à une diminution des masses molaires moyennes en nombre et en masse (déterminées par SEC-MALLS en milieu aqueux).

### III.5.2.2. Hydrolyse des liaisons ester de réticulation chimique

A pH inférieur à 12, nous venons de voir que le squelette d'alginate ne se dégrade que faiblement. Compte tenu de ce résultat, nous avons utilisé un traitement basique à pH de 11,7 de 24 heures pour hydrolyser les ponts ester d'un blanc d'alginate  $_{0}\text{-AA}_N\text{-C}_{12-50}\text{-CMPI-}_{0}$

amine, tout en limitant la dégradation du squelette polysaccharide. Cependant, il apparaît après un test de solubilité que le blanc d'alginate reste réticulé et non soluble, ce qui empêche toute caractérisation. Au contraire, à pH=13 et au delà, le blanc de synthèse est en grande partie dégradé.

A partir de cette étude, il ne nous a pas été possible de définir un créneau de pH pour lequel l'hydrolyse des liaisons ester pourrait avoir lieu de manière sélective.

Toutefois, il convient de noter que le pH des solutions d'alginamide diminue sensiblement au cours du temps (suite vraisemblablement à l'hydrolyse des liaisons ester). Pour pallier ces modifications de pH, nous avons poursuivi cette étude en milieu tamponné.

### **III.5.3 Hydrolyse en milieu basique tamponné**

#### **III.5.3.1. Dégradation du squelette d'alginate natif**

Les tableaux III-9 et III-10, présentent les mesures en SEC-MALLS des masses molaires des alginates natifs et blancs de synthèse ayant subi une hydrolyse en milieu basique tamponné (hydrogénocarbonate de Na, 0,2M) à pH=12 et pH=9 respectivement, pendant 20 minutes, 1 heure et 5 heures. Si on se réfère aux valeurs indiquées, l'alginate de sodium subit une dégradation significative à pH=12, visible après 20 minutes et également à pH=9 après 1h.

Pour une raison non déterminée, il semble donc que l'hydrolyse de l'alginate en milieu tamponné intervient à des pH plus faibles qu'en milieu non tamponné.

#### **III.5.3.2. Dégradation des réticulations secondaires**

A pH=12, les réticulations chimiques secondaires sont détruites par le traitement, au moins partiellement, puisque les blancs de synthèse deviennent solubles et peuvent être analysés en SEC-MALLS, alors qu'avant hydrolyse, le blanc de synthèse ne peut pas être injecté du fait de son manque de solubilité. De plus, pour des temps de contact supérieurs à 20 minutes, les valeurs de masses molaires des blancs sont comparables, voire inférieures à celles de l'alginate natif traité dans les mêmes conditions, ce qui atteste de l'hydrolyse des réticulations secondaires.

Les résultats des extraits secs sur les blancs de synthèse  $0\text{-AA}_N\text{-C}_{12-50}\text{-CMPI-}_0$ -amine hydrolysés à pH=12 et non hydrolysés montrent qu'après centrifugation, il n'y a pas de culot pour les polymères hydrolysés à pH=12 pendant 20 minutes, 1 heure et 5 heures,

contrairement à la référence non hydrolysée. Ceci signifie que le polymère est totalement soluble après ce traitement. L'hydrolyse des réticulations secondaires est ainsi confirmée. En ce qui concerne l'alginamide, le culot après hydrolyse a pratiquement disparu.

A contrario, à pH=9, pour des traitements de 20 minutes et 5 heures, on constate que les blancs de synthèses,  $0\text{-AA}_N\text{-C}_{12-37,5}\text{-CMPI-0-amine}$ , ne peuvent être injectés en SEC-MALLS. On peut penser que ces polymères possèdent un taux de réticulation qui reste encore trop élevé.

### III.5.3.3. Stabilité de la liaison amide

Dans le cas de l'hydrolyse en milieu tamponné à pH=12, le dosage par analyse élémentaire montre que les liaisons amide sont dégradées (tableau III-11a). Ce résultat peut sembler surprenant car en effet, l'hydrolyse de ce type de liaison nécessite souvent des conditions beaucoup plus drastiques, comme par exemple un chauffage énergique alors que nous avons travaillé à température ambiante.

A contrario à pH=9, le dosage par analyse élémentaire montre que les liaisons amide ne sont pas dégradées (tableau III-11b).

### III.5.3.4. Comportement rhéologique

Les figures III-30 et III-31 montrent l'évolution de la viscosité de l'alginate natif et du blanc de synthèse à 10 g/L pour les différentes durées d'hydrolyse à pH=12. La viscosité de l'alginate natif hydrolysé diminue légèrement en fonction du temps d'hydrolyse, ce qui est conforme au résultat de SEC-MALLS montrant une légère dégradation du squelette alginique. L'hydrolyse des liaisons ester de réticulations secondaires par le traitement basique est confirmé (figure III-31) puisque la viscosité du blanc de synthèse chute d'un facteur  $10^6$  et le comportement de la solution de polymère redevient newtonien dans le domaine exploré.

#### IV. Conclusion

En comparant les alginates esters et les alginamides, nous pouvons tirer des conclusions résumées ci-dessous:

- Les propriétés rhéologiques des hydrogels d'alginamide et d'alginate ester en solution évoluent au cours du temps sur une période de deux mois à pH et T° physiologiques. Dans les deux cas, ceci est dû à l'hydrolyse des liaisons ester: soit des liaisons ester de réticulation dans le cas des alginamides, soit des liaisons ester entre les chaînes alkyles et le polysaccharide dans le cas des alginates esters. A l'inverse, les liaisons amide sont stables dans ces conditions.

- Les alginamides présentent une solubilité réduite en milieu aqueux et salin. Cette faible solubilité est liée à l'existence de réticulations chimiques dont l'étendue dépend de la quantité de CMPI utilisée durant la synthèse. Cette quantité augmente avec le taux de substitution visé (cf. chapitre II).

- Les propriétés rhéologiques en milieu aqueux et en milieu salin dépendent, tout autres conditions égales par ailleurs, de deux paramètres: la réticulation chimique et les associations hydrophobes.

En milieu aqueux et salin, les interactions hydrophobes entre les chaînes d'alginamide ont des difficultés à s'organiser de façon optimale en raison des réticulations chimiques qui rigidifient les macromolécules. D'où, des propriétés rhéologiques généralement moins marquées que pour les alginates esters, à taux de substitution comparable, et supérieur à 10. A plus faible taux de greffage, les effets dus à la réticulation chimique sont par compte bien marqués.

Toutefois il est difficile, dans la plupart des cas, de distinguer les parts respectives des ponts de réticulation chimiques et physiques

- D'une manière générale, la nature du milieu (concentration en polymère, force ionique) a une influence plus importante sur les propriétés rhéologiques des dérivés d'alginate ester que sur les dérivés d'alginamide. Pour les mêmes raisons que celles précédemment citées, il est vraisemblable que les dérivés alginamide forment en solution des microagrégats physiques et

chimiques compacts qui sont de ce fait moins susceptibles de s'auto-associer en solution pour former un réseau continu.

- L'hydrolyse des liaisons ester des dérivés alginamides a été testée dans différentes conditions de pH et de durée de réaction mais, nous n'avons pas réussi à déterminer les conditions permettant simultanément la dégradation des liaisons d'auto-réticulation, la non dégradation de la chaîne polysaccharidique et le respect des liaisons amide entre alginate et greffons hydrophobes.

<b>I.</b>	<b>INTRODUCTION</b>	<b>69</b>
<b>II.</b>	<b>MATERIELS ET METHODES</b>	<b>.70</b>
II.1.	L'alginate de sodium	70
II.2.	Etude de l'hydrolyse de l'alginate natif, des alginates esters et des alginamides	70
II.3.	Caractérisation de la solubilité des dérivés de l'alginate	71
II.4.	Mesure du taux de gonflement des hydrogels	72
II.5.	Caractérisation rhéologique des alginamides et des alginates esters en milieu aqueux et en milieu salin	74
II.6.	Caractérisation de la porosité par microscopie environnementale	75
II.7.	Etude de l'hydrolyse des liaisons ester de réticulation chimique	76
<b>III.</b>	<b>RESULTATS</b>	<b>77</b>
III.1.	Stabilité des alginates natifs, des alginates esters et des alginamides vis-à-vis de l'hydrolyse	77
III.1.1	Stabilité de la liaison ester dans l'eau.....	77
III.1.2	Stabilité comparative des liaisons ester et amide en milieu physiologique (LCR).....	78
III.2.	Caractérisation des alginates esters et alginamides en milieu aqueux	81
III.2.1	Solubilité.....	81
III.2.2	Propriétés rhéologiques des solutions aqueuses d'alginate ester.....	81
III.2.3	Propriétés rhéologiques des solutions aqueuses d'alginamide.....	82
III.2.3.1.	En régime oscillatoire.....	82
III.2.3.2.	En régime permanent.....	82
III.2.4	Etude comparative des propriétés rhéologiques des alginamides et des alginates esters.....	84
III.2.4.1.	Régime oscillatoire.....	84
III.2.4.2.	Régime permanent.....	85
III.3.	Caractérisation des alginates esters et alginamides en milieu salin	86
III.3.1	Formation des gels en milieu salin.....	86
III.3.2	Comparaison du comportement rhéologique de solutions d'alginamide et d'alginate ester.....	87
III.4.	Comportement en présence de calcium	89
III.4.1	Mesure des taux de gonflement en présence de calcium .....	89
III.4.2	Caractérisation de la porosité.....	90

III.4.3	Caractérisation des hydrogels utilisés pour l'implantation.....	91
III.4.3.1.	Effet de la stérilisation.....	91
III.4.3.2.	Caractérisation rhéologique.....	93
<b>III.5.</b>	<b>Hydrolyse des liaisons ester de réticulation chimique</b>	<b>94</b>
III.5.1	Hydrolyse en milieu acide.....	95
III.5.1.1.	Dégradation du squelette d'alginate natif.....	95
III.5.1.2.	Dégradation des réticulations secondaires.....	95
III.5.1.3.	Stabilité de la liaison amide.....	96
III.5.1.4.	Comportement rhéologique.....	96
III.5.2	Hydrolyse en milieu basique non tamponné.....	96
III.5.2.1.	Dégradation du squelette d'alginate natif.....	96
III.5.2.2.	Hydrolyse des liaisons ester de réticulation chimique.....	96
III.5.3	Hydrolyse en milieu basique tamponné	97
III.5.3.1.	Dégradation du squelette d'alginate natif.....	97
III.5.3.2.	Dégradation des réticulations secondaires.....	97
III.5.3.3.	Stabilité de la liaison amide.....	98
III.5.3.4.	Comportement rhéologique.....	98
<b>IV.</b>	<b>CONCLUSION</b>	<b>99</b>

*Chapitre IV :*  
*Etude in vivo*

## I. Introduction

Ce chapitre a pour but de présenter les études *in vivo*, relatives à l'implantation d'un biomatériau en tant que pont de régénération dans une cavité lésionnelle cérébrale chez le Rat.

Ce travail fait suite aux travaux encourageants du LN2C, cités et explicités dans le chapitre I (Introduction), concernant l'implantation d'un gel chimique de PHPMA.

Les biomatériaux susceptibles de promouvoir la régénération neuronale dans le Système Nerveux Central (SNC) de mammifères adultes doivent posséder des propriétés en parfaite adéquation avec les exigences physico-chimiques requises pour une implantation *in vivo*. Ils doivent être biocompatibles et bien tolérés par le tissu hôte, être aisément implantables et s'adapter le plus étroitement possible à la forme de la cavité, sans comprimer les tissus avoisinants, permettre un envahissement cellulaire par les fibres nerveuses en voie de régénération, les cellules gliales et les vaisseaux sanguins, et enfin être suffisamment résistants pour permettre une implantation à long terme, la colonisation cellulaire espérée nécessitant des délais de l'ordre de 9 à 12 mois.

L'alginate ester ou l'alginamide que nous avons synthétisés dans ce cadre bénéficient d'atouts certains, en raison notamment de leur caractère rhéofluidifiant et thixotrope, qui permet leur implantation *in vivo* de manière aisée.

L'implantation d'un hydrogel d'alginate ester  $_{7,5}$ -AA-C<sub>12</sub> a été la première réalisée dans le cadre de nos travaux. En solution aqueuse, l'alginate ester forme un hydrogel amphiphile associatif (gel physique), permettant ainsi d'obtenir un réseau tridimensionnel labile susceptible de favoriser l'infiltration cellulaire. Dans le même temps, nous avons développé un nouveau biomatériau, un alginamide  $_{8}$ -AA<sub>N</sub>-C<sub>12</sub>, présentant une meilleure stabilité à l'hydrolyse que l'alginate ester.

L'implantation de ces biomatériaux a été combinée dans certains cas avec l'administration par voie intrapéritonéale d'un traitement pharmacologique susceptible de favoriser la survie et la régénération neuronale.

Pour tester, l'efficacité d'un traitement, il faut définir un modèle. Le modèle retenu concerne la lésion par aspiration des voies septo-hippocampiques dorsales (SHD) dans le

cerveau de rat adulte, permettant la création d'une cavité chirurgicale de quelques millimètres cube. Ce modèle est développé et caractérisé par le LN2C depuis de nombreuses années (figure IV-1). La lésion induit chez les animaux des troubles comportementaux durables, en particulier une hyperactivité locomotrice ainsi que des dysfonctionnements cognitifs, concernant notamment les processus de mémoire à caractère spatial [Cassel, 1997].

Nous nous attacherons dans ce chapitre à présenter la méthodologie qui nous a permis d'optimiser nos biomatériaux et les questions sous jacentes qui se sont soulevées à chaque étape.

Les résultats relatifs à l'implantation à court terme d'un hydrogel d'alginate ester et d'un hydrogel d'alginate amide fluorescent seront présentés et discutés dans une première partie. Ces études préliminaires ont été indispensables avant de pouvoir envisager une étude *in vivo* à long terme.

Dans une seconde partie, les résultats relatifs à l'implantation à long terme (suivi des animaux pendant un an) d'un hydrogel d'alginate amide, combiné ou non à un traitement pharmacologique associant aminoguanidine et putrescine [Muller, 2007] seront présentés. Ces résultats seront discutés d'un point de vue comportemental et morphologique.

Enfin, nous présenterons les résultats d'une étude d'encapsulation des composés pharmacologiques. Ce travail annexe à l'étude *in vivo* représente un premier pas vers des stratégies futures d'implantation de biomatériaux enrichis moléculairement par encapsulation du traitement pharmacologique.

Ces recherches ont été menées, au cours de ces trois années, au Laboratoire de Neurosciences Comportementales et Cognitives (LN2C) à Strasbourg, sous la direction du Dr Schimchowitsch Sarah, en collaboration avec mon collègue doctorant Christophe Muller, et avec la participation de Cécile Courtois (Master de Neurosciences), Martine Clémence (Master Science de la Vie et Santé) et Heike Herbeth (DiplômArbeit).

## **II. Matériels et Méthodes**

### **II.1. Expérimentation animale**

#### **II.1.1 Les animaux**

Les expériences sont réalisées sur des rats mâles adultes de souche Long Evans (centre d'élevage René Janvier), âgés de 6 semaines et pesant 270 à 300 g. Ces animaux, arrivés au laboratoire une semaine avant l'opération, sont placés seuls dans des cages en plexiglas transparent de 49x29x15 cm, avec de la nourriture et de l'eau *ad libitum*. L'animalerie et les

salles de test sont éclairées selon un cycle jour/nuit constant (lumière entre 7 h et 19 h) et maintenues à température (22° C) et humidité (40 %) constantes. Les animaux sont manipulés régulièrement avant l'intervention, afin d'être familiarisés avec l'expérimentateur.

Tous les protocoles impliquant les animaux et leur entretien sont menés en conformité avec les directives nationales (n°8748 du 19 octobre 1987, Ministère de l'Agriculture) et internationales (NIH publication, n082-23 version 85). Chaque expérimentateur titulaire possède une autorisation d'expérimenter individuelle délivrée par le ministère de l'Agriculture.

## **II.1.2 Protocole chirurgical**

### **II.1.2.1. Préparation de l'hydrogel**

*Protocole expérimental:*

*Avant utilisation, le polymère est stérilisé à sec par exposition à des rayonnements ultraviolets (254 nm) sous lampe germicide pendant 45 minutes. Le polymère est ensuite dissout dans du NaCl stérile 0,15M à 20 g/L. Après faible agitation mécanique pendant 24 heures, le mélange est centrifugé 30 minutes à 5000 tr.min<sup>-1</sup> pour éliminer les bulles d'air. L'hydrogel est introduit par aspiration dans une seringue de façon à pouvoir être injecté dans la cavité lésionnelle.*

### **II.1.2.2. La lésion et l'implantation de l'hydrogel**

*Protocole expérimental:*

*Les animaux sont anesthésiés avec un mélange de xylazine / kétamine (0,22 ml / 100 g, dose pour 1 h d'anesthésie profonde) administré par voie intrapéritonéale (ip) à raison de 0.85 et 6.75 mg/kg respectivement. Le scalp est tondu et le rat est fixé dans un cadre stéréotaxique, puis enveloppé dans une couverture de survie. Le scalp est incisé longitudinalement et dégagé afin de laisser apparaître la boîte crânienne et les repères anatomiques. Le crâne est ensuite fraisé entre Bregma - 1,8 mm et Bregma - 2 mm (coordonnées antéro-postérieures), de part et d'autre de la suture centrale pour ne pas léser le sinus veineux, et la dure mère est incisée. Une pipette Pasteur incurvée connectée à une trompe à vide est introduite. L'aspiration se fait jusqu'à une profondeur de - 5 mm*

*(coordonnée dorso-ventrale donnée par rapport à la surface du crâne) pour éliminer le cortex, le corps calleux et la fimbria-fornix sous-jacente. De la gaze hémostatique est insérée dans la cavité, de manière à stopper le saignement provoqué par l'aspiration. Elle est retirée après quelques minutes. L'hydrogel sera injecté de façon bilatérale pour combler la cavité lésionnelle (ordre de volume de 18 mm<sup>3</sup>).*

*Les rats sont ensuite suturés au niveau du scalp. Toutes les opérations chirurgicales sont réalisées en conditions aseptiques.*

Une fois l'intervention chirurgicale terminée, les rats reçoivent une injection de 0,3 ml d'antibiotique (Extencilline® à 2 400 000 U.I. / kg) en intra-musculaire (im), afin d'éviter tout risque d'infection au niveau de la cavité. Le saignement provoqué par l'aspiration étant relativement important, on leur administre également une injection de 2 ml de NaCl stérile à 0,15M. Les rats sont gardés au chaud sous une lampe jusqu'à leur réveil, puis remis dans leur cage d'élevage.

Des rats pseudo-opérés (témoins) sont utilisés comme contrôle. Ils subissent toutes les étapes chirurgicales jusqu'au fraisage du crâne inclus, mais aucune lésion des tissus cérébraux n'est réalisée.

### **II.1.2.3. Traitement pharmacologique AP**

Le traitement pharmacologique AP consiste en une injection unique par voie ip d'un mélange de putrescine (10 mg/kg) et d'aminoguanidine (320mg/kg), dilué dans du NaCl 0,15M à raison d'un volume final de 1 ml/ rat. Les animaux témoins reçoivent 1 ml de solution saline. Le traitement est administré en fin de période d'anesthésie, pour limiter l'interaction létale entre les composés pharmacologiques et l'anesthésique. Cette interaction se traduit par la formation d'un précipité lorsque les différents composés sont mélangés dans un tube à essai.

### II.1.2.4. Tableau récapitulatif des expériences

Est donnée, dans ce tableau, la nature des groupes des quatre études *in vivo*

Implantation	Groupes d'animaux	Nombre	Etude
Alginate ester (7,5-AA-C <sub>12</sub> ) 6 semaines	• Témoins	4	Morphologie
	• Lésés	6	
	• Lésés – Hydrogel	6	
Alginamide (8-AA <sub>N</sub> -C <sub>12</sub> à 20g/L) 2 semaines	• Lésés	2	Morphologie
	• Lésés – Hydrogel	4	
Alginamide –FITC (8 théorique-AA <sub>N</sub> -C <sub>12</sub> à 20g/L) 1 semaine à 1 mois	• Lésés	3	Morphologie
	• Lésés – Hydrogel	6	
Alginamide (8-AA <sub>N</sub> -C <sub>12</sub> à 20g/L) 11 mois	• Témoins	11	Morphologie Activité locomotrice Test sensorimoteur Piscine de Morris
	• Témoins - AP	9	
	• Lésés	10	
	• Lésés - AP	4	
	• Lésés - Hydrogel	11	
	• Lésés - Hydrogel – AP	8	

## II.2. Etude comportementale

Ces études ont pour but de détecter les modifications comportementales traduisant l'influence de la lésion, du traitement pharmacologique et de l'implantation de l'hydrogel.

Les tests comportementaux que nous avons utilisés dans les expériences présentées ont été sélectionnés en raison de leur sensibilité aux effets d'une lésion des voies SHD.

### **II.2.1      Activité locomotrice en cage d'élevage**

Les rats, dans leur cage d'élevage, sont amenés dans la salle d'actographie. Chaque cage est introduite entre deux cellules photoélectriques placées à 2 cm du sol et à 4 cm de chacune des extrémités de la cage. La coupure successive des 2 faisceaux de lumière infrarouge est enregistrée par un ordinateur qui comptabilise ainsi le nombre de passages de l'animal d'une extrémité à l'autre de sa cage. L'activité globale des rats est enregistrée durant une période de 24h qui comprend une phase diurne de 10h (dont 3h d'habituation), suivie d'une phase nocturne de 12h et enfin d'une dernière phase diurne de 2h (figure IV-2).

### **II.2.2      Test de franchissement de la barre**

Ce test permet d'apprécier les capacités sensori-motrices des rats, les animaux devant apprendre à se déplacer sur une barre étroite et surélevée, sans glisser ni prendre appui sur les bords latéraux de la barre.

Dispositif expérimental (figure IV-3)

Le dispositif consiste en une barre de bois (longueur 2 mètres, largeur 2.4 cm) placée à 80 cm au dessus du sol et divisée virtuellement en quatre secteurs de 50 cm chacun. La barre est éclairée par un néon fixé parallèlement à celle-ci et situé à 2 mètres au dessus du sol. Le rat est placé par l'expérimentateur à une extrémité de la barre, la tête tournée vers sa cage d'élevage placée à l'autre extrémité. Un filet disposé sous la barre prévient les chutes.

*Protocole expérimental:*

*Pendant la phase pré-opératoire, les rats ont été familiarisés à la tâche par des distances à parcourir de plus en plus longues: de 50 cm (un secteur) le premier jour à 3 fois la totalité de la barre (2 m, 4 secteurs) le 5<sup>ième</sup> jour, jour d'évaluation.*

*Le rat se voit attribuer 1 point par secteur correctement franchi (sans glissade et sans appui latéral) pour un score maximum de 12. Aux différents délais post-opératoires choisis, les rats ont été refamiliarisés à la tâche pendant 4 jours avant d'être évalués le 5<sup>ième</sup> jour.*

### II.2.3 Piscine de Morris

Ce test a été conçu par Morris (1983) pour évaluer les capacités à mémoriser et à gérer de l'information spatiale dans une situation aversive (l'eau froide) pour le rat.

De nombreux protocoles ont été développés pour ce test, afin de distinguer différentes composantes de la mémoire, mais également pour essayer de déceler les stratégies utilisées par les animaux pour se repérer dans l'espace à l'aide d'indices de localisation de la plate-forme (indices disposés aux murs et plafond de la pièce entourant la plate-forme).

Compte tenu des mauvaises performances attendues des rats lésés, nous avons choisi un protocole extrêmement simplifié, la plate-forme restant géographiquement à la même place tout au long du test. Elle est visible les 3 premiers jours, c'est-à-dire dépassant de quelques centimètres de la surface de l'eau, puis rendue invisible par immersion complète les 4 jours de test suivants.

#### Dispositif expérimental (figure IV-4)

Une piscine de 160 cm de diamètre et 60 cm de hauteur est remplie à la moitié de sa hauteur. L'eau, à une température de 19-21°C, est rendue opaque par addition de lait lyophilisé. L'expérimentation a lieu dans une pièce où sont présents de nombreux indices, disposés sur les murs et au plafond.

La piscine, orientée selon 4 points cardinaux, est divisée en 4 quadrants virtuels de surface équivalente.

Une plate-forme de 11 cm de diamètre a été disposée à une place fixe dans le quadrant NW pour toute la durée de l'expérience.

#### *Protocole expérimental:*

*Les rats ont été testés pendant 3 jours avec la plate-forme visible, puis pendant 4 jours avec la plate-forme invisible.*

*Ils sont soumis à 4 essais quotidiens au cours desquels ils sont lâchés à des points différents de la piscine, la tête tournée vers la paroi de la piscine. Ils disposent de 60 secondes pour trouver la plate forme et s'y reposent pendant 10 secondes avant l'essai suivant. Si le rat n'a pas trouvé la plate forme dans le délai imparti, l'expérimentateur l'y dépose pendant 10 secondes.*

Lors du dernier essai du 7<sup>ème</sup> jour, la plate-forme a été enlevée de la piscine et les déplacements des rats ont été enregistrés par caméra vidéo pendant 60 secondes. A l'issue des essais quotidiens, les rats sont séchés dans une serviette éponge et remis dans leur cage d'élevage.

## **II.2.4 Analyse statistique**

Une ANOVA à mesures répétées suivie d'un test de Newman-Keuls a été effectuée uniquement sur les résultats de l'actographie pour initiation à l'analyse statistique. En fait, le groupe Lésés-AP ne présentant que 4 animaux en raison d'un taux de mortalité élevé après les opérations (interaction anesthésique/traitement décelée trop tardivement), aucune analyse statistique réglementaire ne peut être effectuée.

## **II.3. Etude morphologique**

### **II.3.1 Préparation des tissus**

#### **II.3.1.1. Fixation des tissus par immersion**

*Protocole classique:*

*Les rats sont sacrifiés X semaines après l'opération, après anesthésie profonde au pentobarbital sodique (100 mg / kg) administré par voie ip. Les cerveaux prélevés sont congelés dans de l'isopentane refroidi à - 35° C et coupés au cryostat, en coupes longitudinales de 30 µm d'épaisseur. Ces coupes sont récupérées sur lames gélatinées refroidies dans l'enceinte du cryostat et conservées à - 20° C avant utilisation. Elles seront fixées par immersion:*

*- dans une solution tamponnée (tampon phosphate 0,1M pH=7,4) de formaldéhyde (PAF) à 4%, pendant 30 min à 4° C pour les marquages immunocytochimiques.*

*- dans un bain d'éthanol absolu à 4°C pendant quelques minutes pour les colorations histologiques au bleu de méthylène et au bleu de toluidine (première étude in vivo).*

### **II.3.1.2. Fixation des tissus par perfusion**

*Protocole classique:*

*Après anesthésie profonde au pentobarbital sodique (100 mg / kg), les rats reçoivent une perfusion intra-cardiaque de 60 ml d'une solution de PAF. Après post-fixation de 2 h dans le même fixateur, les cerveaux sont déposés dans une solution cryoprotectrice tamponnée de D-saccharose à 30 %, pendant environ 36 h, avant d'être congelés dans de l'isopentane refroidi à - 35° C. Des coupes longitudinales d'épaisseur variable sont réalisées à l'aide d'un cryostat. Les coupes de 30 µm sont montées sur des lames gélatinées puis séchées à température ambiante avant coloration histologique. Les coupes de 60 µm sont conservées flottantes dans un milieu de cryoprotection à base de glycérol et conservées à - 20° C avant marquage immunocytochimique.*

### **II.3.2 Histologie**

#### **II.3.2.1. Coloration au violet de crésyl**

Le violet de crésyl est un composé basique qui teint en violet les composants acides de la cellule, et en particulier les acides nucléiques du noyau.

*Protocole expérimental:*

*Après rinçage, les lames sont placées dans une solution de violet de crésyl chauffée à 50°C. Elles sont ensuite rincées, déshydratées dans des bains d'éthanol de concentration croissante (70°, 95° puis 100°) et montées sous lamelle dans de l'Eukitt (Baume d'inclusion incolore, neutre, insensible à la lumière, à la chaleur et au froid jusqu'à -17°C. Son indice de réfraction est assimilable à celui du verre. Il se solidifie en 20 minutes).*

#### **II.3.2.2. Coloration au bleu de méthylène**

Le bleu de méthylène est utilisé pour la coloration des cellules. Il a été également utilisé pour colorer l'hydrogel sur les coupes.

*Protocole expérimental:*

*Les lames sont immergées pendant quelques secondes dans une solution à 2% de bleu de méthylène filtrée avant utilisation. Elles sont ensuite montées sous lamelle après rinçage.*

### **II.3.2.3. Coloration au bleu de toluidine**

Cette coloration métachromique est peu spécifique et colore les mucopolysaccharides acides, carboxylés, sulfatés ou phosphatés.

*Protocole classique:*

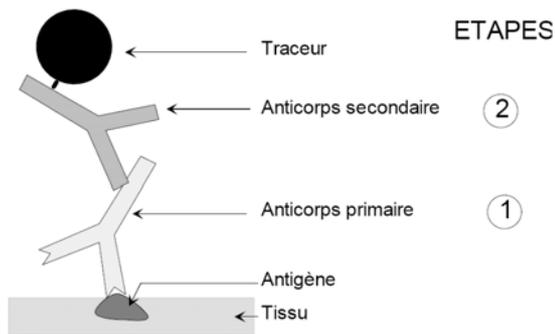
*Le bleu de toluidine (Réactifs RAL, France) est préparé à  $4\text{g.L}^{-1}$  dans de l'eau distillée. Les lames sont immergées pendant quelques secondes dans cette solution. Elles sont ensuite lavées 3 fois 30 secondes dans du tampon et montées sous lamelle avant d'être observées au microscope optique.*

### **II.3.3 Immunocytochimie**

Les marquages immunocytochimiques ont pour objectifs de détecter la présence de cellules gliales (marquage de la GFAP, protéine acide fibrillaire des cellules gliales), et la présence de cellules nerveuses (marquage des neurones cholinergiques par la ChAT, enzyme de synthèse de l'acétylcholine, et marquage des axones par un anticorps dirigé contre les neurofilaments phosphorylés).

Ces marquages sont réalisés selon une technique "sandwich", les anticorps secondaires marqués étant dirigés contre l'espèce productrice des anticorps primaires.

Le principe général de cette technique est illustré par le schéma ci-dessous (extrait de [Garaud, 2004]).



Le tableau ci-dessous résume l'ensemble des anticorps primaires utilisés.

Antigène	Espèce productrice	Provenance	Dilution
ChAT	Mouton	Chemicon	1/200
GFAP	Lapin	Chemicon	1/1000
Neurofilaments phosphorylés	Souris	DSHB	1/1000

Les anticorps secondaires anti-souris, anti-lapin et anti-mouton, biotinylés ou couplés à la fluorescéine (Vector et Chemicon respectivement), sont dilués au 1/200.

*Protocole classique:*

*3 rinçages de 5 min des coupes flottantes dans du tampon phosphate salin (PBS), préincubation des coupes ou des lames dans du diluant [PBS additionné de 0.5 % de Triton X100 et de merthiolate (20 mg/100 ml)] en présence de 10% de sérum d'âne pour saturer les sites non spécifiques de fixation des anticorps, incubation dans l'anticorps primaire (12 h à température ambiante), 3 rinçages au PBS, incubation dans l'anticorps secondaire (1h à température ambiante).*

*Pour les anticorps secondaires couplés à un fluorochrome:*

*3 rinçages au PBS, coloration éventuelle des noyaux cellulaires au Hoechst: incubation des coupes 15 min à l'obscurité dans une solution de Hoechst diluée au 1/400<sup>e</sup>, montage sous lamelle dans un milieu de montage anti-fading composé de polyvinyl alcool (20% dans du TRIS) et de para-phénylène diamine (1 mg/ml)*

Pour les anticorps secondaires biotinylés:

3 rinçages au PBS, incubation dans une solution d'avidine-peroxydase (kit ABC, Vector) 1h à l'obscurité, 2 rinçages au PBS, 1 rinçage au TRIS, 1h d'incubation à l'obscurité dans une solution de diaminobenzidine en présence de peroxyde d'hydrogène, substrat de la peroxydase (kit DAB, Vector), rinçages au PBS, dépôt des coupes flottantes sur lames gélatinées et séchage, déshydratation et montage sous lamelle dans l'Eukitt®.

Les contrôles de spécificité ont été réalisés en effectuant l'ensemble du protocole en absence de l'anticorps primaire. Aucun marquage n'est détecté dans ces conditions sur nos préparations.

### **II.3.4 Marquages hodologiques**

L'objectif de ces marquages, réalisés par injection de traceurs fluorescents qui vont être captés par les cellules nerveuses et diffuser dans l'ensemble du corps cellulaire et de ses prolongements, est de détecter les fibres nerveuses ayant réussi à traverser l'hydrogel pour aller reconnecter la structure cible.

Le traceur rétrograde, le Fluorogold migre de la terminaison synaptique au corps cellulaire. Il est injecté dans l'hippocampe pour une observation dans le septum.

Le traceur antérograde, le Dye I, migre du corps cellulaire jusqu'aux terminaisons synaptiques. Il est injecté dans le septum pour une observation dans l'hippocampe.

*Protocole chirurgical d'injection des traceurs fluorescents:*

*Les animaux sont anesthésiés avec le mélange xylazine / kétamine précédemment décrit. Après avoir placé l'animal dans un cadre stéréotaxique et incisé le scalp, on réalise une microinjection bilatérale au niveau de l'hippocampe dorsal (coordonnées par rapport au Bregma: AP -3,2 mm, MD  $\pm$  3,5 mm, DV -4,8 mm). 0,5  $\mu$ l /site d'une solution de fluorogold à 4% (Fluorochrome) sont injectés à un débit de 0,1  $\mu$ l/ minute. La canule d'injection est laissée en place encore 3 minutes avant d'être remontée lentement.*

*Au niveau du septum médian (AP +0,6 mm, MD  $\pm$  0,2mm, DV -7,2mm), on réalise une micro- injection bilatérale de D.I (solution à 4% ; Molecular Probes).*

*Les rats sont ensuite suturés au niveau du scalp et remis, après réveil, dans leur cage d'élevage.*

L'observation des coupes a été réalisée à l'Institut de Biologie Moléculaire des Plantes (IBMP) à Strasbourg, en microscopie confocale (microscope Zeiss LSM 510).

*Protocole expérimental:*

*Les rats ont été sacrifiés 4 jours après l'injection des traceurs et les cerveaux congelés dans de l'isopentane.*

*Les coupes au cryostat sont fixées pendant 30 min à 4° C dans une solution de formaldéhyde tamponnée (cacodylate 0,05M supplémentée en calcium 5 mM). Elles sont ensuite rincées dans le tampon cacodylate et montées sous lamelle dans un milieu anti-fading avant observation.*

## **II.4. Encapsulation de principes actifs**

Au lieu d'injecter le traitement par voie intrapéritonéale, nous avons étudié la possibilité d'encapsuler, dans des hydrogels d'alginate 10-AA<sub>N</sub>-C<sub>12</sub> et dans des hydrogels d'alginate ester 10-AA-C<sub>12</sub> la putrescine et l'aminoguanidine, deux molécules favorisant potentiellement la régénération neuritique. Grâce à leurs fonctions amine ionisées aux pH physiologiques, elles sont susceptibles d'être retenues dans l'hydrogel par le biais de liaisons électrostatiques et libérées progressivement. Notre but a donc été d'étudier la capacité du gel pour de ces 2 molécules. Cette étude a nécessité la mise au point d'un protocole fiable et reproductible de dosage des fonctions amine par spectroscopie UV-Visible.

### **II.4.1 Détermination des interactions entre l'hydrogel et le principe actif**

Dans un premier temps, nous avons calculé la charge théorique maximale  $Q_{\max}^{\text{th}}$  de principe actif pouvant être incorporé dans 1ml de gel par interactions ioniques, en posant l'hypothèse qu'un groupement  $\text{COO}^-$  interagit ioniquement avec un seul groupe amine de la molécule de principe actif, et donc qu'il n'y a pas de réticulation ionique du gel par la molécule de principe actif. En effet, la putrescine et l'aminoguanidine possèdent plusieurs fonctions amine qui pourraient réagir chacune avec un groupement carboxylate du polymère.

La première expérience réalisée permet d'évaluer la quantité  $Q$  de principe actif incorporé dans 1ml de gel lorsque la quantité de principe actif introduite dans la solution est très inférieure à la capacité théorique  $Q_{\max}^{\text{th}}$  soit  $10\% Q_{\max}^{\text{th}}$ .

Dans un second temps, nous déterminons la capacité réelle maximale du gel  $Q_{\max}$  à partir d'une solution contenant un excès de principe actif, soit deux fois la capacité théorique  $Q_{\max}^{\text{th}}$ .

L'hydrogel est mis au contact d'une solution de NaCl et CaCl<sub>2</sub> contenant le principe actif. A l'équilibre, on mesure la concentration en amine dans la solution  $C_{\text{eq}}$  par dosage UV-Visible et par différence, on en déduit la quantité  $Q$  de principe actif dans le gel.  $Q$  est ensuite comparée à la capacité de saturation théorique  $Q_{\max}^{\text{th}}$  de l'hydrogel. Un exemple de calcul de la capacité de saturation de l'hydrogel est donné en annexe 3 de ce mémoire.

#### *Protocole expérimental:*

*Une solution mère de NaCl 0,167 M et Ca<sup>2+</sup> 1,56.10<sup>-3</sup> M est préparée de manière à obtenir, avec 8,5 ml de cette solution en tenant compte du volume de gel (1ml à 20g/L), une concentration finale en ions identique à celle du liquide céphalorachidien. A partir de cette solution sont préparées 4 solutions contenant des quantités de putrescine et d'aminoguanidine correspondant à  $10\% Q_{\max}^{\text{th}}$  et  $2.Q_{\max}^{\text{th}}$ . Les polymères d'alginamide, d'alginate ester et d'alginate natif sont dissous dans de l'eau ultra-pure (milliQ, système de filtration Millipore) à 20 g/l pendant 24 heures. 1ml d'hydrogel est mis en contact de 8,5 ml de chacune des solutions précédentes dans des tubes pendant 5 jours jusqu'à obtention de l'équilibre. Ils sont ensuite centrifugés pendant 45 minutes à 5000 t/min, puis 2 prélèvements sont effectués par tube, pour déterminer  $C_{\text{eq}}$  par spectrométrie UV-Visible.*

#### **II.4.2 Dosage des principes actifs**

La technique de dosage UV-Visible est basée sur le dosage des groupements amine des principes actifs par l'acide trinitrobenzensulfonique (TNBS), ou acide picrylsulfonique. Un complexe amine – TNBS se forme, l'étude de son absorption dans l'UV-Visible nous permettra de déterminer la concentration en amine, selon la loi de Beer-Lambert:

$$A = \epsilon l c = k c$$

A: absorbance (DO) du complexe     $\epsilon$ : coefficient d'extinction molaire en  $\text{l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$

l: épaisseur traversée en cm        c: concentration du complexe amine - TNBS en  $\text{mol.l}^{-1}$

Ce protocole qui consiste à établir une relation entre l'absorbance du complexe et la concentration en amine, a été appliqué pour la mise au point de la droite d'étalonnage. Nous avons dans un premier temps vérifié que la réaction présente une réponse dans l'UV-Visible quantitativement exploitable, en nous basant sur des données de la littérature [Cayot, 1997], notamment un temps de réaction de 15 minutes. Le TNBS présente une absorption très importante dans l'UV aux alentours de 250 nm; pour éliminer ce pic nous utilisons un blanc de TNBS dilué dans un tampon borate. La mise au point de la droite d'étalonnage implique la détermination précise de la gamme de concentration correspondant à la zone de linéarité, par dilutions successives dans une solution de NaCl et CaCl<sub>2</sub> à partir d'une solution initiale d'amine. La quantité de TNBS doit être en excès par rapport à celle d'amine, sans que le pic de l'acide picrique ne soit trop élevé. Le tampon utilisé pour la dilution du TNBS est du borate à pH 10, de manière à maintenir l'amine sous forme basique, et favoriser ainsi la réaction.

*Protocole initial: mesure de densité optique:*

*L'absorbance est mesurée à 420 nm pour la putrescine et 500 nm pour l'aminoguanidine, pour les cinq étalons 15 minutes après le début de la réaction, ce qui permet de tracer la droite d'étalonnage  $A=f(c)$ .*

Compte tenu des résultats non précis obtenus avec ce protocole, une seconde méthode a été mise au point, basée sur la cinétique de la réaction à partir de l'instant initial de mise en contact de l'amine et du TNBS.

*Protocole expérimental:*

*200  $\mu\text{l}$  de TNBS sont dilués dans 20 ml de tampon borate 0,2 M. 30 mg d'amine sont dissous dans 50 ml de NaCl 0,15 M et CaCl<sub>2</sub>  $1,4.10^{-3}$  M, puis 400  $\mu\text{l}$  de cette solution sont dilués dans 9,6 ml de NaCl et CaCl<sub>2</sub>. 5 étalons et un blanc sont préparés de la manière suivante:*

	<i>Etalon I</i>	<i>Etalon II</i>	<i>Etalon III</i>	<i>Etalon IV</i>	<i>Etalon V</i>	<i>Blanc</i>
<i>Amine diluée (ml)</i>	2	1,5	1	0,5	0,2	
<i>NaCl+CaCl<sub>2</sub>(ml)</i>	0	0,5	1	1,5	1,8	2
<i>TNBS dilué (ml)</i>	2	2	2	2	2	2

2 ml de chaque échantillon, éventuellement préalablement dilué dans la solution de NaCl et CaCl<sub>2</sub>, sont mélangés à 2 ml de TNBS.

*Protocole appliqué pour le dosage des échantillons: calcul de la pente à l'origine*

*Pour chaque étalon, une cinétique en fonction du temps  $A=f(t)$  pendant 15 minutes est réalisée, à partir de laquelle la pente à l'origine ( $p$ ) est déterminée. La droite d'étalonnage est la droite  $p=f(c)$ . Chaque échantillon est dosé trois fois de cette manière, après dilution éventuelle.*

### **III. Résultats expérimentaux**

#### **III.1. Etude in vivo**

##### **III.1.1 Implantation à court terme d'un alginate ester**

###### **III.1.1.1. Etude morphologique**

Les observations macroscopiques obtenues après 1 mois d'implantation *in vivo* des hydrogels d'alginate ester (7,5-AA-C<sub>12</sub>) semblent montrer leur bonne insertion au niveau de la cavité lésionnelle cérébrale (figure IV-5). Les hydrogels semblent bien tolérés par le tissu hôte, sans réaction inflammatoire manifeste. Ils épousent étroitement les contours de la cavité, sans compression apparente des tissus avoisinants.

Nos premiers essais de fixation des tissus cérébraux par perfusion intracardiaque des animaux à l'aide d'une solution à 4° C de formaldéhyde 4 % dans un tampon phosphate 0,1 M (PAF), selon le protocole histologique classique, ont montré à l'échelle macroscopique une désagrégation manifeste des hydrogels. Nous avons retrouvé, après perfusion, des cavités lésionnelles béantes, analogues à celles observées chez les animaux n'ayant pas reçu d'implantation d'hydrogel.

Nous avons donc abandonné ce protocole pour n'utiliser que la méthode de fixation des tissus par immersion, les coupes au cryostat des cerveaux congelés immédiatement après prélèvement étant incubées pendant 10 minutes dans du PAF à 4° C.

La coloration des coupes au bleu de méthylène, réalisée sans fixation préalable des tissus, nous a permis d'étudier l'insertion de l'hydrogel d'alginate ester dans la cavité lésionnelle (figure IV-6), bien que l'hydrogel retienne faiblement ce colorant. Si l'hydrogel semble épouser étroitement le tissu hôte sur certains bords de la cavité, il peut aussi présenter par endroit des signes de rétraction ou de dégradation (figure IV-6, à gauche). D'autre part, sa coloration n'est pas homogène, montrant des plages de densité différentes. Enfin, il était parfois difficile de le localiser avec certitude dans la cavité.

Suite à ces résultats, un test de solubilité de l'hydrogel a été réalisé pour vérifier sa stabilité dans ces conditions. Des fragments d'hydrogel d'environ 1 cm<sup>3</sup> ont été déposés dans des tubes à essai contenant du PAF ou à titre de comparaison du tampon phosphate 0,1 M sur une durée de 24 heures. Il est apparu une désagrégation rapide de l'hydrogel d'alginate ester dans les deux solutions. L'hydrogel gonfle dans un premier temps et perd ensuite ses propriétés mécaniques en se désagréant d'autant plus rapidement que le tube à essai est soumis à une agitation douce.

Une telle constatation était problématique: si l'hydrogel d'alginate ne peut pas être fixé par le PAF et se désagrège lorsqu'il est plongé dans une solution, comment envisager d'appliquer des protocoles de marquages immunocytochimiques, nécessitant des incubations longues et dans différents bains, marquages cependant indispensables pour suivre l'envahissement éventuel de l'hydrogel par du matériel biologique (fibres nerveuses, cellules gliales, cellules endothéliales...)? D'autre part, en se désagréant, l'hydrogel ne risquait-il pas d'endommager ou de décoller de la coupe ce matériel biologique, faussant ainsi les évaluations ?

En prenant beaucoup de précautions (réduction des temps d'incubation, absence de détergent dans les milieux, agitation réduite au maximum par incubation des coupes à plat...), nous avons essayé de réaliser un marquage immunocytochimique sur nos préparations, après fixation des coupes pendant 10 minutes dans du PAF. Nous avons choisi un marquage par immunofluorescence, pour réduire autant que possible la longueur du protocole.

L'observation des coupes en microscopie confocale montre l'absence de fluorescence endogène de l'hydrogel et l'absence de rétention aspécifique des anticorps par ce dernier.

Le marquage des filaments phosphorylés (figure IV-7 I) montre la présence des axones dans le tissu hôte et en bordure de la lésion. Après 6 semaines d'implantation *in vivo*, on peut observer l'insertion de quelques axones dans l'hydrogel, en bordure de la cavité.

Le marquage immunocytochimique de la GFAP (figure IV-7 II) révèle la présence de cellules gliales dans le tissu hôte, formant un cordon en bordure de la cavité. Ces cellules sont également observées dans des amas cellulaires dispersés dans l'hydrogel, correspondant vraisemblablement à des fragments de tissu arrachés aux parois de la cavité et emprisonnés lors de l'implantation de l'hydrogel.

### III.1.1.2. Bilan et réflexion

Cette étude a permis de soulever un certain nombre de questions, concernant notamment l'adéquation des hydrogels d'alginate ester ( $_{7,5}$ -AA-C<sub>12</sub>) avec les expériences *in vivo* envisagées et les études morphologiques indispensables.

- Est-il possible de renforcer la stabilité de l'hydrogel ?

Selon le cahier des charges du côté « Biologie », il devrait résister à la désagrégation en milieu liquide, (i) pour conserver ses propriétés mécaniques dans la cavité lésionnelle, remplie de liquide céphalorachidien constamment renouvelé ; (ii) pour permettre au moins des protocoles histologiques et immunocytochimiques « allégés ».

- Est-il possible de le colorer pour identifier avec certitude sa présence sur les coupes ?

Les résultats de l'étude physico-chimique (détaillée dans le chapitre III), que nous avons entreprise en parallèle pour suivre l'évolution des propriétés mécaniques à long terme des hydrogels d'alginate ester, sont venus confirmer les données. En effet, nous avons pu montrer l'hydrolyse des liaisons ester entre l'alginate et les chaînons alkyles responsables des interactions hydrophobes au sein de l'hydrogel, à l'issue d'une période de 30 jours à 37°C.

La stratégie d'implanter un biomatériau rhéofluidifiant au sein de la cavité lésionnelle apparaît comme une approche pertinente, permettant de réduire la lourdeur du protocole chirurgical. Cependant, le manque de stabilité de l'hydrogel utilisé nous a amené à engager de nouvelles recherches pour synthétiser un biomatériau plus performant.

### III.1.2 Implantation à court terme d'un hydrogel d'alginamide

Le nouveau biomatériau testé, présentant en principe une meilleure stabilité au cours du temps, est un hydrogel d'alginamide ( $_{8}$ -AA<sub>N</sub>-C<sub>12</sub>). Les conditions de préparation et les caractéristiques de ce polymère en solution sont décrites respectivement dans le chapitre II et le chapitre III.

La première question était de connaître sa biocompatibilité avec le tissu hôte. Nous avons donc implanté l'hydrogel d'alginamide dans une cavité lésionnelle cérébrale réalisée chez 4 rats, selon le même protocole que celui décrit précédemment. Les animaux ont bien supporté l'opération. L'hydrogel d'alginamide s'est révélé facilement injectable. Il a été retrouvé bien en place dans les cavités après 2 semaines d'implantation, semblant bien toléré par le tissu hôte, n'ayant pas induit de réaction inflammatoire apparente à l'échelle macroscopique.

Ces données très préliminaires nécessitaient d'être confirmées par une étude de cytotoxicité plus approfondie. Nous avons réalisé une première expérience avec l'aide de Céline Riegert, en collaboration avec le laboratoire de Rolf Jackisch à Fribourg. Des polymères d'alginamide ou d'alginate ester ont été rajoutés à la concentration de 3,16 g/L et 1,8 g/L dans le milieu de culture de cellules septales prélevées chez des embryons de rat au stade fœtal de 15 jours. Les cellules ont été maintenues en culture pendant 7 jours, le polymère ayant été rajouté dans le milieu à partir du 3<sup>ème</sup> jour. Quelques puits sans addition de polymère ont servi de témoins. L'addition du polymère, qu'il soit d'alginamide ou d'alginate ester, a entraîné la mort de toutes les cellules dans les puits de culture concernés. Ce résultat très décevant nous semblait inexplicable puisque les implantations préalables *in vivo* n'avaient pas engendré de difficultés particulières. Cependant, nous avons pu constater un changement de couleur du milieu de culture lors de la dissolution des polymères, l'indicateur coloré indiquant une variation de pH. Les cellules cérébrales fœtales en culture sont particulièrement sensibles au pH, ce qui pouvait expliquer la nécrose généralisée observée. Des tests *in vitro* en présence de milieu de culture et d'alginate natif aux concentrations précédemment utilisées ont effectivement montré une augmentation du pH à des valeurs de 8,1, incompatibles avec la survie neuronale. La solution envisagée consiste, après synthèse du polymère, à ramener son pH au pH physiologique (7,3), puis de le dialyser avant de le lyophiliser.

### **III.1.3 Implantation à court terme d'un hydrogel d'alginamide fluorescent**

#### **III.1.3.1. Visualisation après implantation**

Nous avons synthétisé et implanté *in vivo* un hydrogel fluorescent ( $_{8 \text{ théorique}}\text{-AA}_N\text{-C}_{12}$ ) pour essayer de le localiser avec précision dans la cavité lésionnelle lors des coupes à congélation et des protocoles histologiques.

Ce biomatériau est identique à celui testé dans l'étude précédente, mais avec greffage d'une sonde fluorescente sur son squelette polysaccharidique. Il peut ainsi être identifié par microscopie à fluorescence.

Les hydrogels fluorescents semblent bien tolérés par le tissu hôte et n'entraînent aucune réaction inflammatoire. Nous avons euthanasié les animaux après 1, 2 et 4 semaines d'implantation de ces hydrogels.

L'observation des coupes en épifluorescence confirme la présence de l'hydrogel d'alginamide marqué à la fluorescéine après un mois d'implantation (figure IV-8). Néanmoins, l'hydrogel est retrouvé en bordure du tissu hôte et ne remplit pas l'ensemble de la cavité.

### **III.1.3.2. Les stratégies pour stabiliser le système**

La possibilité de localiser et d'identifier avec précision l'hydrogel sur les coupes, par microscopie à fluorescence, nous a permis d'expérimenter un certain nombre de modifications des protocoles pour essayer de renforcer la stabilité de l'hydrogel lors des coupes et des analyses et éviter son élimination de la cavité.

Dans un premier temps, nous avons cherché à stabiliser l'hydrogel d'alginamide et dans un second temps à inclure cette méthodologie dans le protocole histologique pour optimiser les études morphologiques. Deux approches ont été envisagées pour stabiliser l'hydrogel et éviter sa dégradation en immersion: l'utilisation de glutaraldéhyde et l'ajout de calcium. Cette stabilisation doit être compatible avec la fixation des tissus.

#### **III.1.3.2.1 Stabilisation de l'hydrogel par le glutaraldéhyde**

Le glutaraldéhyde, et plus généralement les aldéhydes (acroléine, glutaraldéhyde, formaldéhyde), sont des agents de pontage chimique. Ils créent des ponts intra et inter-moléculaires, en particulier avec les groupements aminé, ce qui immobilise les molécules et notamment les protéines.

La réaction du glutaraldéhyde avec les groupements hydroxyle de polymères hydrosolubles tels que l'alginate est possible mais nécessite des conditions drastiques (pH bas, haute température, méthanol utilisé comme désactivateur...). Des gels chimiques d'alginate peuvent être préparés par réticulation de l'alginate de sodium dans le méthanol par

l'intermédiaire du glutaraldéhyde [Kulkarni, 2000a]. Ces auteurs ont montré que le gonflement du gel diminue lorsque le temps de réticulation augmente.

Dans les réactions immunocytochimiques, le glutaraldéhyde peut inhiber les réactions antigène-anticorps. Il peut être utilisé en faible concentration, en complément du formaldéhyde, pour préserver notamment la qualité ultrastructurale des tissus. De nombreux auteurs [Smith, 1982], [Mrini, 1995] ont montré que des concentrations standard (2,5 à 5%) de glutaraldéhyde, seul ou en mélange avec d'autres aldéhydes (formaldéhyde, acroléine, etc) permettent d'obtenir d'excellents immunomarquages et ceci sur des tissus préservés de façon optimale.

Différents essais ont été réalisés sur des fragments d'hydrogel immergés à température ambiante dans des solutions tamponnées contenant des concentrations volumiques inférieures à 10% en glutaraldéhyde. Ces essais n'ont pas permis de stabiliser l'hydrogel d'alginamide. L'augmentation de température, pour catalyser la réaction, étant exclue pour éviter la dégradation du polymère et des tissus, la réaction entre les groupes hydroxyles et le glutaraldéhyde n'a pu se faire dans les conditions de réaction utilisées et cette approche a été abandonnée.

### **III.1.3.2.2 Stabilisation par le calcium**

En présence de certains cations divalents, le calcium par exemple, l'alginate gélifie ou précipite. Ce phénomène est dû à la complexation, par les cations divalents, d'une partie des fonctions carboxylate pouvant appartenir à des chaînes macromoléculaires différentes. Suivant la force des interactions ioniques, du pouvoir chélatant et de la taille des cations, un réseau tridimensionnel se forme et l'alginate gélifie [Smidsrod, 1972].

Il semblait donc possible d'améliorer la stabilité de nos hydrogels en augmentant raisonnablement la concentration en calcium dans le milieu. Toutefois, le principal inconvénient des gels d'alginate de calcium est leur faible stabilité en présence d'agents chélatants du calcium, tels que le tampon phosphate. Pour tous nos protocoles ultérieurs, nous avons donc remplacé systématiquement le tampon phosphate, classiquement utilisé, par du tampon cacodylate 0,05M.

Morgan [1994] a montré que le calcium peut masquer la réaction antigène-anticorps. Nous avons donc testé l'influence du calcium dans notre protocole immunocytochimique. Pour ce faire, des coupes à congélation de cerveaux ont été fixées par immersion pendant 10 minutes, à 4° C, dans une solution de formaldéhyde à 4 % tamponnée par du cacodylate de sodium

0,05 M (PAFC) et contenant des concentrations croissantes de chlorure de calcium (0,5 et 10 mM). Elles ont ensuite été traitées en immunocytochimie selon le protocole classique, la dilution des anticorps et tous les rinçages se faisant dans le tampon cacodylate supplémenté en chlorure de calcium. Les résultats sont donnés dans le tableau IV-1. On remarque que la concentration en calcium maximale possible est de 5 mM, sous peine de perturber les réactions immunocytochimiques et les colorations ultérieures.

La méthode de fixation des tissus par perfusion, même en présence de chlorure de calcium, n'est pas utilisable, nos essais montrant dans ces conditions, la disparition de l'hydrogel fluorescent dans la cavité lésionnelle et la difficulté à réaliser des coupes au cryostat dans de bonnes conditions.

La coloration au bleu de toluidine est envisageable pour caractériser la présence ou l'absence d'hydrogel sur les coupes. La figure IV-9 montre la coloration légère de l'hydrogel par le bleu de toluidine après fixation des coupes dans du PAFC en présence de calcium 5 mM. Néanmoins, on remarque que la réaction du tissu hôte avec le colorant est légèrement perturbée, la coloration étant moins intense qu'en absence de calcium.

Le taux de gonflement des hydrogels (cf: partie physico-chimie) représente une donnée importante. En effet, une réflexion sur les conséquences d'une diminution du volume de l'hydrogel induite par le calcium (environ d'un facteur 3) vis-à-vis du matériel biologique sera à envisager si des signes de colonisation de l'hydrogel sont manifestes (présence de vaisseaux sanguins, de cellules gliales, bourgeonnement ou régénération des voies nerveuses lésées...). Le matériel biologique sur les coupes pourrait ainsi être partiellement détruit ou détérioré suite à la contraction de l'hydrogel.

### **III.1.4 Implantation d'un hydrogel d'alginamide à long terme ( $\delta$ -AA<sub>N</sub>-C<sub>12</sub>)**

#### **III.1.4.1. Analyse comportementale des animaux**

##### **III.1.4.1.1 Activité locomotrice**

L'activité locomotrice en cage d'élevage a été mesurée en phase pré-opératoire et à différents stades post-lésionnels, sur une période de 1 an, au cours du sommeil journalier et pendant la phase de réveil nocturne des rats. La lésion par aspiration de la fimbria-fornix induit chez le Rat une forte augmentation de l'activité locomotrice, qui est particulièrement prononcée pendant la période nocturne. C'est donc sur cette période que nous avons analysé nos résultats (figure IV-10).

3 semaines après la lésion, on constate une augmentation de plus de 3 fois du nombre de passages d'une extrémité à l'autre de la cage chez tous les animaux lésés. Cette hyperactivité locomotrice persiste d'une façon relativement stable dans le temps, atteignant à 48 semaines post-lésionnelles des valeurs près de 5 fois supérieures à celles des animaux pseudo-opérés témoins. Aucune différence notable d'activité locomotrice n'est observée entre le groupe de rats lésés et tous les groupes de rats lésés avec implantation d'hydrogel jusqu'à 48 semaines post-lésionnelles.

Cependant, dès 7 semaines post-lésionnelles, on peut observer une forte réduction de cette hyperactivité dans le groupe de rats ayant reçu un traitement combiné d'aminoguanidine et de putrescine (AP). En comptabilisant 2 fois chaque animal de ce groupe pour obtenir un nombre d'animaux (dans ce cas, 8) compatible avec une ANOVA tout en conservant la même moyenne et le même écart type, nous avons pu réaliser une analyse statistique fictive. Celle-ci indique que les valeurs obtenues dans ce groupe à 21 et 48 semaines post-lésionnelles seraient significativement différentes de celles des autres groupes d'animaux lésés (montrant ainsi l'effet bénéfique du traitement), mais également significativement différentes de celles des groupes témoins (l'effet du traitement n'étant que partiel).

Il faut enfin noter que chez les animaux ayant reçu une implantation d'hydrogel, le traitement AP n'atténue pas les perturbations locomotrices induites par la lésion (groupe Lésé + Hydrogel + AP).

#### **III.1.4.1.2 Coordination sensorimotrice**

Les capacités sensorimotrices des animaux ont été évaluées par le test de la barre en phase pré-opératoire et à différents stades post-lésionnels sur une période de 42 semaines (figure IV-11). Au stade de 20 semaines post-chirurgicales, les animaux (en particulier les pseudo-opérés, les groupes de rats lésés ayant un poids moyen inférieur d'environ 1,3 fois) avaient pris beaucoup de poids (Tableau IV-2) et se déplaçaient avec difficulté sur la barre. Constatant la détérioration de leurs performances, nous avons choisi une barre un peu plus large pour effectuer ce test, ce qui explique, à 24 semaines, l'amélioration des performances pour tous les groupes. On peut constater, toutefois, les effets sévères de la lésion, l'ensemble des groupes lésés présentant de grosses difficultés à se déplacer correctement sur la barre par rapport à leurs homologues pseudo-opérés. Aux stades de 11 et 20 semaines post-chirurgicales, les performances du groupe lésé semblaient sensiblement meilleures que celles des 3 autres groupes d'animaux lésés, comme s'il y avait eu aggravation des déficits

provoquée par l'implantation des hydrogels et l'administration du traitement AP. Cependant, cette différence n'est plus visible dans les stades ultérieurs.

### **III.1.4.1.3 Piscine de Morris**

Les rats ont été testés dans la piscine à 21 et 43 semaines post-lésionnelles (figure IV-12).

Au stade de 21 semaines, on observe une amélioration des performances pour tous les groupes d'animaux au cours des trois premiers jours, phase pendant laquelle la plateforme est visible. On peut constater cependant les effets perturbateurs de la lésion, les groupes de rats lésés ne retrouvant la plate forme, au bout de 3 jours, que dans 40 à 50% des cas, contrairement aux 100% atteints par leurs homologues pseudo-opérés. Au cours des 4 jours suivants, lorsque la plateforme est rendue invisible par immersion, les performances des animaux lésés sont stationnaires. Contrairement à leurs homologues pseudo-opérés qui ont manifestement retenu sa localisation et nagent vers la plateforme de façon ciblée, les animaux lésés ne présentent pas de recherche stratégique et se déplacent dans l'ensemble de la piscine, trouvant la plateforme par hasard dans 20 à 40 % des essais.

On retrouve globalement la même chose au stade de 41 semaines post-chirurgicales, les animaux lésés présentant des performances peu élevées mais stables, que la plateforme soit visible ou immergée.

### **III.1.4.2. Analyse morphologique**

Après 11 mois d'implantation, la cavité lésionnelle cérébrale n'est plus remplie totalement par l'hydrogel. Cependant, à l'observation visuelle rapide, au moment du prélèvement des cerveaux pour les congeler, la cavité lésionnelle des animaux ayant reçu l'implantation de l'hydrogel semblait plus petite et moins béante que chez les animaux sans hydrogel. Aucune manifestation visuelle d'inflammation du tissu à proximité de la cavité cérébrale n'a été observée.

Un an après l'implantation, 14 rats des différents groupes ont été réopérés pour l'injection de traceurs fluorescents. Le traceur rétrograde, le Fluorogold, migrant de la terminaison synaptique au corps cellulaire, est injecté dans l'hippocampe pour une observation dans le septum. Le traceur antérograde, le Dye I, migrant du corps cellulaire jusqu'aux terminaisons synaptiques, est injecté dans le septum pour une observation dans l'hippocampe. Les rats ont été sacrifiés quatre jours plus tard, les cerveaux extraits et congelés. Les coupes, fixées au

formaldéhyde tamponné, ont été observées en microscopie confocale (figure IV-13). L'efficacité de ces marquages hodologiques a été validée chez des animaux témoins pseudo-opérés. Nous avons pu retrouver quelques neurones marqués par le fluorogold dans le septum médian et quelques terminaisons marquées au Dye I dans l'hippocampe. Aucun marquage n'a été retrouvé chez les animaux lésés malgré la présence de l'hydrogel, laissant supposer l'absence de processus de croissance neuritique ayant permis à des fibres nerveuses de traverser l'hydrogel. Très peu de gel est par ailleurs retrouvé dans la cavité lésionnelle, difficilement détectable et sans infiltration cellulaire apparente. Il faut toutefois noter que l'injection stéréotaxique de ces traceurs a nécessité une nouvelle intervention chirurgicale. Celle-ci, réalisée sur des tissus fragilisés par la première opération, a provoqué des saignements importants au niveau de la cavité lésionnelle. Il est possible, compte tenu de la fragilité de l'hydrogel, que ce flux sanguin ait provoqué sa dégradation accrue et sa fragmentation dans la cavité.

Des marquages immunocytochimiques (figure IV-14) de la GFAP (Glial Fibrillaric Acidic Protein), témoin de la présence d'astrocytes, et des neurofilaments phosphorylés, marqueurs des axones, ont été réalisés selon la technique « sandwich » sur des coupes des différents groupes. Des cellules gliales sont ainsi détectées en bordure de la lésion: l'hydrogel ne provoque pas de réaction gliale massive et chronique dans le tissu hôte. La cicatrice gliale, en partie responsable de l'absence de régénération, n'est que peu développée. Aucune réaction positive n'est détectée dans la cavité après marquage des neurofilaments phosphorylés, suggérant l'absence de croissance neuritique et de processus de régénération axonale au travers de l'hydrogel.

La détection de l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase (figure IV-15a), enzyme de dégradation de l'acétylcholine présente au niveau des terminaisons cholinergiques et marqueur de l'intensité de l'innervation cholinergique, montre l'absence d'activité de l'acétylcholinestérase dans l'hippocampe pour l'ensemble des groupes lésés. Pour faciliter la compréhension, la figure IV-15b illustre schématiquement une coupe sagittale annotée d'un cerveau de rat.

La coloration au violet de crésyl montre une nécrose des noyaux thalamiques situés sous la cavité lésionnelle dans l'ensemble des groupes de rats lésés. On peut noter, néanmoins, une nécrose plus étendue chez les animaux ayant reçu l'implantation d'un hydrogel (figure IV-16), qu'ils aient ou non reçu le traitement pharmacologique AP.

### III.2. Détermination de la capacité de saturation en principe actif

Cette étude consiste à déterminer la quantité maximale  $Q_{\max}$  de principe actif – putrescine et aminoguanidine – qui peut être encapsulée dans le cadre d'études ultérieures dans 1 ml de gel d'alginamide ou d'alginate natif par interactions ioniques, c'est-à-dire à mesurer la capacité de saturation des gels en principe actif. Celle-ci sera ensuite comparée avec les quantités thérapeutiques que l'on souhaite pouvoir introduire dans le gel.

La quantité initiale de principe actif, introduite dans cette solution, se répartit d'une part par solubilité dans la solution et la phase aqueuse du gel, et d'autre part en fonction des interactions électrostatiques qui s'établissent entre les fonctions amine et les groupements carboxylate de l'hydrogel. En effet, le pKa de la putrescine et de l'aminoguanidine étant de 10, à pH 7, les amines sont sous forme protonée  $\text{NH}_3^+$  et interagissent donc avec les  $\text{COO}^-$  de l'alginate.

#### III.2.1 Mise au point du dosage des fonctions amine

La figure IV-17 présente le spectre UV-Visible correspondant à la réaction entre la putrescine et le TNBS. Le maximum, à 420 nm (500 nm pour l'aminoguanidine), correspond au complexe amine-TNBS. En outre, un produit de dégradation du TNBS, l'acide picrique, se forme vers 360 nm.

L'étude des valeurs dans le temps fait apparaître une chute de l'absorbance, variable selon la concentration en amine, allant jusqu'à plus de 50% en 1 heure si l'échantillon est laissé à l'air libre (figure IV-18). Le TNBS étant sensible à la lumière, tous les piluliers contenant les solutions ont été placés à l'obscurité, enveloppés dans du papier d'aluminium. La stabilité n'a été que très légèrement améliorée. De plus, nous observons fréquemment, dans les deux cas, une dérive du signal en 1 heure, avec déplacement du pic vers les longueurs d'onde plus élevées. Certains protocoles décrits dans la littérature [Panasiuk, 1998] préconisent de stopper la réaction à un instant  $t$  déterminé. Cependant, il s'avère que la vitesse des réactions varie à la fois au cours du temps et en fonction de la concentration en amine.

Compte tenu des taux d'erreur liés à la précision des pesées à  $\pm 0,02$  mg près, aux mesures d'absorbance à  $\pm 10^{-3}$  près, des valeurs très faibles de concentration et du nombre d'échantillons à doser, il est nécessaire d'appliquer une méthode fiable et stable dans le temps. Nous avons réalisé différents tests pour tenter d'améliorer la stabilité du signal dans le temps: augmentation de la concentration en borate, dilution préalable du TNBS dans l'eau et

ajout au moment du dosage, modification de température, concentration en sel... Aucune de ces modifications n'a permis d'optimiser la méthode de manière significative.

Nous sommes parvenus à mettre au point une technique reproductible, basée sur l'étude de la cinétique de réaction à partir de l'instant  $t=0$  de mise en contact de l'amine et du TNBS, en observant, pour chacun des étalons préalablement définis, l'évolution de la densité optique à partir de cet instant initial (figure IV-19).

Nous avons pu établir une relation linéaire entre la pente à l'origine et la concentration en amine et avons vérifié que cette méthode est reproductible: en effet, la pente est constante pour une concentration en amine donnée, et ceci permet de nous affranchir des effets perturbateurs des modifications de DO dans la cuve de référence.

C'est donc cette méthode qui a été retenue, et chaque échantillon a été dosé de cette manière, à partir des prélèvements effectués dans les tubes, après dilution si besoin dans une solution de NaCl et CaCl<sub>2</sub> pour obtenir une concentration compatible avec la zone de linéarité.

Le calcul d'erreur sur les étalons tient compte des pesées et dilutions successives en considérant une précision de la balance de +/- 0,02 mg. Pour le dosage des échantillons, la moyenne et l'écart type sont calculés à partir de trois valeurs et la précision sur le calcul de la moyenne est indiquée par l'erreur relative.

### III.2.1.1. Dosage de la putrescine

Les résultats du dosage sont présentés dans le tableau IV-3 et la figure IV-20. La relation de linéarité entre la pente à l'origine et la concentration en amine permet d'établir une droite d'étalonnage avec un coefficient de corrélation  $R = 0,9986$ .

A l'équilibre, en théorie, une partie de l'amine est retenue dans le gel par interactions ioniques. Cette quantité correspond à la capacité de saturation, le reste se trouve réparti de façon homogène entre la phase aqueuse du gel et la solution, à la concentration  $C_{eq}$ .

La quantité de putrescine retenue dans le gel par interactions ioniques est obtenue par différence entre la quantité initiale de putrescine dans la solution et celle dosée à l'équilibre après mise en contact avec le gel:

$$Q(\text{mg} / \text{ml}_{gel}) = \frac{C_{sol} \times V_{sol} - C_{eq} \times (V_{sol} + V_{gel})}{V_{gel}}$$

$V_{sol}$  est le volume initial de la solution de putrescine (8,5ml)

$C_{sol}$  est la concentration initiale de la solution de putrescine

$C_{eq}$  est la concentration de putrescine à l'équilibre dans le volume total  $V_{sol} + V_{gel}$ , soit 9,5ml. Les résultats ont été obtenus avec deux valeurs de  $C_{sol}$  calculées de manière à ce que la quantité de principe actif introduit dans le milieu corresponde, par ml de gel, à  $10\% \times Q_{mp}^{th}$  et  $2 \times Q_{mp}^{th}$

- 1<sup>er</sup> cas: 10% de  $Q_{t_{mp}}$  soit  $C_{sol} = 1,37 \text{ mg} / 8,5 \text{ ml}$  de solution, soit après mise en contact avec 1ml de gel, **0,14 mg/ml** de solution totale

- 2<sup>eme</sup> cas:  $2 \times Q_{t_{mp}}$  soit  $C_{sol} = 27,4 \text{ mg} / 8,5 \text{ ml}$  de solution, soit après mise en contact avec 1ml de gel, **2,88 mg/ml** de solution totale

La quantité de principe actif qui interagit avec le gel est déterminée de manière indirecte par dosage du surnageant à l'équilibre par rapport à la concentration initiale. Cette méthode exige une grande précision compte tenu du nombre important de manipulations effectuées (pesées, dilutions, dosages...). En effet, l'incertitude sur la détermination de Q est d'autant plus élevée que la concentration initiale en principe actif est importante. A titre d'exemple, l'erreur sur Q est de l'ordre de 5% lorsque la concentration du milieu au départ est faible (0,14 mg/ml) alors qu'elle peut atteindre 50% lorsque la concentration du milieu au départ est 20 fois plus grande (dilution supplémentaire).

Afin de minimiser les erreurs, tous les prélèvements et dilutions sont par conséquent effectués par pesée en considérant que la densité des solutions est égale à 1.

Les résultats présentés dans le tableau IV-3 montrent que l'alginate natif est capable de retenir une petite quantité de putrescine par liaisons ioniques ; par ailleurs, nous observons visuellement la formation d'un gel stable, homogène et translucide, dû à un probable pontage ionique de l'alginate avec le principe actif, contrairement à l'alginateamide, qui forme un gel discontinu et inhomogène dans tous les cas (figure IV-21).

Pour l'alginate natif, la capacité est environ 12 fois plus faible que sa capacité théorique (16,2 mg/ml gel). Dans le cas des autres hydrogels (dérivé ester et dérivé amide), la capacité mesurée est très faible, environ 30 fois inférieure à la capacité théorique.

### III.2.1.2. Dosage de l'aminoguanidine

Les résultats du dosage sont présentés dans le tableau IV-4 et la figure IV-22. La droite d'étalonnage a un coefficient de corrélation R de 0,9956. Le calcul de la capacité de saturation, effectué comme précédemment à partir de la solution la moins concentrée, montre que l'alginate natif est capable de fixer 0,38 mg d'aminoguanidine par ml d'hydrogel, quantité 30 fois inférieure à sa capacité théorique maximale (11,16 mg/ml gel), et nettement inférieure

à ce que l'on observe avec la putrescine. En ce qui concerne les alginamides, les résultats sont similaires à ceux obtenus avec la putrescine, le polymère est capable de fixer une quantité très faible de molécule (plus de 30 fois inférieure à sa capacité théorique).

Pour l'aminoguanidine et la putrescine, une libération *in vivo* sur 5 jours a été envisagée. Un ordre de grandeur des quantités à encapsuler dans 1 ml de gel a été déterminé à partir des doses injectées en *ip*:

- Masse de Putrescine  $m_p$ :  $m_p = 10/1000 \times 5 = 0,05$  mg/ml d'hydrogel

- Masse d'aminoguanidine  $m_{ag}$ :  $m_{ag} = 320/1000 \times 5 = 1,6$  mg/ml d'hydrogel

## **IV. Discussion et conclusion**

### **IV.1. L'étude *in vivo***

La première constatation est que l'hydrogel d'alginamide, malgré ses liaisons amide plus résistantes que les liaisons ester du polymère initialement développé, n'est pas suffisamment stable *in vivo*. Pour améliorer la stabilité de ce gel, on pourrait augmenter la concentration du polymère et/ou son taux de greffage, tout en restant dans le domaine d'obtention d'un gel rhéofluidifiant.

L'alginamide, tel qu'il a été utilisé, ne répond pas de manière suffisamment adéquate aux exigences du cahier des charges, mais l'hydrolyse des liaisons ester de réticulation pourrait déboucher sur des perspectives plus favorables. Elle permettrait également, en supprimant les problèmes de non solubilité, une plus large modulation du taux de greffage et/ou de la concentration pour améliorer la stabilité de l'hydrogel *in vivo*. La suppression de ces réticulations secondaires qui rigidifient le système pourrait également être susceptible de favoriser une meilleure pénétration neuritique, les cellules ayant besoin pour leur progression d'un réseau labile. Les possibilités d'infiltration des axones dépendent en effet de la structure de la matrice qui joue le rôle de support de croissance. Il est donc nécessaire que le réseau favorise la migration axonale, un gel physique constitué uniquement d'interactions hydrophobes semblant le plus adapté. Il est également essentiel de contrôler la porosité et la taille des mailles, des valeurs optimales de ces paramètres étant des éléments clés pour la pénétration et l'extension des neurites. Des études sont prévues dans ce sens, qui devraient permettre d'évaluer la porosité et la perméabilité de l'alginamide.

Pour améliorer l'affinité des cellules neuronales pour le polymère et favoriser ainsi leur migration, il sera par la suite envisageable de greffer des peptides d'adhérence cellulaire (exemple peptide RGD). Des études ont en effet montré les excellentes propriétés de l'alginate

modifié à l'aide de ligands d'adhérence cellulaire [Rowley, 1999]. L'association avec du collagène pourrait aussi permettre une meilleure infiltration cellulaire: en effet les travaux de Woerly [1990] ont montré que la présence de collagène dans la matrice améliore la croissance et les interactions cellulaires.

Une autre approche pourrait être également envisagée, consistant à associer à l'implantation de l'hydrogel une greffe cellulaire (cellules foetales septales, précurseurs neuronaux, cellules souches...). La matrice aurait alors pour double objectif de favoriser le développement des cellules greffées et la croissance de leurs neurites jusqu'à leur structure cible initiale, tout en soutenant la régénération des neurones de l'hôte, potentiellement favorisée par l'apport des facteurs neurotrophiques produits par les cellules greffées.

L'association du traitement pharmacologique AP par voie intra péritonéale et de l'implantation de l'hydrogel n'a pas donné de résultats encourageants. Selon les résultats obtenus au LN2C [Muller, 2007], le traitement AP entraîne une atténuation persistante de l'hyperactivité locomotrice et des déficits sensorimoteurs induits par la lésion. Dans nos résultats, et malgré le petit nombre d'animaux du groupe Lésé + AP, nous avons pu retrouver l'effet bénéfique du traitement sur l'activité locomotrice. Cet effet n'a pas été observé dans le groupe homologue ayant reçu l'implantation d'un hydrogel (Lésé + hydrogel + AP). Or, les tests de cytotoxicité nous ont amené à réfléchir sur le pH de l'hydrogel implanté, manifestement différent du pH physiologique attendu. Cette variation de pH peut aggraver la nécrose tissulaire autour de la cavité lésionnelle et stopper toute régénération. Il serait intéressant, à l'avenir, de stabiliser le pH de l'hydrogel à un pH physiologique, d'environ 7,3, avant son implantation.

Une deuxième explication possible était que l'hydrogel retienne, par des liaisons ioniques, ces composés pharmacologiques chargés positivement empêchant leur effet à cours terme.

## **IV.2. L'encapsulation**

Les études portant sur l'encapsulation de principes actifs favorisant la régénération neuronale, l'aminoguanidine et la putrescine, ont montré que les quantités effectivement retenues par interactions ioniques sont très faibles. Pour cette raison, nous n'avons pas été en mesure d'étudier la libération de la molécule en dynamique, c'est-à-dire sous un flux mimant le débit du liquide céphalorachidien. Plusieurs explications sont possibles: Dans le cas des alginates modifiés, il s'agit plus d'un ensemble d'agrégats compactés plutôt que d'un gel

homogène, ce qui limite l'accessibilité des groupements carboxylate et donc la capacité de rétention de la molécule. De plus, il est probable qu'il y ait compétition entre les molécules d'amines, les ions calcium et les ions sodium sur les fonctions carboxylate.

Les quantités nécessaires au niveau de la zone de lésion ne sont pas connues précisément. Il est en effet difficile de comparer les doses à injecter en ip (tenant compte d'un mode d'administration discontinu et de la diffusion des molécules dans tout l'organisme) avec les doses à encapsuler, répondant à une libération idéalement continue et relativement limitée à la zone ciblée.

Au vue des estimations de la concentration des principes actifs à encapsuler (cf : paragraphe III-2.1.2) et des résultats de la capacité de saturation des hydrogels (tableaux IV-3 et IV-4), on constate cependant que ces valeurs sont du même ordre de grandeur. Il semble donc possible d'encapsuler une concentration suffisante de ces deux principes actifs dans l'hydrogel pour en obtenir une libération adéquate au niveau du site de lésion. Ces données restent à vérifier expérimentalement.

Une autre alternative serait de mettre au point un système capable de retenir véritablement la molécule de principe actif par d'autres biais que les seules interactions ioniques. Une possibilité serait de former des gels en emprisonnant des particules de PLA (poly (lactique acide)) contenant elles-mêmes le principe actif.

<b>I. INTRODUCTION</b>	<b>.101</b>
<b>II. MATERIELS ET METHODES</b>	<b>102</b>
<b>II.1. Expérimentation animale</b>	<b>102</b>
II.1.1 Les animaux .....	102
II.1.2 Protocole chirurgical .....	103
II.1.2.1. Préparation de l'hydrogel .....	103
II.1.2.2. La lésion et l'implantation de l'hydrogel.....	103
II.1.2.3. Traitement pharmacologique AP.....	104
II.1.2.4. Tableau récapitulatif des expériences.....	105
<b>II.2. Etude comportementale</b>	<b>105</b>
II.2.1 Activité locomotrice en cage d'élevage .....	106
II.2.2 Test de franchissement de la barre .....	106
II.2.3 Piscine de Morris .....	107
II.2.4 Analyse statistique .....	108
<b>II.3. Etude morphologique</b>	<b>108</b>
II.3.1 Préparation des tissus.....	108
II.3.1.1. Fixation des tissus par immersion .....	108
II.3.1.2. Fixation des tissus par perfusion .....	109
II.3.2 Histologie.....	109
II.3.2.1. Coloration au violet de crésyl.....	109
II.3.2.2. Coloration au bleu de méthylène .....	109
II.3.2.3. Coloration au bleu de toluidine .....	110
II.3.3 Immunocytochimie .....	110
II.3.4 Marquages hodologiques .....	112
<b>II.4. Encapsulation de principes actifs</b>	<b>113</b>
II.4.1 Détermination des interactions entre l'hydrogel et le principe actif .....	113
II.4.2 Dosage des principes actifs .....	114
<b>III. RESULTATS EXPERIMENTAUX</b>	<b>116</b>
<b>III.1. Etude in vivo</b>	<b>116</b>
III.1.1 Implantation à court terme d'un alginate ester .....	116
III.1.1.1. Etude morphologique .....	116
III.1.1.2. Bilan et réflexion.....	118
III.1.2 Implantation à court terme d'un hydrogel d'alginate .....	118
III.1.3 Implantation à court terme d'un hydrogel d'alginate fluorescent .....	119

## Chapitre IV : Etude *in vivo*

III.1.3.1.	Visualisation après implantation .....	119
III.1.3.2.	Les stratégies pour stabiliser le système .....	120
III.1.4	Implantation d'un hydrogel d'alginate à long terme ( $8-AA_N-C_{12}$ ) .....	122
III.1.4.1.	Analyse comportementale des animaux .....	122
III.1.4.2.	Analyse morphologique.....	124
<b>III.2.</b>	<b>Détermination de la capacité de saturation en principe actif</b>	<b>126</b>
III.2.1	Mise au point du dosage des fonctions amine .....	126
III.2.1.1.	Dosage de la putrescine .....	127
III.2.1.2.	Dosage de l'aminoguanidine .....	128
<b>IV.</b>	<b>DISCUSSION ET CONCLUSION</b>	<b>129</b>
IV.1.	L'étude <i>in vivo</i>	129
IV.2.	L'encapsulation	130

## Conclusion générale

L'objectif de ces travaux de recherches a été de définir, à partir d'un certain nombre de pré-requis, un nouveau matériau biocompatible à base d'alginate, susceptible d'être utilisé comme pont de régénération au niveau de tissus nerveux lésés. Après caractérisation *in vitro*, ce nouveau matériau a également été testé *in vivo* chez le rat, en y associant ou non un traitement pharmacologique (aminoguanidine et de putrescine) par voie intrapéritonéale.

Ce travail pluridisciplinaire a associé la chimie, la physicochimie et la biologie. Il a fait l'objet d'une première collaboration entre le LCPM et le LN2C.

Les différentes démarches envisagées et les difficultés rencontrées nous ont conduit, en fonction des résultats obtenus, à apporter de nombreuses précisions au cahier des charges préétabli, voire à redéfinir pas à pas un certain nombre de critères dont on a pu montrer l'importance.

Les études portant sur l'implantation des hydrogels d'alginate chez le rat puis le suivi des animaux traités, s'inscrivent sur des durées relativement longues (quelques semaines à quelques mois). De ce fait, il a été impossible d'attendre tous les résultats biologiques concernant un matériau donné avant d'entreprendre la préparation et la caractérisation d'autres matériaux. Ceci réduit bien entendu les possibilités d'une avancée rapide concernant l'optimisation des matériaux, et ralenti d'autant la progression des travaux dans ce domaine.

Pour conclure les travaux exposés dans ce mémoire, nous allons essayer d'en retracer brièvement les différentes phases, en insistant plus particulièrement sur les points forts ainsi que sur les principales difficultés rencontrées.

-La première phase a constitué à tester l'implantation d'un hydrogel d'alginate ester dont la synthèse était déjà bien maîtrisée au laboratoire et à suivre sur 6 semaines le comportement des animaux opérés. En dépit du manque de stabilité dans le temps des alginates esters, cette étude rapide a conduit à des résultats encourageants, concernant en particulier la facilité de mise en place de ces hydrogels rhéofluidifiants et thixotropes au niveau des lésions cérébrales, au regard des protocoles chirurgicaux plus lourds permettant l'introduction sur site d'un matériau préformé. Par contre, nous avons rencontré de réelles difficultés lors de la fixation

## Conclusion générale

des tissus pour l'étude histologique post-mortem, suite à la désagrégation de l'hydrogel dans les conditions d'analyse utilisées.

En parallèle à ces études biologiques, nous avons conduit les premières synthèses dans le but d'obtenir des dérivés amphiphiles alginamides et nous avons montré que les liaisons reliant les chaînes alkyles au polysaccharide présentent une plus grande stabilité à l'hydrolyse dans le temps, comparativement à celles des alginates esters. Deux voies de synthèse ont été testées. La première utilisant un carbodiimide n'a pas abouti car les polymères obtenus sont très difficilement purifiables. La deuxième voie de synthèse en milieu organique et en présence de 2-chloro-1-méthylpyridinium nous a permis d'obtenir des alginamides à différents taux de greffage en chaînes alkyles C<sub>12</sub>, en contrôlant principalement la quantité de CMPI utilisée. Cependant, ces alginamides ont en solution un comportement bien différent de celui des alginates esters. Cette différence a été expliquée par la présence de réactions de réticulation chimiques secondaires conduisant à l'obtention de microgels. A taux de substitution en chaînes alkyles comparables à ceux de dérivés alginates esters, les dérivés alginamides sont difficilement solubles en milieu aqueux et leurs propriétés associatives sont moins marquées, ce qui est vraisemblablement lié à une rigidification des chaînes d'alginate due aux ponts chimiques. Toutefois, sous certaines conditions de taux de substitution en chaînes alkyles et de concentration en polymère, nous avons réussi à obtenir des propriétés rhéologiques acceptables.

- Dans une seconde phase de nos travaux, nous avons implanté *in vivo* des hydrogels d'alginamide substitué à 8% en chaînes alkyles C<sub>12</sub> et testé leur biocompatibilité sur une courte période de 2 semaines. Les tests *in vivo* de ces hydrogels ont montré une biocompatibilité de l'hydrogel avec le tissu nerveux (absence de réaction inflammatoire macroscopique). A l'inverse et de manière très surprenante, les tests de cytocompatibilité (cellules septales) ont été infructueux, résultats que nous avons par la suite attribués à une évolution du pH de la solution de polymère dans le temps.

En parallèle, nous avons synthétisé un hydrogel d'alginamide fluorescent, l'objectif visé étant de pouvoir localiser facilement l'hydrogel sur les coupes, en particulier pour tester des conditions d'analyse post-mortem évitant la désagrégation de l'hydrogel. Les principales stratégies pour figer le système post mortem sont d'une part la fixation des tissus par perfusion de l'animal avec une solution de formaldéhyde. Cette méthode s'est avérée inefficace et a été abandonnée au profit d'une méthode de fixation des tissus par immersion

## Conclusion générale

dans une solution de formaldéhyde contenant une concentration de 5 mM en calcium. Dans ce cas, nous avons pu visualiser l'hydrogel sur les coupes et limiter sa désagrégation pendant les analyses.

- Troisième et dernière phase de ces travaux, nous avons implanté un hydrogel d'alginamide  $8\text{-AA}_N\text{-C}_{12}$ . Cette implantation a été ou non accompagnée du traitement pharmacologique aminoguanidine –putrescine injecté par voie intraperitonéale.

11 mois après implantation, les résultats *in vivo* n'ont pas permis de montrer une régénération même très légère des voies nerveuses lésées, que ce soit ou non en présence du traitement pharmacologique, alors que ce dernier avait fait la preuve de son efficacité quand il était administré seul. Il semble donc que le gel implanté pose par lui-même un problème, qui peut être lié à de très nombreux paramètres tels qu'une porosité non adéquate, une toxicité relevant de la présence d'impureté, la rétention par attraction ionique de l'aminoguanidine et de la putrescine à cours terme ou encore l'évolution du pH du gel. Tous ces paramètres restent donc à étudier et à optimiser de manière à obtenir un hydrogel dont les caractéristiques physico-chimiques soient parfaitement contrôlées.

Pour démarrer cette optimisation, nous avons par exemple essayé d'améliorer les propriétés structurales des alginamides en solution, en hydrolysant la liaison ester conduisant à une réticulation chimique du gel. Différentes stratégies ont été envisagées: hydrolyse en milieu acide, basique tamponné ou non tamponné, mais toujours dans des conditions de pH relativement contrôlées pour respecter la liaison amide entre les chaînes alkyles et le polysaccharide et la chaîne de polysaccharide elle-même. Ces essais se sont avérés peu concluants mais d'autres essais sont actuellement en cours.

Enfin, nous avons montré qu'il est possible d'encapsuler dans les gels d'alginamide de l'aminoguanidine et de la putrescine. Les quantités de principes actifs retenues sont faibles mais seule l'implantation d'un hydrogel contenant ces deux molécules pourrait apporter une amorce de réponse concernant l'efficacité de cette encapsulation.

Pour conclure cette présentation, il faut souligner que plusieurs questions restent à l'heure actuelle sans réponse et que de nombreux paramètres devront être adaptés pour obtenir un biomatériau compatible respectant le cahier des charges. Actuellement, ce projet se poursuit par de nouvelles implantations d'alginamide et d'alginat ester, en particulier dans des conditions de pH rigoureusement contrôlées.

# *Annexes*

## Annexe 1 : la SEC-MALLS

La détermination des masses molaires moyennes du polysaccharide peut être effectuée par différentes techniques. Par chromatographie d'exclusion stérique (SEC), utilisée avec un système de simple détection, on obtient des informations sur la distribution des masses molaires mais cette technique nécessite l'utilisation d'étalons tels que le pullulane ou le dextrane..

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

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

$$\frac{KC}{\Delta R_{\theta}} = \frac{1}{M_w} + 2A_2C + \frac{16\Pi^2}{3\lambda^2} R_g \sin^2 \frac{\theta}{2} \quad \text{avec} \quad K = \frac{4\Pi n^2}{\lambda N_A} \frac{dn}{dC}$$

où : C est la concentration du polymère en solution,

$A_2$  est le second coefficient du Viriel,

$\lambda$  est la longueur d'onde incidente,

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

$\theta$  est l'angle de mesure par rapport au rayon incident,

$N_A$  est le nombre d'Avogadro,

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

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

Un photodiffusiomètre permet de déterminer le rapport de Rayleigh : 
$$\Delta R_{\theta} = \frac{I_{\theta}}{I_0} \frac{r^2}{V}$$

où  $I_{\theta}$  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.

Cette méthode ne peut pas être utilisée par les alginates modifiés en raison de l'interaction des chaînes alkyles avec la chaîne.

### **I.1.1 Mode opératoire :**

#### **Appareillage :**

*Le diffusiomètre laser multi-angles dit MALLS (Multi-Angle Laser Light Scattering) est couplé à une série de colonnes chromatographiques d'exclusion stérique. Le système de chromatographie d'exclusion stérique est constitué de :*

- une pompe Waters 590,
- un dégazeur (Degazys DG 1310, Uniflow),
- une boucle d'injection de 200  $\mu$ L,

- une série de colonnes PL aquagel -OH 30, 40 et 50  $8\mu\text{m}$  (de 100 à 1 000 000  $\text{g.mol}^{-1}$ ) avec une pré-colonne de même type.

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

### **Préparation des solutions :**

Le poids sec des échantillons est déterminé afin de préparer des solutions de concentrations précises. L'éluant ( $\text{NaNO}_3$  0,1  $\text{mol.L}^{-1}$ ,  $\text{NaN}_3$   $6.5 \cdot 10^{-3}$   $\text{mol.L}^{-1}$ ) utilisé, est préparé avec de l'eau milliQ (système de filtration Millipore), puis filtré sur membrane Millipore de 0,1  $\mu\text{m}$ . Nous avons vérifié que, dans ces conditions, les polymères étaient élués quantitativement. Le débit de la pompe est fixé à 0,7  $\text{mL.min}^{-1}$ , 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  $\text{g.L}^{-1}$ , puis filtrées juste avant l'injection sur des filtres Millex GS (Millipore) de 0,22  $\mu\text{m}$ . Les solutions sont injectées deux fois et les courbes sont traitées selon la méthode de Zimm.

## Annexe 2: la rhéologie

La rhéologie est l'étude de l'écoulement et de la déformation de la matière, ainsi que des contraintes qui en résultent.

La rhéologie des solutions consiste :

- Soit à appliquer une contrainte  $\tau$  à l'échantillon et à mesurer la déformation  $\gamma$  ou la vitesse de déformation  $\dot{\gamma}$  qui en résultent ( $\dot{\gamma} = \frac{\partial \gamma}{\partial t}$ ).
- Soit à appliquer une déformation ou une vitesse de déformation à l'échantillon et à mesurer sa résistance à la déformation, c'est à dire la contrainte correspondante

### I. Introduction à la rhéologie

Un matériau soumis à un ensemble de forces est susceptible de se déformer. Les propriétés rhéologiques de matériaux viscoélastiques sont déterminées en cisillant les échantillons au sein de cellules de mesure axisymétriques de type cône/plan, plan/plan ou cylindres coaxiaux visant à reproduire au mieux des conditions de cisaillement simple. La réalisation d'une mesure consiste alors à imposer un couple  $C$  et à mesurer le déplacement angulaire  $\theta$  qui en résulte (figure A-1). Connaissant le couple et les caractéristiques géométriques de la cellule, on peut déterminer la contrainte de cisaillement  $\tau = \Delta f / \Delta s$  définie comme la force tangentielle par unité de surface qui s'exerce sur un élément de volume du matériau considéré. L'application d'une telle contrainte provoque une déformation de cisaillement définie comme le gradient de déplacement  $\gamma = \Delta x / \Delta y$ . Comme pour la contrainte, la déformation est déterminée à partir de la mesure du déplacement angulaire et des caractéristiques géométriques de la cellule. Les propriétés rhéologiques sont alors définies par des relations entre la contrainte imposée  $\tau(t)$ , et les réponses qui en résultent en termes de déformation  $\gamma(t, \tau)$  et de vitesse de déformation  $\dot{\gamma}(t, \tau)$ . La forme du signal  $\tau(t)$  que l'on impose à l'échantillon dépend de la propriété que l'on souhaite déterminer. Un signal particulièrement commode est l'échelon de contrainte défini par  $\tau(t) = 0$  pour  $t < 0$  et  $\tau(t) = \tau$  pour  $t \geq 0$  (figure A-2). Il permet de définir la complaisance de fluage  $J(t, \tau)$  et la viscosité de fluage  $\eta(t, \tau)$  :

$$J(t, \tau) = \gamma/\tau \quad (1)$$

$$\eta(t, \tau) = \tau/\dot{\gamma} \quad (2)$$

Si l'échelon de contrainte est d'une amplitude suffisamment faible pour ne pas perturber les temps de réorganisation caractéristiques du matériau, les réponses  $\gamma$  et  $\dot{\gamma}$  deviennent proportionnelles à  $\tau$ . Le régime devient donc linéaire dans la limite des faibles contraintes telles que  $\tau \rightarrow \Delta\tau$  et  $J(t, \tau) \rightarrow J(t)$  où  $J(t)$  est la fonction de fluage définie par :

$$J(t) = \gamma/\Delta\tau \quad (3)$$

Tant que le régime de sollicitation mécanique demeure linéaire, la fonction de fluage peut être mise à profit pour établir des relations entre  $\gamma(t)$  et  $\tau(t)$  quelle que soit la forme du signal  $\tau(t)$  en décomposant celui-ci en échelons  $d\tau$  infiniment petits tels que (figure A-3) :

$$\tau(t) = \int_{-\infty}^t d\tau = \int_{-\infty}^t \frac{\partial \tau}{\partial t'} dt' = \int_{-\infty}^t \dot{\tau}(t') dt' \quad \text{avec} \quad \dot{\tau}(t') = \frac{\partial \tau}{\partial t'} \quad (4)$$

La réponse  $d\gamma$  à un échelon élémentaire  $d\tau = \dot{\tau}(t')dt'$  imposé à l'instant  $t'$  est déterminée grâce à la connaissance de  $J(t)$ , par application de l'équation (3) décalée dans le temps :

$$d\gamma = J(t-t')d\tau \quad (5)$$

En vertu du principe de Boltzmann, on écrit alors que la réponse à la somme des échelons est égale à la somme des réponses aux échelons élémentaires  $d\tau$ . Les bornes de l'intégrale étant imposées par le principe de causalité, il vient :

$$\gamma(t) = \int_{-\infty}^t d\gamma = \int_{-\infty}^t J(t-t') \dot{\tau}(t') dt' \quad (6)$$

Grâce à l'équation (6) et à la connaissance de  $J(t)$ , on est donc en mesure de déterminer  $\gamma(t)$  quelle que soit la contrainte  $\tau(t)$ . Cette équation linéaire est d'une portée très générale puisqu'elle ne fait appel à aucun modèle rhéologique a priori. Elle est établie sur la base de deux principes (superposition et causalité) et requiert uniquement que les réponses soient proportionnelles aux sollicitations mécaniques.

## II. Etude en régime permanent

La contrainte  $\tau$  appliquée à un matériau est reliée à la vitesse de déformation  $\dot{\gamma}$  par l'équation (7), où  $\eta$  est la viscosité.

$$\tau = \eta \dot{\gamma} \quad (7)$$

On définit le comportement d'un fluide newtonien de la manière suivante :

i) seule la contrainte générée dans un écoulement laminaire simple est la contrainte de cisaillement  $\tau$

ii) la viscosité ne dépend pas de la vitesse de déformation

iii) la viscosité est constante en fonction du temps de cisaillement et la contrainte dans le fluide devient nulle dès que le cisaillement est arrêté. Pour tout autre cisaillement suivant, la viscosité reste la même qu'auparavant quel que soit le temps de repos entre les mesures.

iv) les viscosités mesurées selon différents types de déformation sont toujours proportionnelles les unes aux autres.

Tout fluide ayant un comportement différent est non newtonien. Pour certaines solutions de polymères, les dispersions et les émulsions, le comportement est non newtonien. Dans la majorité des cas, la viscosité  $\eta$  diminue en fonction de la vitesse de déformation  $\dot{\gamma}$  ; ce comportement est appelé rhéofluidifiant. Dans les rares cas où  $\eta$  augmente avec  $\dot{\gamma}$ , un tel comportement est appelé rhéoépaississant.

La figure A-4 représente l'allure générale de la courbe de tels matériaux rhéofluidifiants. Cette courbe indique que dans la limite des très faibles  $\dot{\gamma}$ , la viscosité est constante et que dans la limite des très hautes  $\dot{\gamma}$ , elle est également constante mais à un niveau plus bas. Pour décrire ces deux régions où la viscosité  $\eta$  atteint des valeurs constantes, on utilise les termes de premier et deuxième plateaux newtoniens. La valeur constante la plus élevée s'appelle

également la viscosité à cisaillement nulle. Entre ces deux plateaux, la viscosité diminue avec  $\dot{\gamma}$ .

En plus de la vitesse de déformation  $\dot{\gamma}$ , la viscosité  $\eta$  peut être influencée par la température, la pression et le temps de cisaillement.

La contrainte et la viscosité peuvent soit augmenter soit diminuer avec le temps de cisaillement. De tels changements sont réversibles ou irréversibles. Une diminution de viscosité sous la contrainte suivie d'une reprise de structure s'appelle la thixotropie. Le comportement opposé, c'est à dire augmentation de la viscosité sous la contrainte suivie d'une reprise s'appelle la thixotropie négative ou anti-thixotropie. La thixotropie apparaît généralement quand le fluide est rhéofluidifiant. L'anti-thixotropie est généralement associée à un comportement rhéoépaississant.

Dans le cas des polymères, la solubilité peut augmenter ou diminuer quand la température augmente. La structure repliée de la chaîne peut alors s'ouvrir, ce qui provoque une augmentation de la résistance à l'écoulement.

### III. Etude en régime oscillatoire

Le terme viscoélasticité correspond à l'existence simultanée de propriétés visqueuses et élastiques dans un matériau. Un matériau peut montrer un comportement newtonien (visqueux) ou hookéen (élastique) dans une situation donnée. En effet, si l'expérience est très lente (temps de mesure long), l'échantillon apparaîtra plus visqueux qu'élastique tandis que si l'expérience est très rapide (temps de mesure court), il apparaîtra plus élastique que visqueux. A des échelles de temps intermédiaires, la réponse du matériau sera viscoélastique.

Une application très concrète et d'une grande importance pratique de l'équation (6) concerne les sollicitations sinusoïdales telles que :

$$\tau = \tau_m e^{i\omega t} \quad \Leftrightarrow \quad \dot{\tau} = i\omega \tau_m e^{i\omega t} \quad (8)$$

où  $\tau_m$  est l'amplitude maximale de la contrainte et  $\omega$  la fréquence.

En incorporant l'équation (8) à l'équation (6) et en posant  $t-t' = \varphi$ , il vient :

$$\gamma = \int_{-\infty}^t J(t-t') i\omega \tau_m e^{i\omega t'} dt' = i\omega \tau_m e^{i\omega t} \int_0^{+\infty} J(\varphi) e^{-i\omega\varphi} d\varphi \quad (9)$$

En définissant la complaisance complexe  $J^*(\omega)$  par :

$$J^*(\omega) = i\omega \int_0^{+\infty} J(\varphi) e^{-i\omega\varphi} d\varphi = J' - iJ'' \quad (10)$$

alors l'équation (8) devient:

$$\gamma = J^*(\omega) \tau_m e^{i\omega t} = J^*(\omega) \tau \quad \Leftrightarrow \quad \tau = G^*(\omega) \gamma \quad (11)$$

$$\dot{\gamma} = J^*(\omega) i\omega \tau_m e^{i\omega t} = i\omega J^*(\omega) \tau \Leftrightarrow \tau = \eta^*(\omega) \dot{\gamma} \quad (12)$$

où  $G^* = \frac{1}{J^*} = G' + iG''$  est le module complexe,  $G'$  le module élastique et  $G''$  le module visqueux.  $G'$  quantifie l'aptitude d'un matériau à emmagasiner et à restituer de l'énergie mécanique alors que  $G''$  quantifie son aptitude à la dissiper de manière irréversible.

De même,  $\eta^* = \frac{G^*}{i\omega} = \frac{G''}{\omega} - i\frac{G'}{\omega} = \eta' - i\eta''$  est la viscosité complexe.  $\eta'$  est la viscosité dynamique et  $\eta''$  n'a pas de nom spécifique mais est relié à la rigidité dynamique par la relation  $G'' = \eta'' \omega$ . On déduit également que  $G'' = \eta' \omega$ .

Afin d'illustrer la signification physique de ces fonctions, nous pouvons considérer deux comportements extrêmes de la matière condensée, le solide hookéen et le fluide newtonien. Pour le solide hookéen on a  $\tau = G\gamma$  ( $G = \text{cte}$ ), et par identification avec l'expression (11), on a  $G^* = G = G'$  et  $G'' = 0$ . Par ailleurs, la contrainte étant proportionnelle à la déformation,  $\tau$  et  $\gamma$  sont en phase et on a  $\gamma = \gamma_m e^{i\omega t}$  avec  $\gamma_m = \tau_m/G$ . Pour un fluide newtonien  $\tau = \eta \dot{\gamma}$  ( $\eta = \text{cte}$ ) et par identification avec l'expression (12), on a  $\eta^* = \eta = \eta'$  et  $\eta'' = 0$  soit  $G'' = \omega\eta$  et  $G' = 0$ . La contrainte étant proportionnelle à la déformation,  $\tau$  et  $\gamma$  sont en quadrature de phase et on a  $\gamma = \gamma_m e^{i(\omega t - \pi/2)}$ . Pour des comportements viscoélastiques intermédiaires le déphasage  $\delta$  entre  $\tau$  et  $\gamma$  est quelconque mais nécessairement borné par les limites hookéenne et newtonienne de sorte que  $0 < \delta < \pi/2$  et  $\gamma = \gamma_m e^{i(\omega t - \delta)}$ ; il vient :

$$G^*(\omega) = \frac{\tau}{\gamma} = \frac{\tau_m}{\gamma_m} e^{i\delta} \quad \Rightarrow \quad G' = \frac{\tau_m}{\gamma_m} \cos\delta \quad \text{et} \quad G'' = \frac{\tau_m}{\gamma_m} \sin\delta \quad (13)$$

D'un point de vue expérimental, il suffit donc de mesurer le déphasage  $\delta$  et les amplitudes maximales  $\tau_m$  et  $\gamma_m$ , via le couple et la déformation angulaire, pour déterminer l'ensemble des

fonctions  $G^*$ ,  $G'$ ,  $G''$ ,  $\eta^*$ ,  $\eta'$ ,  $\eta''$ ,  $J^*$ ,  $J'$ ,  $J''$ , ... Le principe des mesures en régime oscillatoire est illustré sur la figure A-5.

## IV. Définitions de quelques paramètres

- Viscosité au premier plateau newtonien

Classiquement, l'évolution de la viscosité  $\eta$  des polymères associatifs en fonction de la contrainte  $\tau$  s'associe à un comportement rhéofluidifiant, caractérisé, comme décrit précédemment, par un premier plateau newtonien aux faibles contraintes, suivi d'une chute importante de la viscosité quand la contrainte augmente et enfin un deuxième plateau newtonien correspondant à une viscosité très basse.

La viscosité au 1<sup>er</sup> plateau newtonien  $\eta_0$  dépend directement du nombre de jonctions du réseau macromoléculaire c'est à dire du nombre de microdomaines hydrophobes et du temps de vie de ces microdomaines. Par conséquent, elle dépend de la longueur de la chaîne alkyle et du nombre de chaînes alkyle impliquées dans la formation de ces microdomaines.

- Module élastique

Le module élastique  $G'$  (ou rigidité dynamique) traduit la réponse élastique du matériau. La valeur de  $G'$  est ainsi le reflet du nombre de chaînes élastiquement actives (noté  $n$ ), c'est à dire engagées entre deux ou plusieurs points de jonction formés par les associations hydrophobes intermoléculaires, et de la force des interactions mises en jeu.  $G'$  donne donc des informations d'ordre structural.

- Module visqueux

Le module visqueux  $G''$  traduit la réponse visqueuse du matériau et caractérise l'aspect hydrodynamique du système. En général,  $G''$  est caractéristique du volume effectif du réseau polymère, formé en solution par l'enchevêtrement des chaînes macromoléculaires et les associations hydrophobes.  $G''$  augmente avec l'expansion des pelotes polymères (augmentation du temps de relaxation) et augmente donc également lorsque la structure du réseau s'amplifie.

- Tangente  $\delta$

Tangente  $\delta$  correspond au rapport du module  $G''$  au module  $G'$  et caractérise la solution, en terme de dynamique locale. Plus le réseau de molécules en solution se structure, plus le rapport  $G''/G'$  ( $= \tan \delta$ ) diminue. D'une manière très générale,  $G'' > G'$  ( $\tan \delta > 1$ ) caractérise des solutions visqueuses. A l'inverse,  $G'' < G'$  ( $\tan \delta < 1$ ) caractérise l'existence d'un gel. Un gel est dit "fort" lorsque  $\tan \delta$  devient inférieur à 0,1.

- Contrainte critique

La contrainte critique  $\tau_{co}$  de désengagement des chaînes polymères hydrophobisées, correspondant au désenchevêtrement des chaînes, est la contrainte à partir de laquelle  $G'$  diminue brutalement en régime oscillatoire. Elle dépend du degré d'enchevêtrement des chaînes et de la force des interactions mises en jeu.

La contrainte  $\tau_{ce}$ , mesurée à partir des courbes d'écoulement  $\eta=f(\tau)$ , traduit le même phénomène. Les valeurs de  $\tau_{co}$  et de  $\tau_{ce}$  bien que mesurées par des techniques différentes (régime oscillatoire ou permanent) sont généralement du même ordre de grandeur. Toutefois,  $\tau_{co}$  est souvent légèrement supérieure à  $\tau_{ce}$ , l'effet « proche voisin » subsistant plus longtemps en régime oscillatoire qu'en écoulement, à contrainte équivalente.

Les contraintes critiques sont déterminées à l'aide de la méthode des tangentes sur les courbes  $\eta$  vs  $\tau$  et  $G'$  vs  $\tau$  respectivement.

- *Temps de relaxation*

Le modèle de Leibler [Leibler, 91] prévoit le comportement dynamique de polymères enchevêtrés possédant des unités "collantes" réparties de manière statistique le long de la chaîne polymère. En particulier, ce modèle prévoit l'existence de deux temps de relaxation significativement différents. Le premier, long et donc observable aux faibles fréquences, correspond au temps de désengagement des chaînes enchevêtrées et le second, beaucoup plus court et observable aux fortes fréquences, correspond au temps de vie moyen d'une association.

Par de simples mesures en régime permanent ou oscillatoire, seul le temps de relaxation le plus long du réseau (assimilé au temps de désenchevêtrement des chaînes) a pu être mesuré. Selon les propriétés du polymère étudié, ce temps de relaxation peut être mesuré soit à partir des courbes  $\eta = f(\dot{\gamma})$  (noté  $\lambda_e$ ), soit à partir des courbe  $G', G'' = f(\tau)$  (noté  $\lambda_o$ ).

### Annexe 3: Exemple de calcul de la capacité de saturation théorique pour 1ml d'hydrogel à 20 g /L

$$Q_{\max}^{\text{th}} = \text{Nombre de moles de COO}^- / \text{ml gel}$$

Pour un taux de substitution en chaînes alkyle de 10%, la masse molaire moyenne d'un motif uronique est de :  $0,9 \times 198 + 0,1 \times 341 = 212,03$

Avec 198 = Masse Molaire d'un motif uronique non modifié

341 = Masse Molaire d'un motif uronique modifié

$$n_{\text{COO}^-} / \text{ml de gel} = \frac{20 \times 10^{-3}}{212,03} = 9,43 \times 10^{-5} \text{ moles / ml gel}$$

Si on considère que 10% de groupes carboxylates sont engagés dans une liaison amide,

$$Q_{\max}^{\text{th}} = 0,9 \times n_{\text{COO}^-} / \text{ml de gel} = 8,48 \times 10^{-5} \text{ moles /ml gel}$$

❖ *Capacité théorique maximum pour la putrescine* (calculée en masse de chlorhydrate à ajouter)

$$Q_{\text{mp}}^{\text{th}} = Q_{\max}^{\text{th}} \times M_p = 8,48 \times 10^{-5} \times 161 = \mathbf{13,7 \times 10^{-3} \text{ g/ ml gel}}$$

❖ *Capacité théorique maximum pour l'aminoguanidine* (calculée en masse de chlorhydrate à ajouter)

$$Q_{\text{mag}}^{\text{th}} = Q_{\max}^{\text{th}} \times M_{\text{ag}} = 8,48 \times 10^{-5} \times 110 = \mathbf{9,4 \times 10^{-3} \text{ g/ ml gel}}$$

Pour ces calculs, on considère que la stoechiométrie d'interaction entre la putrescine ou l'aminoguanidine et les groupes carboxylate est de 1.

## A

[Akiyoshi, 2000]

Akiyoshi, K., Kang, E.-C., Kurumada, S., Sunamoto, J. Principi, T., Winnik, F.M.  
Controlled association of amphiphilic polymers in water: Thermosensitive nanoparticles  
formed by self-assembly of hydrophobically modified pullulans and  
poly(N-isopropylacrylamides)  
Macromolecules 33 (9), pp. 3244-3249, 2000

[Amargier-Huin, 2005]

Amargier-Huin, C.  
Contribution à la mise au point d'un biomatériau de comblement à base de hyaluronate pour  
la réparation du cartilage  
Thèse INPL, 2005

[Aral, 1998]

Aral, C., Akbuga, J.  
Alternative approach to the preparation of chitosan beads  
International Journal of Pharmaceutics 168 (1), pp. 9-15, 1998

[Aubry, 1994]

Aubry, T. M. Moan  
Rheological behavior of hydrophobically associating water soluble polymer  
Journal of Rheology 38 (6), pp. 1681-1692, 1994

[Aymard, 2001]

Aymard, P., Martin, D.R., Plucknett, K., Foster, T.J., Clark, A.H., Norton, I.T.  
Influence of thermal history on the structural and mechanical properties of agarose gels  
Biopolymers 59 (3), pp. 131-144, 2001

[Aynié, 1997]

Aynié I., Vauthier C., Fattal E., Foulquier M., Couvreur P.  
Alginates nanoparticules as a novel carrier for antisense oligonucleotides  
In future strategies for drug delivery particulate systems  
CRC- Medpharm scientific publishers, 1997

## B

[Balakrishnan, 2005]

Balakrishnan, B., Jayakrishnan, A.  
Self-cross-linking biopolymers as injectable in situ forming biodegradable scaffolds  
Biomaterials 26 (18), pp. 3941-3951, 2005

[Balcom, 1989]

Balcom, B.J., Petersen, N.O.  
Solvent dependence of carboxylic acid condensations with dicyclohexylcarbodiimide  
Journal of Organic Chemistry 54 (8), pp. 1922-1927, 1989

[Ballantyne, 2001]

Ballantyne, B., Jordan, S.L.

Toxicological, medical and industrial hygiene aspects of glutaraldehyde with particular reference to its biocidal use in cold sterilization procedures

Journal of Applied Toxicology 21 (2), pp. 131-151, 2001

[Barbucci, 2000]

Barbucci, R., Rappuoli, R., Borzacchiello, A., Ambrosio, L.

Synthesis, chemical and rheological characterization of new hyaluronic acid-based hydrogels

Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition 11 (4), pp. 383-399, 2000

[Barbucci, 2002]

Barbucci, R., Consumi, M., Magnani, A.

Dependence of water uptake and morphology of hyaluronan- and alginate-based hydrogels on pH and degree of crosslinking

Macromolecular Chemistry and Physics 203 (10-11), pp. 1292-1300, 2002

[Barbucci, 2004]

Barbucci, R., Sportoletti, G.

Cross-linking process of carboxylated polysaccharides

Brevet, n° WO0027886, 2004

[Batchelor, 2002]

Batchelor, H.K., Banning, D., Dettmar, P.W., Hampson, F.C., Jolliffe, I.G., Craig, D.Q.M.

An in vitro mucosal model for prediction of the bioadhesion of alginate solutions to the oesophagus

International Journal of Pharmaceutics 238 (1-2), pp. 123-132, 2002

[Berger, 2004a]

Berger, J., Reist, M., Mayer, J.M., Felt, O., Peppas, N.A., Gurny, R.

Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 57 (1), pp. 19-34, 2004

[Berger, 2004b]

Berger, J., Reist, M., Mayer, J.M., Felt, O., Gurny, R.

Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 57 (1), pp. 35-52, 2004

[Berthold, 1996]

Berthold, A., Cremer, K., Kreuter, J.

Influence of crosslinking on the acid stability and physicochemical properties of chitosan microspheres

S.T.P. Pharma Sciences 6 (5), pp. 358-364, 1996

[Bodmeier, 1989]

Bodmeier, R., Chen, H.

Preparation and characterization of microspheres containing the anti-inflammatory agents, indomethacin, ibuprofen and ketoprofen

Journal of Controlled Release 10 (2), pp. 167-175, 1989

[Bohman, 2007]

Bohman, S., Waern, I., Andersson, A., King, A.

Transient beneficial effects of exendin-4 treatment on the function of microencapsulated mouse pancreatic islets

Cell Transplantation 16 (1), pp. 15-22, 2007

[Borchard, 2001]

Borchard, G.

Chitosans for gene delivery

Advanced Drug Delivery Reviews 52 (2), pp. 145-150, 2001

[Bowersock, 1997]

Bowersock, T.L., Hogenesch, H.

Oral immunization using microparticules

In Controlled Drug Delivery: challenges and strategies,

Edited by Kinam Park, ACS professional ref book 1997

[Bowersock, 1998a]

Bowersock, T.L., HogenEsch, H., Torregrosa, S., Borie, D., Wang, B., Park, H., Park, K.

Induction of pulmonary immunity in cattle by oral administration of ovalbumin in alginate microspheres

Immunology Letters 60 (1), pp. 37-43, 1998

[Bowersock, 1998b]

Bowersock, T.L., HogenEsch, H., Wang, B., Torregrosa, S., Borie, D.L., Park, H., Park, K.

Induction of pulmonary immunity in cattle by the oral administration of antigen encapsulated in alginate microspheres

S.T.P. Pharma Sciences 8 (1), pp. 53-57, 1998

[Bruckner, 1994]

Bruckner, P.

Structure and function of cartilage collagens

Microscopy Research and Technique 28 (5), pp. 378-384, 1994

[Bu, 2004]

Bu, H., Kjøniksen, A.-L., Knudsen, K.D., Nyström, B.

Rheological and structural properties of aqueous alginate during gelation via the Ugi multicomponent condensation reaction

Biomacromolecules 5 (4), pp. 1470-1479, 2004

[Bu, 2006]

Bu, H., Nguyen, G.T.M., Kjøniksen, A.-L.

Effects of the quantity and structure of hydrophobes on the properties of hydrophobically modified alginates in aqueous solutions

Polymer Bulletin 57 (4), pp. 563-574, 2006

[Burdick, 2006]

Burdick, J.A., Ward, M., Liang, E., Young, M.J., Langer, R.

Stimulation of neurite outgrowth by neurotrophins delivered from degradable hydrogels

Biomaterials 27 (3), pp. 452-459, 2006

## C

[Cadée, 2000]

Cadée, J.A., Van Luyn, M.J.A., Brouwer, L.A., Plantinga, J.A., Van Wachem, P.B., De Groot, C.J., Den Otter, W., Hennink, W.E.

In vivo biocompatibility of dextran-based hydrogels

Journal of Biomedical Materials Research 50 (3), pp. 397-404, 2000

[Calafiore, 2006]

Calafiore, R., Basta, G., Luca, G., Lemmi, A., Montanucci, M.P., Calabrese, G., Racanicchi, L., Brunetti, P.

Microencapsulated pancreatic islet allografts into nonimmunosuppressed patients with type 1 diabetes

Diabetes Care 29 (1), pp. 137-138, 2006

[Callegaro, 2004a]

Callegaro L.F., Pastorello A., Radice M., Pavesio A.

Injectable hyaluronic acid derivative with pharmaceuticals/cells

Brevet, n° 2004142465, 2004

[Callegaro, 2004b]

Callegaro L.F., Paparella A.M., Bellini D., O'Regan M.

Pharmaceutical compositions comprising a mixture of autocross-linked hyaluronic acid and nonautocross-linked hyaluronic acid and their use for the treatment of arthropathies

Brevet HK, n° 1024865, 2004

[Candau, 1998]

Candau, F., Selb, J.

Hydrophobically-modified polyacrylamides prepared by micellar polymerization

Advances in Colloid and Interface Science 79 (2-3), pp. 149-172, 1998

[Cassel, 1997]

Cassel, J.-C., Duconseille, E., Jeltsch, H., Will, B.

The fimbria-fornix/cingular bundle pathways: A review of neurochemical and behavioural approaches using lesions and transplantation techniques

Progress in Neurobiology 51 (6), pp. 663-716, 1997

[Cayot, 1997]

Cayot, P., Tainturier, G.

The quantification of protein amino groups by the trinitrobenzenesulfonic acid method: A reexamination

Analytical Biochemistry 249 (2), pp. 184-200, 1997

[Chang, 2001]

Chang, S.C.N., Rowley, J.A., Tobias, G., Genes, N.G., Roy, A.K., Mooney, D.J., Vacanti, C.A., Bonassar, L.J.

Injection molding of chondrocyte/ alginate constructs in the shape of facial implants

Journal of Biomedical Materials Research 55 (4), pp. 503-511, 2001

[Chen, 2001]

Chen, G., Ushida, T., Tateishi, T.

Development of biodegradable porous scaffolds for tissue engineering

Materials Science and Engineering C 17 (1-2), pp. 63-69, 2001

[Chen, 2003]

Chen, T., Embree, H.D., Brown, E.M., Taylor, M.M., Payne, G.F.

Enzyme catalyzed gel formation of gelatin and chitosan: potential for in situ applications

Biomaterials 24 (17), pp. 2831-2841, 2003

[Chevallay, 2000]

Chevallay, B., Abdul-Malak, N., Herbage, D.

Mouse fibroblasts in long-term culture within collagen three-dimensional scaffolds: Influence of crosslinking with diphenylphosphorylazide on matrix reorganization, growth, and biosynthetic and proteolytic activities

Journal of Biomedical Materials Research 49 (4), pp. 448-459, 2000

[Chung, 2002]

Taek, W.C., Yang, J., Akaike, T., Kwang, Y.C., Jae, W.N., Su, I.K., Chong, S.C.

Preparation of alginate/galactosylated chitosan scaffold for hepatocyte attachment

Biomaterials 23 (14), pp. 2827-2834, 2002

[Couvreur, 1985]

Couvreur, P.

Vecteurs nanoparticulaires de médicaments

In formes pharmaceutiques nouvelles: aspects technologique, biopharmaceutique et médical

Technique et documentation, 1985

[Crescenzi, 2002]

Crescenzi, V., Fancescangeli, A., Taglienti, A.

New gelatin-based hydrogels via enzymatic networking

Biomacromolecules 3 (6), pp. 1384-1391, 2002

[Creuzet, 2006]

Creuzet, C., Kadi, S., Rinaudo, M., Auzély-Velty, R.

New associative systems based on alkylated hyaluronic acid. Synthesis and aqueous solution properties

Polymer 47 (8), pp. 2706-2713, 2006

[Cui, 2006]

Cui, F.Z., Tian, W.M., Hou, S.P., Xu, Q.Y., Lee, I.-S.  
Hyaluronic acid hydrogel immobilized with RGD peptides for brain tissue engineering  
Journal of Materials Science: Materials in Medicine 17 (12), pp. 1393-1401, 2006

## D

[Dausse, 2003]

Dausse, Y., Grossin, L., Miralles, G., Palletier, S., Mainard, D., Hubert, P., Baptiste, D., (...),  
Payan, E.

Cartilage repair using new polysaccharidic biomaterials: macroscopic, histological and  
biochemical approaches in a rat model of cartilage defect  
Osteoarthritis and Cartilage 11 (1), pp. 16-28, 2003

[David, 1985]

David, S., Aguayo, A.J.

Axonal regeneration after crush injury of rat central nervous system fibres innervating  
peripheral nerve grafts  
Journal of Neurocytology 14 (1), pp. 1-12, 1985

[Deming, 1997]

Deming, T.J.

Facile synthesis of block copolypeptides of defined architecture  
Nature 390 (6658), pp. 386-389, 1997

[Denkbaş, 2002]

Denkbaş, E.B., Kiliçay, E., Birlikseven, C., Öztürk, E.

Magnetic chitosan microspheres: Preparation and characterization  
Reactive and Functional Polymers 50 (3), pp. 225-232, 2002

[Desbrières, 1996]

Desbrières, J., Martinez, C., Rinaudo, M.

Hydrophobic derivatives of chitosan: Characterization and rheological behaviour  
International Journal of Biological Macromolecules 19 (1), pp. 21-28, 1996

[Desbrières, 2004]

Desbrières, J.

Autoassociative natural polymer derivatives: The alkylchitosans. Rheological behaviour and  
temperature stability  
Polymer 45 (10), pp. 3285-3295, 2004

[Desprairies, 2002]

Desprairies, M.

Texturant systems, Les hydrocolloïdes autres que l'amidon  
Société Degussa, septembre 2002

[De Vos, 2002]

De Vos, P., Hamel, A.F., Tatarkiewicz, K.

Considerations for successful transplantation of encapsulated pancreatic islets  
Diabetologia 45 (2), pp. 159-173, 2002

[De Vos, 2006]

De Vos, P., Faas, M.M.,

Alginate-based microcapsules for immunoisolation of pancreatic islets

Biomaterials 27 (32), pp. 5603-5617, 2006

[Dhoot, 2004]

Dhoot, N.O., Tobias, C.A., Fischer, I., Wheatley, M.A.

Peptide-modified alginate surfaces as a growth permissive substrate for neurite outgrowth

Journal of Biomedical Materials Research - Part A 71 (2), pp. 191-200, 2004

[Draguet, 1994]

Draget, K.I., Braek, G.Skjak,

Alginate acid gels : the effect of alginate chemical composition and molecular weight

Carbohydrate Polymers 25 (1), pp. 31-38, 1994

[Draget, 1997]

Draget, K.I., Skjåk-Bræk, G.,

Alginate based new materials

International Journal of Biological Macromolecules 21 (1-2), pp. 47-55, 1997

[Draget, 2000]

Draget, K.I

Alginates, In Handbook of hydrocolloids

CRC Press, 2000

[Drury, 2003]

Drury, J.L., Mooney, D.J.

Hydrogel for tissue engineering scaffold design variables and applications

Biomaterials 24 (24), pp. 4337-4351, 2003

[Duconseille, 1997]

Restauration fonctionnelle après lésion massive des voies septo-hypocampiques chez le Rat: implantation conjointe de biomatériaux et de greffes homotopiques de neurones de projection

Thèse université Louis Pasteur de Strasbourg, 1997

[Duconseille, 1999]

Duconseille, E., Cressant, A., Kelche, C., Woerly, S., Will, B., Poucet, B.,

Cassel, J-C.

Homotopic septal grafts combined with a hydrogel bridge promote functional recovery in rats fimbria-fornix lesions : A unit recording study

Restorative Neurology and Neuroscience 15 (4), pp. 305-317, 1999

## **E**

[Eiselt, 1999]

Eiselt, P., Lee, K.Y., Mooney, D.J.

Rigidity of two-component hydrogels prepared from alginate and poly(ethylene glycol)-diamines

Macromolecules 32 (17), pp. 5561-5566, 1999

[El Ghzaoui, 2001]

El Ghzaoui, A., Trompette, J.L., Cassanas, G., Bardet, L., Fabregue, E.  
Comparative rheological behavior of some cellulosic ether derivatives  
Langmuir 17 (5), pp. 1453-1456, 2001

[Elliot, 2007]

Elliott, R.B., Escobar, L., Tan, P.L.J., Muzina, M., Zwain, S., Buchanan, C.  
Live encapsulated porcine islets from a type 1 diabetic patient 9.5 yr after  
xenotransplantation  
Xenotransplantation 14 (2), pp. 157-161, 2007

[Emerich, 2006]

Emerich, D.F., Thanos, C.G.

In vitro culture duration does not impact the ability of encapsulated choroid plexus transplants  
to prevent neurological deficits in an excitotoxin-lesioned rat model of Huntington's disease  
Cell Transplantation, Volume 15, Issue 7, pp 595-602, 2006

[English, 1999]

English, R.J., Raghavan, S.R., Jenkins, R.D., Khan, S.A.

Associative polymers bearing n-alkyl hydrophobes: rheological evidence for microgel-like  
behavior

Journal of Rheology 43 (5), pp. 1175-1194, 1999

[Eyrich, 2007]

Eyrich, D., Brandl, F., Appel, B., Wiese, H., Maier, G., Wenzel, M., Staudenmaier, R., Blunk,  
T.

Long-term stable fibrin gels for cartilage engineering

Biomaterials 28 (1), pp. 55-65, 2007

## **F**

[Fischbach, 2001]

Fischbach, C., Tessmar, J., Lucke, A., Schnell, E., Schmeer, G., Blunk, T., Göpferich, A.

Does UV irradiation affect polymer properties relevant to tissue engineering?

Surface Science 491 (3), pp. 333-345, 2001

[Fischer, 1955]

Fischer, F.G., Dorfel, H.

Die polyuronsauren der Braunalgalgen

Zeitschrift für Physikalische Chemie, pp. 186-203, 1955

[Fournier, 2003]

Fournier, E., Passirani, C., Montero-Menei, C.N., Benoit, J.P.

Biocompatibility of implantable synthetic polymeric drug carriers: Focus on brain  
biocompatibility

Biomaterials 24 (19), pp. 3311-3331, 2003

[Fragonas, 2000]

Fragonas, E., Valente, M., Pozzi-Mucelli, M., Toffanin, R., Rizzo, R., Silvestri, F., Vittur, F.  
Articular cartilage repair in rabbits by using suspensions of allogenic chondrocytes in alginate  
Biomaterials 21 (8), pp. 795-801, 2000

[Francesco, 1994]

Francesco D.V., Aurelio R.  
Brevet Européen, n° 341,745B1, 1994

[Friedman, 2002]

Friedman, J.A., Windebank, A.J., Moore, M.J., Spinner, R.J., Currier, B.L., Yaszemski, M.J.,  
Bartolomei, J., Wagner Jr., F.C.  
Biodegradable Polymer Graft for Surgical Repair of the Injured Spinal Cord  
Neurosurgery 51 (3), pp. 742-752, 2002

[Fusening, 2004]

Fusenig N.E., Willhauck M., Stark H.J., Pavesio A.  
Biomaterials based on hyaluronic acid for the anti-angiogenic therapy in the treatment of  
tumours  
Brevet, n°1463541, 2004.

[Fussenegger, 2006]

Fussenegger, M., Meinhart, J., Höbling, W., Kullich, W., Funk, S., Bernatzky, G.  
Stabilized Autologous Fibrin-Chondrocyte Constructs for Cartilage Repair in Vivo  
Annals of Plastic Surgery 51 (5), pp. 493-498, 2006

## G

[Galant, 2006]

Galant, C., Kjøniksen, A.-L., Nguyen, G.T.M., Knudsen, K.D., Nyström, B.  
Altering Associations in Aqueous Solutions of a hydrophobically Modified Alginate in  
Presence of  $\beta$ -Cyclodextrin Monomers  
Journal of Physical Chemistry B 110 (1), pp. 190-195, 2006

[Gamini, 2002]

Gamini, A., Paoletti, S., Toffanin, R., Micali, F., Michielin, L., Bevilacqua, C.  
Structural investigation of cross-linked hyaluronan  
Biomaterials 23 (4), pp. 1161-1167, 2002

[Garaud, 2004]

Garaud, J-C., Roussel, G.  
Immunohistochimie en microscopie photonique et électronique, Théorie et pratique  
Version électronique 2, 2004

[Gefen, 2003]

Gefen, A., Gefen, N., Zhu, Q., Raghupathi, R., Margulies, S.S.  
Age-Dependent Changes in Material Properties of the Brain and Braincase of the Rat  
Journal of Neurotrauma 20 (11), pp. 1163-1177, 2003

[Geller, 2002]

Geller, H.M., Fawcett, J.W.  
Building a bridge: Engineering spinal cord repair  
Experimental Neurology 174 (2), pp. 125-136, 2002

[Genta, 1997a]

Genta, I., Perugini, P., Conti, B., Pavanetto, F.  
A multiple emulsion method to entrap a lipophilic compound into chitosan microspheres  
International Journal of Pharmaceutics 152 (2), pp. 237-246, 1997

[Genta, 1997b]

Genta, I., Conti, B., Perugini, P., Pavanetto, F., Spadaro, A., Puglisi, G.  
Bioadhesive microspheres for ophthalmic administration of acyclovir  
Journal of Pharmacy and Pharmacology 49 (8), pp. 737-742, 1997

[Georges, 2006]

Georges, P.C., Miller, W.J., Meaney, D.F., Sawyer, E.S., Janmey, P.A.  
Matrices with compliance comparable to that of brain tissue select neuronal over glial growth  
in mixed cortical cultures  
Biophysical Journal 90 (8), pp. 3012-3018, 2006

[Gigant-Huselstein, 2004]

Gigant-Huselstein, C., Hubert, P., Dumas, D., Dellacherie, E., Netter, P., Payan, E., Stoltz, J.F.  
Expression of adhesion molecules and collagen on rat chondrocyte seeded into alginate and hyaluronate based 3D biosystems. Influence of mechanical stresses  
Biorheology 41 (3-4), pp. 423-431, 2004

[Gilbert, 2003]

Gilbert RJ and Bellamkonda RV, 2003, Regeneration of Nervous Tissue,  
Encyclopedia of Life Science, MacMillan Reference Ltd, Nature Publications, London, 2003

[Gombotz, 1998]

Gombotz, W.R., Wee, S.F.  
Protein release from alginate matrices  
Advanced Drug Delivery Reviews 31 (3), pp. 267-285, 1998

[Gonzalez, 2002]

González Ferreiro, M., Tillman, L.G., Hardee, G., Bodmeier, R.  
Alginate/poly-L-lysine microparticles for the intestinal delivery of antisense oligonucleotides  
Pharmaceutical Research 19 (6), pp. 755-764, 2002

[Grant, 1973]

Grant, G.T., Morris, E.R., Rees, D.A.  
Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg box model  
FEBS Letters 32 (1), pp. 195-198, 1973

[Grasdalen, 1981]

Grasdalen, H., Larsen, B., O. Smidsrod, O.

<sup>13</sup>C-N.M.R studies of monomeric composition and sequence in alginate  
Carbohydrate Research, 81, pp. 79-191, 1981

[Gray, 1990]

Gray, C.J., Griffiths, A.J., Stevenson, D.L., Kennedy, J.F.

Studies on the chemical stability of propylene glycol alginate esters  
Carbohydrate Polymers 12 (4), pp. 419-430, 1990

[Gritz, 1982]

Gritz, D.C., Lee, T.Y., McDonnell, P.J., Shih, K., Baron, N.

Ultraviolet radiation for sterilization of contact lenses  
CLAO Journal 16 (4), pp. 294-298, 1982

[Gupte, 1999]

Gupte, A., D'Souza, S.F.

Stabilization of alginate beads using radiation polymerized polyacrylamide  
Journal of Biochemical and Biophysical Methods 40 (1-2), pp. 39-44, 1999

[Guo, 1989]

Guo, J.F., Jourdian, G.W., MacCallum, D.K.

Culture and growth characteristics of chondrocytes encapsulated in alginate beads  
Connective Tissue Research 19 (2-4), pp. 277-297, 1989

## H

[Han, 2004]

Han, S.-Y., Kim, Y.-A.

Recent development of peptide coupling reagents in organic synthesis  
Tetrahedron 60 (11), pp. 2447-2467, 2004

[Hardikar, 1999]

Hardikar, A.A., Risbud, M.V., Bhonde, R.R.

A simple microcapsule generator design for islet encapsulation  
Journal of Biosciences 24 (3), pp. 371-376, 1999

[Haug, 1966]

Haug, A.; Larsen, B.; Smidsrod, O.

A study of the constitution of alginic acid by partial acid hydrolysis  
Acta Chemica Scandinavica 20, pp. 183-190, 1966

[Haug, 1967]

Haug A., Myklestad S., Larsen B., Smidsrod O.

Correlation between chemical structure and physical properties of alginates  
Acta Chemica Scandinavica 21, pp. 768-778, 1967

[Haug, 1974]

Haug A., Larsen B., Smidsrod O.

Uronic acid sequence in alginate from different sources  
Carbohydrate Research 32, pp. 217-225, 1974

[Hauselmann, 1994]

Häuselmann, H.J., Fernandes, R.J., Mok, S.S., Schmid, T.M., Block, J.A., Aydelotte, M.B., Kuettner, K.E., Thonar, E.J.-M.A.

Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads  
*Journal of Cell Science* 107 (1), pp. 17-27, 1994

[Heymann, 1935]

Heymann E.

Studies on sol-gel transformations, I. The inverse sol-gel transformation of methylcellulose in water

*Transactions of the Faraday Society*, 31, pp. 846-864, 1935

[Heyraud, 1996]

Heyraud, A., Colin-Morel, P., Girond, S., Richard, C., Kloareg, B.

HPLC analysis of saturated or unsaturated oligoguluronates and oligomannuronates.

Application to the determination of the action pattern of *Haliotis tuberculata* alginate lyase  
*Carbohydrate Research* 291, pp. 115-126, 1996

[Holmes, 2000]

Holmes, T.C., De Lacalle, S., Su, X., Liu, G., Rich, A., Zhang, S.

Extensive neurite outgrowth and active synapse formation on self-assembling peptide scaffolds

*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (12), pp. 6728-6733, 2000

[Hooper, 1997]

Hooper, K.A., Cox, J.D., Kohn, J.

Comparison of the effect of ethylene oxide and  $\gamma$ -irradiation on selected tyrosine-derived polycarbonates and poly(L-lactic acid)

*Journal of Applied Polymer Science* 63 (11), pp. 1499-1510, 1997

[Hou, 2005]

Hou, S., Xu, Q., Tian, W., Cui, F., Cai, Q., Ma, J., Lee, I.-S.

The repair of brain lesion by implantation of hyaluronic acid hydrogel modified with laminin  
*Journal of Neuroscience Methods* 148 (1), pp. 60-70, 2005

[Houweling, 1998]

Houweling, D.A., Lankhorst, A.J., Gispen, W.H., Bär, P.R., Joosten, E.A.J.

Collagen containing neurotrophin-3 (NT-3) attracts regrowing injured corticospinal axons in the adult rat spinal cord and promotes partial functional recovery

*Experimental Neurology* 153 (1), pp. 49-59, 1998

[Houzelle, 1998]

Dérivés amphiphiles associatifs de la pectine : diverses voies de synthèse. Etude comparative des propriétés physico-chimiques des solutions aqueuses en régime dilué et semi-dilué

Thèse INPL, 1998

[Huang, 2001]

Huang, L., Nagapudi, K., Apkarian, R.P., Chaikof, E.L.  
Engineered collagen-PEO nanofibers and fabrics  
Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition 12 (9), pp. 979-993, 2001

[Hwang, 1993]

Hwang, F.S., Hogen-Esch, T.E.  
Fluorocarbon-modified water-soluble cellulose derivatives  
Macromolecules 26 (12), pp. 3156-3160, 1993

## **J**

[Jain, 2006]

Jain, A., Kim, Y.-T., McKeon, R.J., Bellamkonda, R.V.  
In situ gelling hydrogel for conformal repair of spinal cord defects, and local delivery of BDNF after spinal cord  
Biomaterials 27 (3), pp. 497-504, 2006

[Janes, 2001]

Janes, K.A., Fresneau, M.P., Marazuela, A., Fabra, A., Alonso, M.J.  
Chitosan nanoparticles as delivery systems for doxorubicin  
Journal of Controlled Release 73 (2-3), pp. 255-267, 2001

[Jin, 2001]

Jin, Y., Yamanaka, J., Sato, S., Miyata, I., Yomota, C., Yonese, M.  
Recyclable characteristics of hyaluronate-polyhydroxyethyl acrylate blend hydrogel for controlled releases  
Journal of Controlled Release 73 (2-3), pp. 173-181, 2001

[Ju, 2007]

Ju, Y.-E., Janmey, P.A., McCormick, M.E., Sawyer, E.S., Flanagan, L.A.  
Enhanced neurite growth from mammalian neurons in three-dimensional salmon fibrin gels  
Biomaterials 28 (12), pp. 2097-2108, 2007

## **K**

[Kawamura, 1998]

Kawamura, S., Wakitani, S., Kimura, T., Maeda, A., Caplan, A.I., Shino, K., Ochi, T.  
Articular cartilage repair: Rabbit experiments with a collagen gel-biomatrix and chondrocytes cultured in it  
Acta Orthopaedica Scandinavica 69 (1), pp. 56-62, 1998

[Kellar, 1979]

Mc Kellar J.F., Allen N.S.  
Photochemistry of Man-Made Polymers  
Applied Science Publishers, Barking, England, 1979

[Kim, 1999]

Kim, S.-H., Won, C.-Y., Chu, C.-C.

Synthesis and characterization of dextran-maleic acid based hydrogel

Journal of Biomedical Materials Research 46 (2), pp. 160-170, 1999

[Kisiday, 2002]

Kisiday, J., Jin, M., Kurz, B., Hung, H., Semino, C., Zhang, S., Grodzinsky, A.J.

Self-assembling peptide hydrogel fosters chondrocyte extracellular matrix production and cell division: Implications for cartilage tissue repair

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99 (15), pp. 9996-10001, 2002

[Klöck, 1997]

Klöck, G., Pfeffermann, A., Ryser, C., Gröhn, P., Kuttler, B., Hahn, H.-J., Zimmermann, U.

Biocompatibility of mannuronic acid-rich alginate

Biomaterials 18 (10), pp. 707-713, 1997

[Klöck, 1994]

Klöck, G., Frank, H., Houben, R., Zekorn, T., Horcher, A., Siebers, U., Wohrle, M., Zimmermann, U.

Production of purified alginates suitable for use in immunoisolated transplantation

Applied Microbiology and Biotechnology 40 (5), pp. 638-643, 1994

[Knott, 1948]

Knott, E.K.

Development of Ultra Violet Blood Irradiation

American Journal of Surgery 76, pp. 165-171, 1948

[Kolb, 2002]

Kolb, B., Wishaw, I.

Cerveau & Comportement

Traduction de la première édition américaine par Cassel, J.-C., et Jeltsch, H.

De boeck, 2002

[Kuijpers, 2000]

Kuijpers, A.J., Engbers, G.H.M., Krijgsveld, J., Zaat, S.A.J., Dankert, J., Feijen, J.

Cross-linking and characterisation of gelatin matrices for biomedical application

Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition 11 (3), pp. 225-243, 2000

[Kuijlen, 2006]

Kuijlen, J.M.A., de Haan, B.J., Helfrich, W., de Boer, J.-F., Samplonius, D., Mooij, J.J.A., de Vos, P.

The efficacy of alginate encapsulated CHO-K1 single chain-Trail producer cells in the treatment of brain tumors

Journal of Neuro-Oncology 78 (1), pp. 31-39, 2006

[Kulkarni, 2000a]

Kulkarni, A.R., Soppimath, K.S., Aralaguppi, M.I., Aminabhavi, T.M., Rudzinski, W.E.

Preparation of cross-linked sodium alginate microparticles using glutaraldehyde in methanol

Drug Development and Industrial Pharmacy 26 (10), pp. 1121-1124, 2000

[Kulkarni, 2000b]

Kulkarni, A.R., Soppimath, K.S., Aminabhavi, T.M., Dave, A.M., Mehta, M.H.  
Glutaraldehyde crosslinked sodium alginate beads containing liquid pesticide for soil application  
Journal of Controlled Release 63 (1-2), pp. 97-105, 2000

## L

[Langer, 1999]

Langer, R.S., Vacanti, J.P.  
Tissue engineering: the challenges ahead  
Scientific American 280 (4), pp. 86-89, 1999

[Laurencin, 1994]

Laurencin CT, Elgandy H.  
The biocompatibility and toxicity of degradable polymeric materials: implications for drug delivery  
In: Domb AJ, editor. Polymeric site-specific pharmacotherapy. New York: John Wiley and Sons Ltd 27-46, 1994

[Lee, 1996] =

Lee, J.M., Edwards, H.H.L., Pereira, C.A., Samii, S.I.  
Crosslinking of tissue-derived biomaterials in 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC)  
Journal of Materials Science: Materials in Medicine 7 (9), pp. 531-541, 1996

[Lee, 2000]

Lee, K.Y., Rowley, J.A., Eiselt, P., Moy, E.M., Bouhadir, K.H., Mooney, D.J.  
Controlling mechanical and swelling properties of alginate hydrogels independently by cross-linker type and cross-linking density  
Macromolecules 33 (11), pp. 4291-4294, 2000

[Lee, 2001]

Lee, K.Y., Mooney, D.J.  
Hydrogels for tissue engineering  
Chemical Reviews 101 (7), pp. 1869-1879, 2001

[Lee, 2001]

Lee, C.H., Singla, A., Lee, Y.  
Biomedical applications of collagen  
International Journal of Pharmaceutics 221 (1-2), pp. 1-22, 2001

[Lee, 2001]

Lee, C.R., Grodzinsky, A.J., Spector, M.  
The effects of cross-linking of collagen-glycosaminoglycan scaffolds on compressive stiffness, chondrocyte-mediated contraction, proliferation and biosynthesis  
Biomaterials 22 (23), pp. 3145-3154, 2001

[Leibler, 1991]  
Leibler, L., Rubinstein, M., Colby, R.H.  
Dynamics of reversible networks  
Macromolecules 24 (16), pp. 4701-4707, 1991

[Leonard, 2004]  
Leonard, M., Rastello De Boisseson, M., Hubert, P., Dellacherie, E.  
Production of microspheres based on hydrophobically associating alginate derivatives by dispersion/gelation in aqueous sodium chloride solutions  
Journal of Biomedical Materials Research - Part A 68 (2), pp. 335-342, 2004

[Lim, 1998]  
Lim, L.Y., Wan, L.S.C.  
Effect of magnesium stearate on chitosan microspheres prepared by an emulsification-coacervation technique  
Journal of Microencapsulation 15 (3), pp. 319-333, 1998

[Loebbeck, 2001]  
Loebbeck, A., Greene, K., Wyatt, S., Culberson, C., Austin, C., Beiler, R., Roland, W., (...), Halberstadt, C.  
In vivo characterization of a porous hydrogel material for use as a tissue bulking agent  
Journal of Biomedical Materials Research 57 (4), pp. 575-581, 2001

## M

[Magny, 1992]  
Magny, B., Lafuma, F., Iliopoulos, I.  
Determination of microstructure of hydrophobically modified water-soluble polymers by <sup>13</sup>C. N.M.R  
Polymer 33, pp. 3151-3154, 1992

[Mahoney, 2006]  
Mahoney, M.J., Anseth, K.S.  
Three dimensional growth and function of neural tissue in degradable polyethylene glycol hydrogels  
Biomaterials 27 (10), pp. 2265-2274, 2006

[March, 1985]  
Advanced Organic Chemistry, Reactions, Mechanisms and Structure, 1985

[Martin, 2003]  
Martin, L., Wilson, C.G., Koosha, F., Uchegbu, I.F.  
Sustained buccal delivery of the hydrophobic drug denbufylline using physically cross-linked palmitoyl glycol chitosan hydrogels  
European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 55 (1), pp. 35-45, 2003

[Martinsen, 1989]

Martinsen, A., Skjak-Braek, G., Smidsrod, O.

Alginate as immobilization material: I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads

Biotechnology and Bioengineering 33 (1), pp. 79-89, 1989

[Mazens, 2005]

Mazens, D.

Etude du transfert diffusionnel de solutés macromoléculaires dans les hydrogels d'alginate de calcium

Thèse INPL, 2005

[McMillan, 2003]

McMillan, R.A., Conticello, V.P.

Synthesis and Characterization of Elastin-Mimetic Protein Gels Derived from a Well-Defined Polypeptide Precursor

Macromolecules 33 (13), pp. 4809-4821, 2003

[Maysinger, 1992]

Maysinger, D., Jalsenjak, I., Cuello, A.C.

Microencapsulated nerve growth factor: Effects on the forebrain neurons following devascularizing cortical lesions

Neuroscience Letters 140 (1), pp. 71-74, 1992

[Meinhart, 1999]

Meinhart, J., Fussenegger, M., Höbling, W.

Stabilization of fibrin-chondrocyte constructs for cartilage reconstruction

Annals of Plastic Surgery 42 (6), pp. 673-678, 1999

[Menei, 2005]

Menei, P

Traumatisme médullaire, optimisation des circuits indemnes: recherches et thérapies nouvelles

Journée d'information APF/IRME/ AFIGAP, 2 décembre 2005

[Mi, 1999]

Mi, F.-L., Shyu, S.-S., Wong, T.-B., Jang, S.-F., Lee, S.-T., Lu, K.-T.

Chitosan-polyelectrolyte complexation for the preparation of gel beads and controlled release of anticancer drug. II. Effect of pH-dependent ionic crosslinking or interpolymer complex using tripolyphosphate or polyphosphate as reagent

Journal of Applied Polymer Science 74 (5), pp. 1093-1107, 1999

[Mi, 2000a]

Mi, F.-L., Sung, H.-W., Shyu, S.-S.

Synthesis and characterization of a novel chitosan-based network prepared using naturally occurring crosslinker

Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry 38 (15), pp. 2804-2814, 2000

[Mi, 2000b]

Mi, F.-L., Kuan, C.-Y., Shyu, S.-S., Lee, S.-T., Chang, S.-F.

The study of gelation kinetics and chain relaxation properties of glutaraldehyde-cross-linked chitosan gel and their effects on microspheres preparation and drug release

Carbohydrate Polymers 41 (4), pp. 389-396, 2000

[Mierisch, 2003]

Mierisch, C.M., Wilson, H.A., Turner, M.A., Milbrandt, T.A., Berthouex, L., Hammarskjöld, M.-L., Rekosh, D., (...), Diduch, D.R.

Chondrocyte transplantation into articular cartilage defects with use of calcium alginate: the fate of the cells

Journal of Bone and Joint Surgery - Series A 85 (9), pp. 1757-1767, 2003

[Miralles-Houzelle, 2001]

Miralles-Houzelle, M.C., Hubert, P., Dellacherie, E.

Hydrophobic alkyl chains-pectin conjugates. Comparative study of some physicochemical properties in relation to covalent coupling vs ionic association

Langmuir 17 (5), pp. 1384-1391, 2001

[Moe, 1991]

Moe, Skjåk-Braek and Smidsrød

Covalently cross-linked sodium alginate beads

Food Hydrocolloid., 5, 119, 1991

[Molinaro, 2002]

Molinaro, G., Leroux, J.-C., Damas, J., Adam, A.

Biocompatibility of thermosensitive chitosan-based hydrogels: An in vivo experimental approach to injectable biomaterials

Biomaterials 23 (13), pp. 2717-2722, 2002

[Molteni, 1990]

Modified galactomannans and process for their preparation

Brevet US n° 4,960,876, 1990

[Moochhala, 2004]

Moochhala, S.M., Lu, J., Teng, C.-H., Greengrass, C.

Neuroprotective role of aminoguanidine in behavioral changes after blast injury

Journal of Trauma - Injury, Infection and Critical Care 56 (2), pp. 393-403, 2004

[Morgan, 1994]

Morgan, J.M., Navabi, H., Schmid, K.W., Jasani, B.

Possible role of tissue-bound calcium ions in citrate-mediated high-temperature antigen retrieval

Journal of Pathology 174 (4), pp. 301-307, 1994

[Morris, 1980]

Morris, E.D., Ress, G.R., Thom D.,

Characterisation of alginate composition and block-structure by circular dichroism

Carbohydrate Research 81, pp. 305-314, 1980

[Mrini, 1995]

Mrini, A., Moukhles, H., Jacomy, H., Bosler, O., Doucet, G.  
Efficient immunodetection of various protein antigens in glutaraldehyde- fixed brain tissue  
Journal of Histochemistry and Cytochemistry 43 (12), pp. 1285-1291, 1995

[Mukaiyama, 1979]

Mukaiyama, Teruaki

New synthetic reactions based on the onium salts of aza-arenes  
Angewandte Chemie - International Edition in English 18 (10), pp. 707-721, 1979

[Muller, 2007]

Muller, C., Herberth, H., Cosquer, B., Kelche, C., Cassel, J.-C., Schimchowitsch, S.  
Structural and functional recovery elicited by combined putrescine and aminoguanidine  
treatment after aspirative lesion of the fimbria-fornix and overlying cortex in the adult rat  
European Journal of Neuroscience 25 (7), pp. 1949-1960, 2007

[Murata, 2002]

Murata, Y., Kontani, Y., Ohmae, H., Kawashima, S.

Behavior of alginate gel beads containing chitosan salt prepared with water-soluble vitamins  
European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 53 (2), pp. 249-251, 2002

## N

[Naraghi , 1998]

Naraghi, K., Soussand, J., Felix, J.M., Schimchowitsch, S., Lutz, P.J.

Poly(ethylene oxide) hydrogels : a template for the growth of nervous cells  
American Chemical Society, Polymer Preprints, Division of Polymer Chemistry 39 (2), pp.  
196-197, 1998

[Novikova, 2003]

Novikova, L.N., Novikov, L.N., Kellerth, J.-O.

Biopolymers and biodegradable smart implants for tissue regeneration after spinal cord injury  
Current Opinion in Neurology 16 (6), pp. 711-715, 2003

## O

[O'Brien, 1993]

O'Brien, J.P.

New structure polymers from nature  
Trends in polymer science 8, pp. 228, 1993

[Orive, 2002]

Orive, G., Ponce, S., Hernández, R.M., Gascón, A.R., Igartua, M., Pedraz, J.L.

Biocompatibility of microcapsules for cell immobilization elaborated with different type of  
alginates  
Biomaterials 23 (18), pp. 3825-3831, 2002

## P

[Panasiuk, 1998]

Panasiuk, R., Amarowicz, R., Kostyra, H., Sijtsma, L.  
Determination of  $\alpha$ -amino nitrogen In pea protein hydrolysates : a comparison of three analytical methods  
Food Chemistry 62 (3), pp. 363-367, 1998

[Park, 2000]

Park, D.-J., Park, S.-Y., Bong, J.-P., Hong, K.-S.  
Cartilage generation using alginate-encapsulated autogenous chondrocytes in rabbits  
Annals of Otology, Rhinology and Laryngology 109 (12 I), pp. 1157-1161, 2000

[Park, 2002a]

Park, S.-N., Park, J.-C., Kim, H.O., Song, M.J., Suh, H.  
Characterization of porous collagen/hyaluronic acid scaffold modified by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide cross-linking  
Biomaterials 23 (4), pp. 1205-1212, 2002

[Park, 2002b]

Park, K.I., Teng, Y.D., Snyder, E.Y.  
The injured brain interacts reciprocally with neural stem cells supported by scaffolds to reconstitute lost tissue  
Nature Biotechnology 20 (11), pp. 1111-1117, 2002

[Pelletier, 1999]

Synthèse et caractérisations physico-chimiques de dérivés associatifs d'alginate et de hyaluronate de sodium en vue d'applications biomédicales  
Thèse INPL, 1999

[Pelletier, 2000]

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 (4), pp. 343-349, 2000

[Pelletier, 2001]

Pelletier, S., Hubert, P., Payan, E., Marchal, P., Choplin, L., Dellacherie, E.  
Amphiphilic derivatives of sodium alginate and hyaluronate for cartilage repair: Rheological properties  
Journal of Biomedical Materials Research 54 (1), pp. 102-108, 2001

[Peppas, 2000]

Peppas, N.A., Bures, P., Leobandung, W., Ichikawa, H.  
Hydrogels in pharmaceutical formulations  
European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 50 (1), pp. 27-46, 2000

[Petka, 1998]

Petka, W.A., Harden, J.L., McGrath, K.P., Wirtz, D., Tirrell, D.A.  
Reversible hydrogels from self-assembling artificial proteins  
Science 281 (5375), pp. 389-392, 1998

[Philipps, 1999]

Philipps A.G.

Desinfektion mit UV-Strahlung

Strahlenquellen, technische Hinweise und Anwendung, Wünbach, Germany, 1999

[Piantino, 2006]

Piantino, J., Burdick, J.A., Goldberg, D., Langer, R., Benowitz, L.I.

An injectable, biodegradable hydrogel for trophic factor delivery enhances axonal rewiring and improves performance after spinal cord injury

Experimental Neurology 201 (2), pp. 359-367, 2006

[Prabaharan, 2006]

Prabaharan, M., Mano, J.F.

Stimuli-responsive hydrogels based on polysaccharides incorporated with thermo-responsive polymers as novel biomaterials

Macromolecular Bioscience 6 (12), pp. 991-1008, 2006

[Praschak, 1998]

Praschak, D., Bahnert, T., Schollmeyer, E.

PET surface modifications by treatment with monochromatic excimer UV lamps

Applied Physics A: Materials Science and Processing 66 (1), pp. 69-75, 1998

[Prestwich, 1998]

Prestwich, G.D., Marecak, D.M., Marecek, J.F., Vercruyssen, K.P., Ziebell, M.R.

Controlled chemical modification of hyaluronic acid: Synthesis, applications, and biodegradation of hydrazide derivatives

Journal of Controlled Release 53 (1-3), pp. 93-103, 1998

## Q

[Qu, 2000]

Qu, X., Wirsen, A., Albertsson, A.-C.

Novel pH-sensitive chitosan hydrogels: Swelling behavior and states of water

Polymer 41 (12), pp. 4589-4598, 2000

## R

[Ramer, 2004]

Ramer, L.M., Borisoff, J.F., Ramer, M.S.

Rho-Kinase inhibition enhances axonal plasticity and attenuates cold hyperalgesia after dorsal rhizotomy

Journal of Neuroscience 24 (48), pp. 10796-10805, 2004

[Rastello, 2002]

Rastello De Boissesson, M.

Microparticules d'alginate associatifs : élaboration et encapsulation de molécules actives

Thèse INPL, 2002

[Rastello, 2004]

Rastello De Boissesson, M.R., Leonard, M., Hubert, P., Marchal, P., Stequert, A., Castel, C., Favre, E., Dellacherie, E.

Physical alginate hydrogels based on hydrophobic or dual hydrophobic/ionic interactions: Bead formation, structure, and stability

Journal of Colloid and Interface Science 273 (1), pp. 131-139, 2004

[Rees, 1972]

Rees, D.A.

Shapely polysaccharides. The eighth Colworth Medal Lecture

Biochemical Journal 126 (2), pp. 257-273, 1972

[Rosdy, 1990]

Rosdy, M., Clauss, L.-C.

Cytotoxicity testing of wound dressings using normal human keratinocytes in culture

Journal of Biomedical Materials Research 24 (3), pp. 363-377, 1990

[Rowley, 1999]

Rowley, J.A., Madlambayan, G., Mooney, D.J.

Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials

Biomaterials 20 (1), pp. 45-53, 1999

## S

[Sank, 1989]

Sank, A., Chi, M., Shima, T., Reich, R., Martin, G.R.

Increased calcium levels after cellular and molecular events in wound healing

Surgery 106 (6), pp. 1141-1148, 1989

[Sarkar, 1979]

Sarkar, N.

Thermal gelation properties of methyl and hydroxypropylmethylcellulose

Journal of Applied Polymer Science 24 (4), pp. 1073-1087, 1979

[Schimchowitsch, 2006]

Schimchowitsch, S., Cassel, J.-C.

Polyamine and aminoguanidine treatments to promote structural and functional recovery in the adult mammalian brain after injury: A brief literature review and preliminary data about their combined administration

Journal of Physiology Paris 99 (2-3), pp. 221-231, 2006

[Schoof, 2001]

Schoof, H., Apel, J., Heschel, I., Rau, G.

Control of pore structure and size in freeze-dried collagen sponges

Journal of Biomedical Materials Research 58 (4), pp. 352-357, 2001

- [Schwab, 2005]  
Schwab, Buchli  
Regeneration of functional Neuronal Connections  
Encyclopedia of life sciences, John Wiley & Sons, Ltd. www.els.net, 2005
- [Shalaby, 1994]  
Shalaby WSW, Park K.  
Chemical modification of proteins and polysaccharides and its effect on enzyme-catalyzed degradation. In: Shalaby SW, editor. Biomedical polymers: designed to degrade systems  
Munich: Hanser Publishers; 1994
- [Shapiro, 1997]  
Shapiro, L., Cohen, S.  
Novel alginate sponges for cell culture and transplantation  
Biomaterials 18 (8), pp. 583-590, 1997
- [Shchipunov, 2000]  
Y. A. Shchipunov, I. V. Postnova and V. P. Greben  
Preparation of calcium alginate gels by electro dialysis  
Russian journal of physical chemistry 74, pp. 1168-1171, 2000
- [Shin, 2003]  
Shin, H., Jo, S., Mikos, A.G.  
Biomimetic materials for tissue engineering  
Biomaterials 24 (24), pp. 4353-4364, 2003
- [Sierakowski, 2000]  
Sierakowski, M.R., Milas, M., Desbrières, J., Rinaudo, M.  
Specific modifications of galactomannans  
Carbohydrate Polymers 42 (1), pp. 51-57, 2000
- [Sintzel, 1997]  
Sintzel, M.B., Merkli, A., Tabatabay, C., Gurny, R.  
Influence of irradiation sterilization on polymers used as drug carriers - A review  
Drug Development and Industrial Pharmacy 23 (9), pp. 857-878, 1997
- [Skaugrud, 1995]  
Skaugrud, O.  
Drug delivery systems with alginate and chitosan,  
In Excipients and delivery systems for pharmaceutical formulations Edited by DR Karsa and RA Stephenson, The Royal Society of Chemistry, 1995
- [Skaugrud, 1999]  
Skaugrud, Ø., Hagen, A., Borgersen, B., Dornish, M.  
Biomedical and pharmaceutical applications of alginate and chitosan  
Biotechnology and Genetic Engineering Reviews 16, pp. 23-40, 1999

[Skjak, 1989]

Skjak-Braek, G., Murano, E., Paoletti, S.

Alginate as immobilization material. II. Determination of polyphenol contaminants by fluorescence spectroscopy, and evaluation of methods for their removal

Biotechnology and Bioengineering 33 (1), pp. 90-94, 1989

[Sludden, 2000]

Sludden, J., Uchegbu, I.F., Schätzlein, A.G.

The encapsulation of bleomycin within chitosan based polymeric vesicles does not alter its biodistribution

Journal of Pharmacy and Pharmacology 52 (4), pp. 377-382, 2000

[Smeds, 2001]

Smeds, K.A., Grinstaff, M.W.

Photocrosslinkable polysaccharides for in situ hydrogel formation

Journal of Biomedical Materials Research 54 (1), pp. 115-121, 2001

[Smidsrod, 1972]

Smidsrod, O., Haug, A

Dependence upon the gel-sol state of the ion-exchange properties of alginates

Acta chemica Scandinavica 26 (5), pp. 2063-2074, 1972

[Smidsrod, 1990]

Smidsrod, O., Skjak-Braek, G.

Alginate as immobilization matrix for cells

Trends in Biotechnology 8 (3), pp. 71-78, 1990

[Smith, 1982]

Smith, P.F., Keefer, D.A.

Acrolein/glutaraldehyde as a fixative for combined light and electron microscopic immunocytochemical detection of pituitary hormones in immersion-fixed tissue

Journal of Histochemistry and Cytochemistry 30 (12), pp. 1307-1310, 1982

[Speer, 1980]

Speer, D.P., Chvapil, M., Eskelson, C.D., Ulreich, J.

Biological effects of residual glutaraldehyde in glutaraldehyde-tanned collagen biomaterials

Journal of Biomedical Materials Research 14 (6), pp. 753-764, 1980

[Sperling, 1981]

Sperling L.H

Interpenetrating Polymer Network and Related Materials

Plenum Press, New York, 1981

[Sun, 1993]

Sun, A.M.

Encapsulation of living cells: potential medical applications

In 9 th International Symposium on Microencapsulation, EDS Edition, 1993

[Sung, 1999]

Sung, H.-W., Huang, R.-N., Huang, L.L.H., Tsai, C.-C.

In vitro evaluation of cytotoxicity of a naturally occurring cross-linking reagent for biological tissue fixation

Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition 10 (1), pp. 63-78, 1999

[Suzuki, 1999a]

Suzuki, K., Suzuki, Y., Ohnishi, K., Endo, K., Tanihara, M., Nishimura, Y.

Regeneration of transected spinal cord in young adult rat using freeze-dried alginate gel

NeuroReport 10 (14), pp. 2891-2894, 1999

[Suzuki, 1999b]

Suzuki, K., Suzuki, Y., Ohnishi, K., Endo, K., Tanihara, M., Nishimura, Y.

Reconstruction of rat peripheral nerve gap without sutures using freeze-dried alginate gel

Journal of Biomedical Materials Research 49 (4), pp. 528-533, 1999

## T

[Takka, 1998]

Takka, S., Ocak, O.H., Acartürk, F.

Formulation and investigation of nicardipine HCl-alginate gel beads with factorial design-based studies

European Journal of Pharmaceutical Sciences 6 (3), pp. 241-246, 1998

[Tam, 1998]

Tam, K.C., Jenkins, R.D., Winnik, M.A., Bassett, D.R.

A structural model of hydrophobically modified urethane-ethoxylate (HEUR) associative polymers in shear flows

Macromolecules 31 (13), pp. 4149-4159, 1998

[Tan, 2000]

Tan, H., Tam, K.C., Tirtaatmadja, V., Jenkins, R.D., Bassett, D.R.

Extensional properties of model hydrophobically modified alkali-soluble associative (HASE) polymer solutions

Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics 92 (2-3), pp. 167-185, 2000

[Tan, 2001]

Tan, W., Krishnaraj, R., Desai, T.A.

Evaluation of nanostructured composite collagen-chitosan matrices for tissue engineering

Tissue Engineering 7 (2), pp. 203-210, 2001

[Tannahill, 2001]

Tannahill D., Nobes C.

Axon Growth

Encyclopedia of life sciences, John Wiley & Sons, Ltd. www.els.net, 2001

[Tate, 2001]

Tate, M.C., Shear, D.A., Hoffman, S.W., Stein, D.G., LaPlaca, M.C.  
Biocompatibility of methylcellulose-based constructs designed for intracerebral gelation following experimental traumatic brain injury  
Biomaterials 22 (10), pp. 1113-1123, 2001

[Thomson, 2000]

Thomson RC, Shung AK, Yaszemski MJ, Mikos AG.  
Polymer scaffold processing, in Lanza RP, Langer R, Vacanti J (eds): Principles of Tissue Engineering. San Diego, Academic Press, ed 2, pp. 251-262, 2000

[Tian, 2005a]

Tian, W.M., Hou, S.P., Ma, J., Zhang, C.L., Xu, Q.Y., Lee, I.S., Li, H.D., (...), Cui, F.Z.  
Hyaluronic acid-poly-D-lysine-based three dimensional hydrogel for traumatic brain injury  
Tissue Engineering 11 (3-4), pp. 513-525, 2005

[Tian, 2005b]

Tian, W.M., Zhang, C.L., Hou, S.P., Yu, X., Cui, F.Z., Xu, Q.Y., Sheng, S.L., (...), Li, H.D.  
Hyaluronic acid hydrogel as Nogo-66 receptor antibody delivery system for the repairing of injured rat brain: In vitro  
Journal of Controlled Release 102 (1), pp. 13-22, 2005

[Tirtaatmadja, 1997a]

Tirtaatmadja, V., Tam, K.C., Jenkins, R.D.  
Superposition of oscillations on steady shear flow as a technique for investigating the structure of associative polymers  
Macromolecules 30 (5), pp. 1426-1433, 1997

[Tirtaatmadja, 1997b]

Tirtaatmadja, V., Ta, K.C., Jenkins, R.D.  
Rheological properties of model alkali-soluble associative (HASE) polymers: Effect of varying hydrophobe chain length  
Macromolecules 30 (11), pp. 3271-3282, 1997

## V

[Vandenberg, 2001]

Vandenberg, G.W, Drolet, C., Scott, S.L, De la Noüe, J.  
Factors affecting protein release from alginate-chitosan coacervate microcapsules during production and gastric/intestinal simulation  
Journal of Controlled Release 77 (3), pp. 297-307, 2001

[Vert, 2000]

Vert, M.  
La nécessité d'une terminologie pour les macromolécules et les matériaux polymères dégradables  
Les polymères naturels: structure, modifications, applications, M. Rinaudo, Editor.  
GFP. pp. 453-456, 2000

[Volpert, 1996]

Volpert, E., Selb, J., Candau, F.

Influence of the Hydrophobe Structure on Composition, Microstructure, and Rheology in Associating Polyacrylamides Prepared by Micellar Copolymerization

Macromolecules 29 (5), pp. 1452-1463, 1996

## W

[Wan, 2004]

Wan, A.C.A., Yim, E.K.F., Liao, I.-C., Le Visage, C., Leong, K.W.

Encapsulation of biologics in self-assembled fibers as biostructural units for tissue engineering

Journal of Biomedical Materials Research - Part A 71 (4), pp. 586-595, 2004

[Wang, 2006]

Wang, B., Zhao, Y., Lin, H., Chen, B., Zhang, J., Zhang, J., Wang, X., (...), Dai, J.

Phenotypical analysis of adult rat olfactory ensheathing cells on 3-D collagen scaffolds

Neuroscience Letters 401 (1-2), pp. 65-70, 2006

[Wasikiewicz, 2005]

Wasikiewicz, J.M., Yoshii, F., Nagasawa, N., Wach, R.A., Mitomo, H.

Degradation of chitosan and sodium alginate by gamma radiation, sonochemical and ultraviolet methods

Radiation Physics and Chemistry 73 (5), pp. 287-295, 2005

[Wellner, 1998]

Wellner, N., Kačuráková, M., Malovíková, A., Wilson, R.H., Belton, P.S.

FT-IR study of pectate and pectinate gels formed by divalent cations

Carbohydrate Research 308 (1-2), pp. 123-131, 1998

[West, 1995]

West, J.L., Hubbell, J.A.

Comparison of covalently and physically cross-linked polyethylene glycol-based hydrogels for the prevention of postoperative adhesions in a rat model

Biomaterials 16 (15), pp. 1153-1156, 1995

[West, 1997]

West, J.L., Hubbell, J.A.

Bioactive polymers

Synthetic biodegradable polymer scaffolds. Boston: Birkhäuser: pp. 83-95, 1997

[Woerly, 1990]

Woerly, S., Marchand, R., Lavalley, G.

Intracerebral implantation of synthetic polymer/biopolymer matrix: A new perspective for brain repair

Biomaterials 11 (2), pp. 97-107, 1990

[Woerly, 2001]

Woerly, S., Doan, V.D., Sosa, N., De Vellis, J., Espinosa, A.  
Reconstruction of the transected cat spinal cord following NeuroGel™ implantation: axonal tracing, immunohistochemical and ultrastructural studies  
International Journal of Developmental Neuroscience 19 (1), pp. 63-83, 2001

## **Y**

[Young, 2004]

Young, J.-J., Cheng, K.-M., Tsou, T.-L., Liu, H.-W., Wang, H.-J.  
Preparation of cross-linked hyaluronic acid film using 2-chloro-1-methylpyridinium iodide or water-soluble 1-ethyl-(3,3-dimethylaminopropyl)carbodiimide  
Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition 15 (6), pp. 767-780, 2004

[Yuguchi, 2003]

Yuguchi, Y., Urakawa, H., Kajiwara, K.  
Structural characteristics of carrageenan gels: various types of counter ions  
Food Hydrocolloids 17 (4), pp. 481-485, 2003

## **Z**

[Zhang, 2007]

Zhang, T., Yan, Y., Wang, X., Xiong, Z., Lin, F., Wu, R., Zhang, R.  
Three-dimensional gelatin and gelatin/hyaluronan hydrogel structures for traumatic brain injury  
Journal of Bioactive and Compatible Polymers 22 (1), pp. 19-29, 2007

[Zimmermann, 1945]

Chemie International Edition 4, pp. 40-49, 1945

## Nomenclature et liste des abréviations

**T-AA<sub>N</sub>-C<sub>12</sub>** : alginate modifié par des chaînes alkyles C12, greffées via des liaisons amide, de taux de greffage T

**T-AA.C<sub>12</sub>** : alginate modifié par des chaînes alkyles C12, greffées via des liaisons ester, de taux de greffage T

**AMPc** : Adenosine monophosphate cyclique

**ChAT** : Choline acetyl transferase

**CMPI** : Chloromethylpyridinium iodide

**DMF** : Diméthylformamide

**DO** : Densité optique

**FDA** : Food and Drug Administration

**GABA** : Gamma aminobutyric acid

**GFAP** : Glial fibrillaric acidic protein

**GPI** : Glycophosphatidylinositol

**LCR** : Liquide céphalorachidien

**MAG** : Myelin-associated glycoprotein

**MEC** : Matrice extracellulaire

**NOS** : Nitric oxide synthase

**OMgp** : Myelin-oligodendrocyte glycoprotein

**PEG** : poly (éthylène glycol)

**PGMA** : poly (glycéryl méthacrylate)

**PHA** : poly(hydroxy acide)

**PHEMA** : poly(hydroxyéthyl méthacrylate)

**PHEMA-co-MMA** : poly(hydroxyéthyl methacrylate)-co-(methyl méthacrylate)

**PHPMA** : poly(hydroxypropyl méthacrylamide)

**PLA** : poly (acide lactique)

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

**POE** : poly (oxyde d'éthylène)

**SEC-MALLS** : Steric exclusion chromatography-multi angle laser light scattering

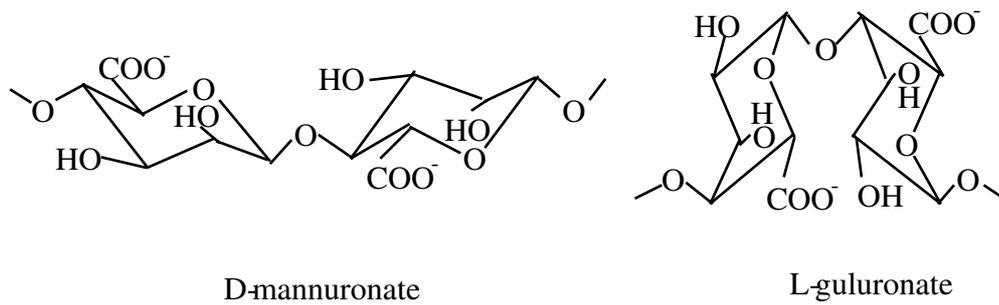
**SNC** : Système nerveux central

**TBA** : Tetrabutylammonium

**TNBS** : Trinitrobenzensulfonic acid



# *Figures*



**Figure I-1: Structure des blocs (1→4)-β-D-mannuronate et (1→4)-α-L-guluronate d'alginate de sodium**



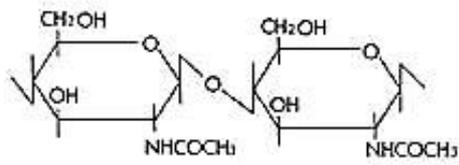


Figure I-3 : Structure de la chitine

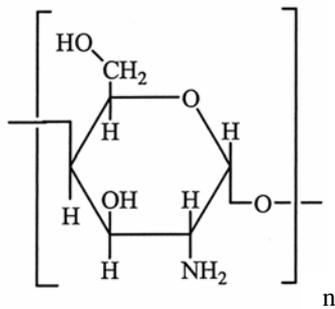


Figure I-4 : Structure du chitosane

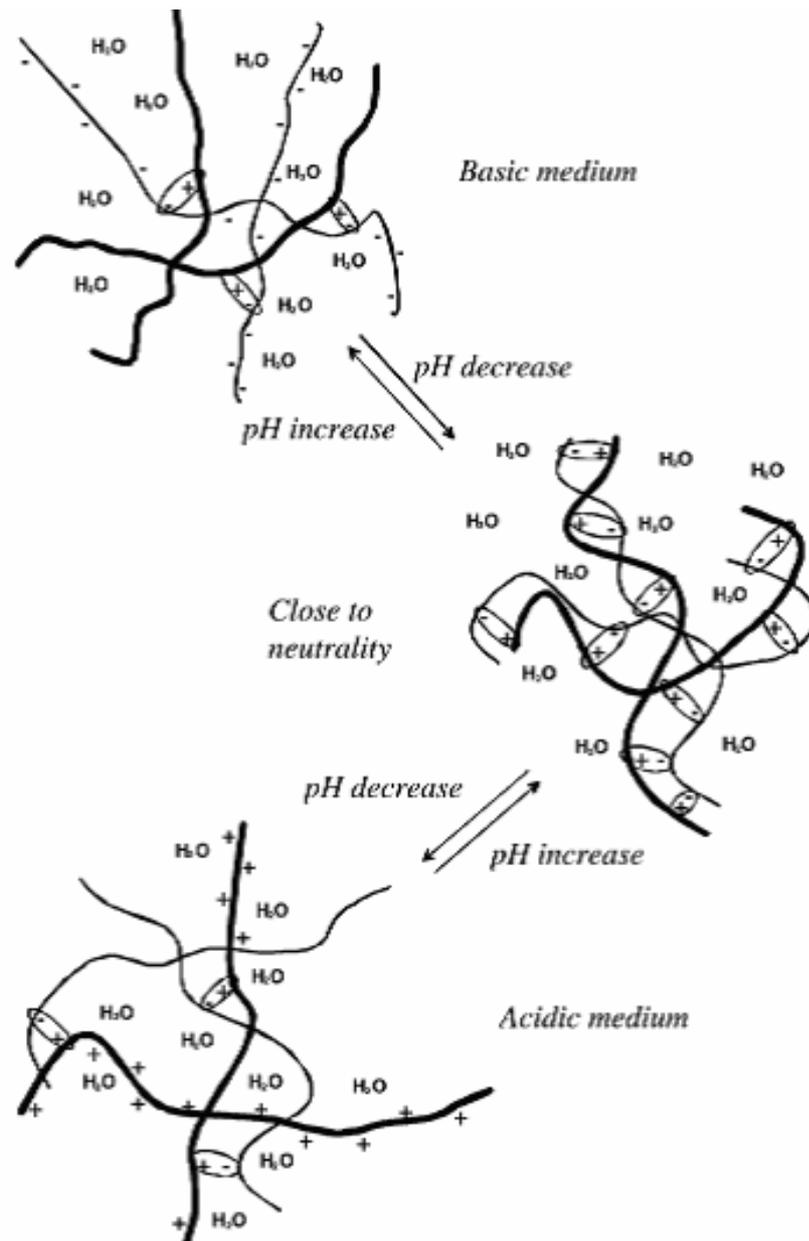


Figure I-5: Influence du pH sur un hydrogel ionique de chitosane : extrait de Berger [Berger, 2004b]

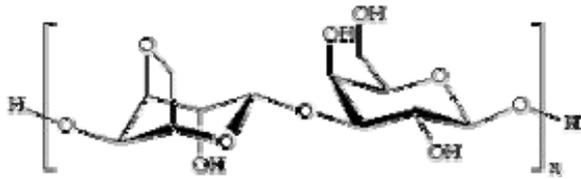


Figure I-6: Structure de l'agarose

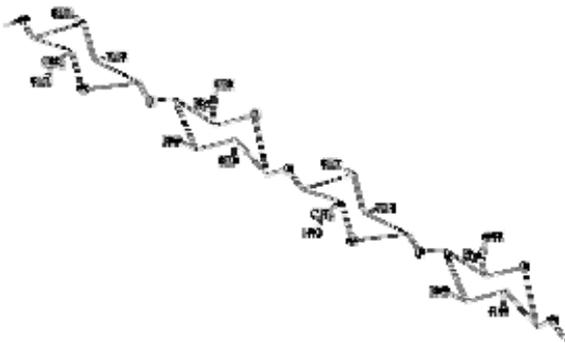
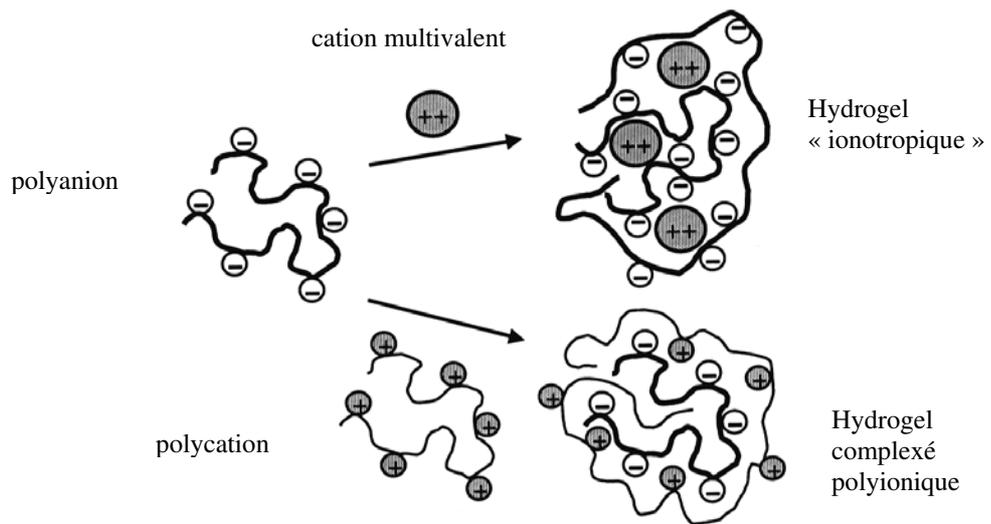
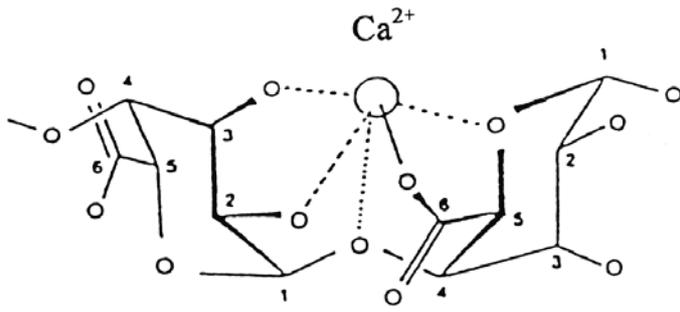


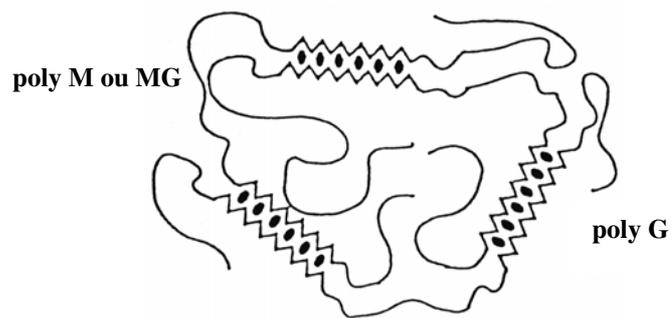
Figure I-7: Structure de la cellulose



**Figure I-8: Schéma de deux méthodes de formation d'hydrogels ioniques**



**Figure I-9: Chélation des résidus guluronates de l'alginate par le calcium, d'après Smidsrod et Skjak-Braek**



**Figure I-10: Représentation schématique du modèle « boîte à œufs » d'après Rees [Rees, 1972]**

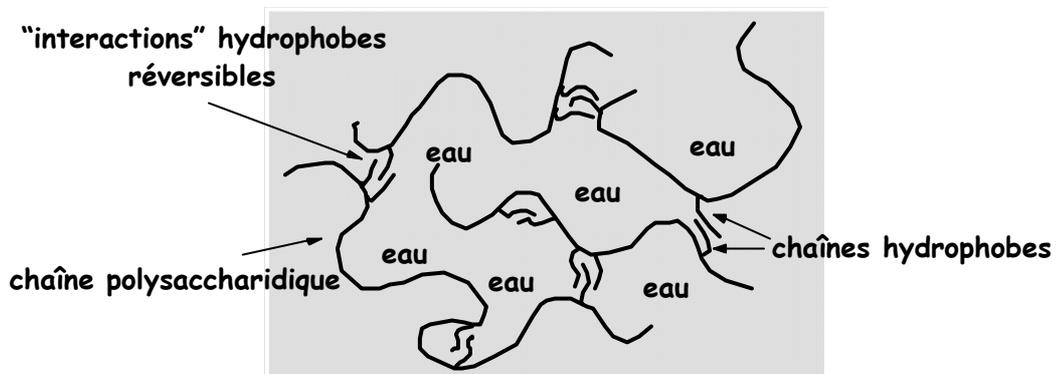


Figure I-11: Schéma d'un réseau associatif

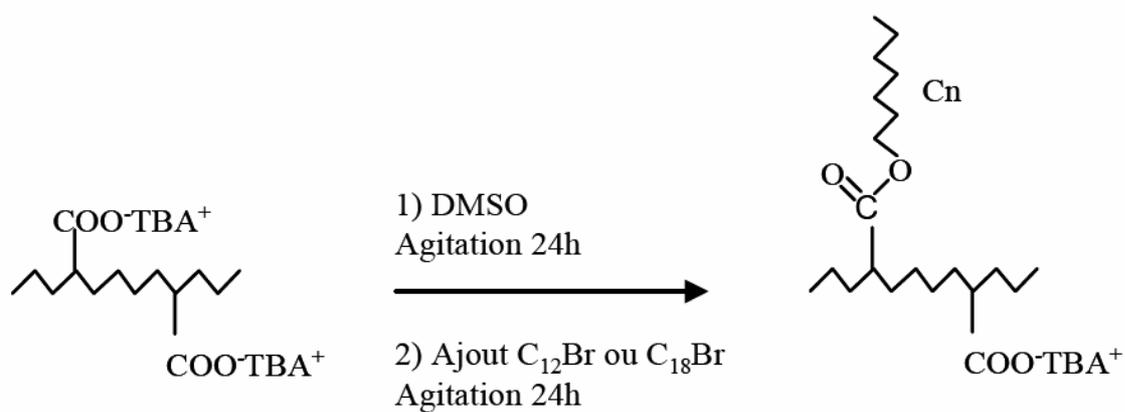


Figure I-12: Greffage de chaînes alkyles sur l'alginate, extrait de la thèse de Rastello [Rastello, 2002]

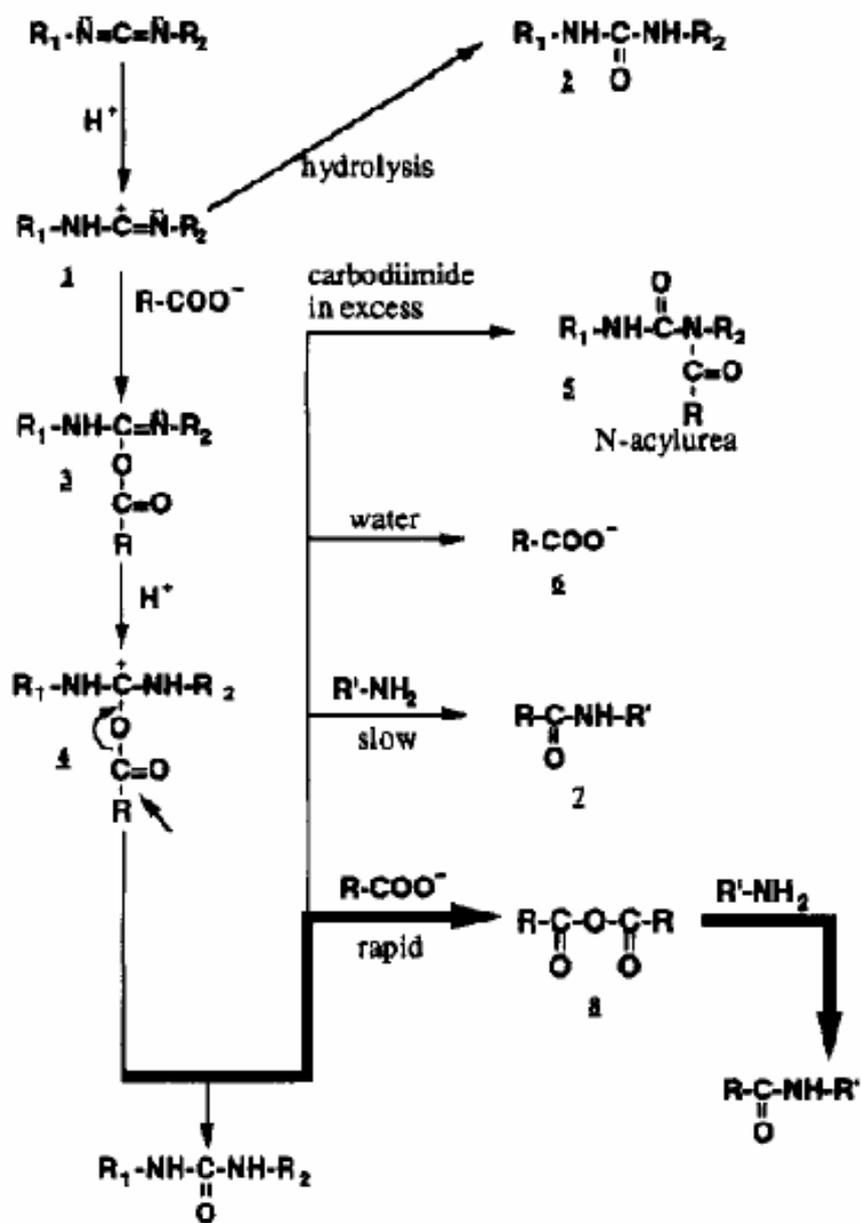
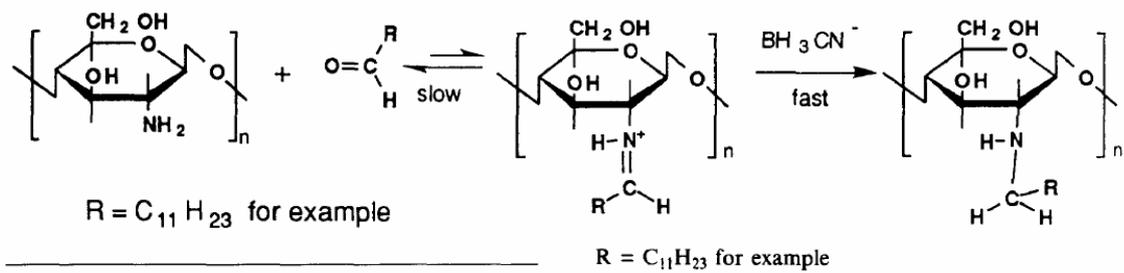
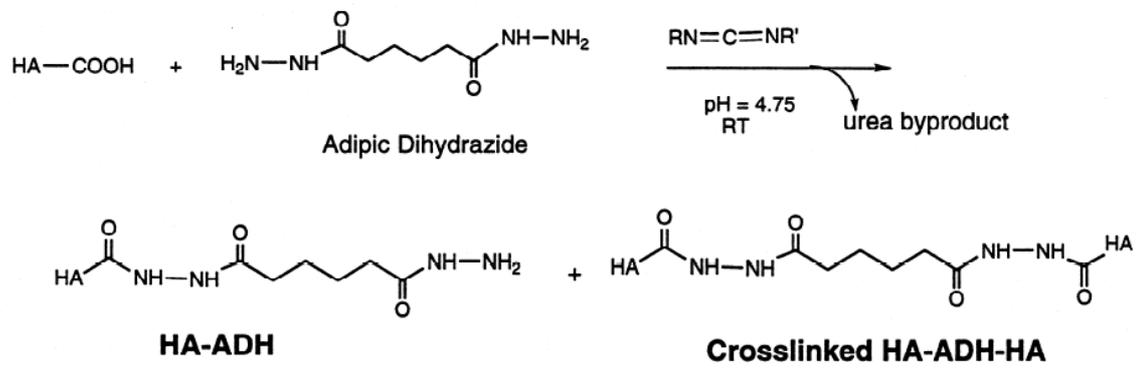


Figure I -13 : Mécanisme réactionnel proposé pour la réaction entre une fonction carboxylate et une fonction amine aboutissant à la formation d'une amide par l'intermédiaire de l'EDC, extrait de [Nakajima, 1995]

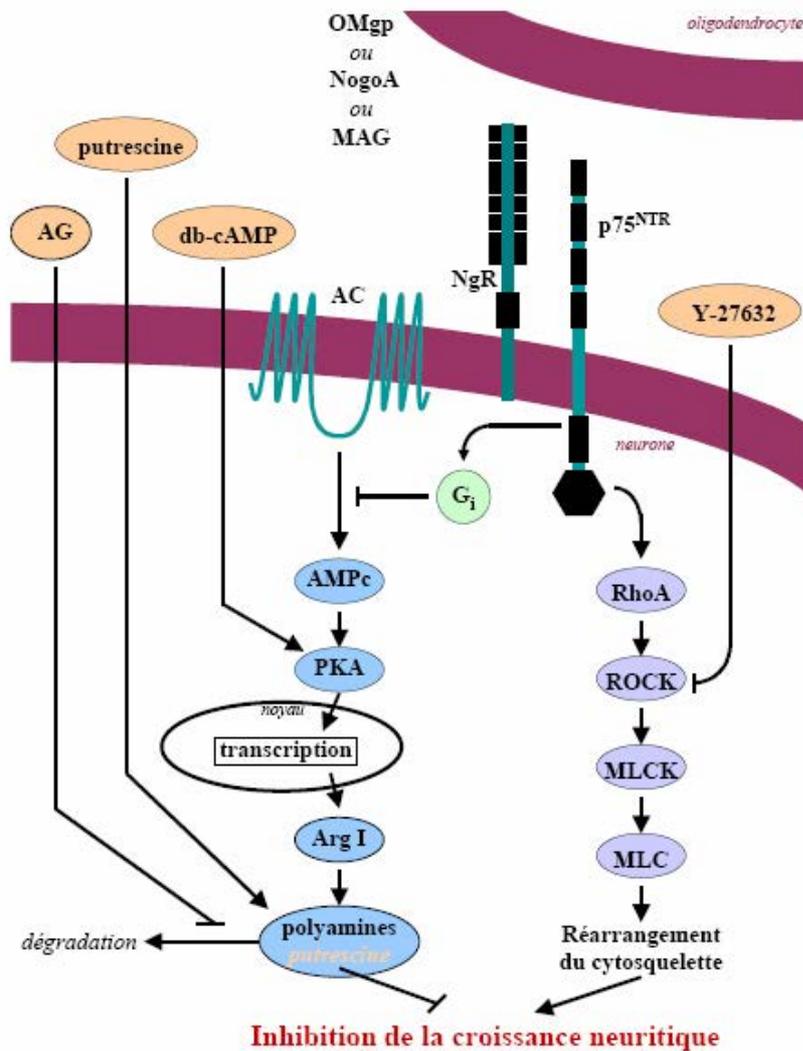


**Figure I-14: Réaction d'alkylation du chitosane, extrait de Desbrieres [Desbrieres, 1996]**





**Figure I-16: Synthèse d'un hyaluronate réticulé chimiquement, extrait de [Prestwich, 1998]**

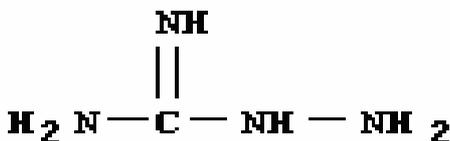


—| inhibition

→ activation

AC adénylate cyclase  
 AG aminoguanidine  
 Arg I arginase I  
 db-cAMP dibutyryl cyclic AMP  
 MAG myelin associated glycoprotein

MLC myosin light chain  
 MLCK myosin light chain kinase  
 NgR Nogo receptor  
 PKA protéine kinase A  
 ○ substances injectées

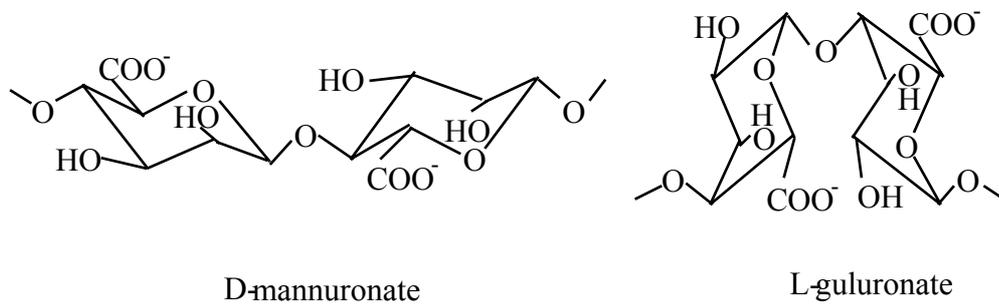


**Aminoguanidine**



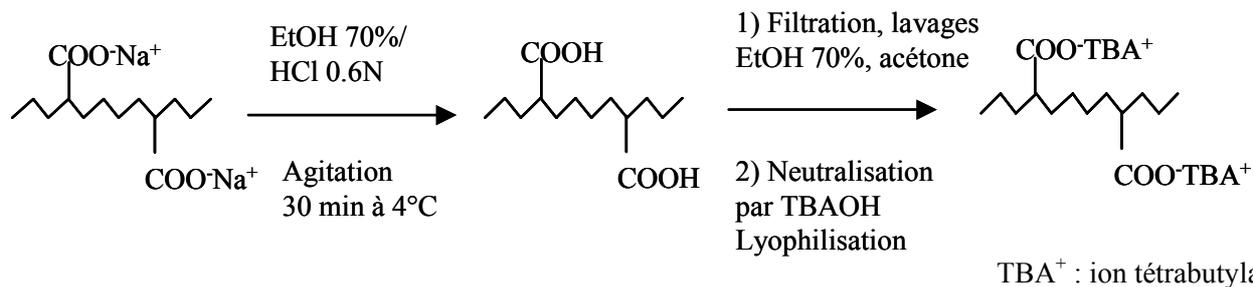
**Putrescine**

**Figure I-17 : Voie de signalisation des protéines associées à la myéline, inhibitrices de la croissance neuritique, et substances injectées pour neutraliser cette inhibition. Formules chimiques de l'aminoguanidine et la putrescine**

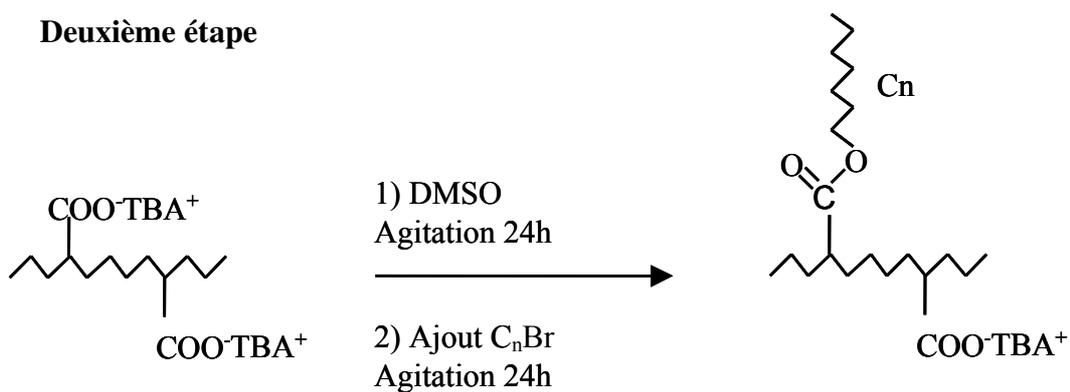


**Figure II-1: Structure des blocs (1→4)-β-D-mannuronate et (1→4)-α-L-guluronate constituant l'alginate de sodium**

### Première étape



### Deuxième étape



### Troisième étape

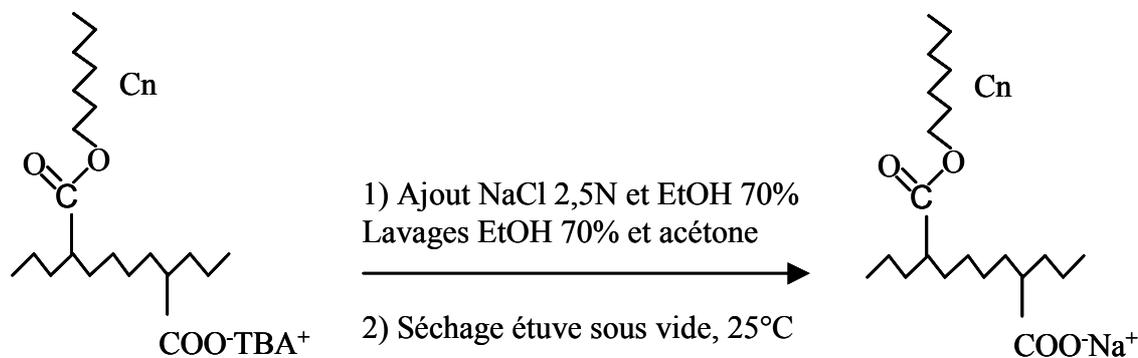
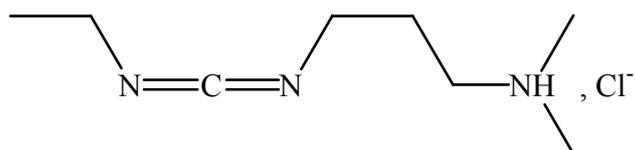
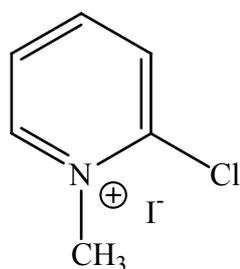


Figure II-2: Schéma de synthèse des alginates esters



EDC : Hydrochlorure de 1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide



CMPI : Iodure de 2-chloro-1-méthylpyridinium

**Figure II-3 : Agents de couplage utilisés pour la synthèse de dérivés alginamides**

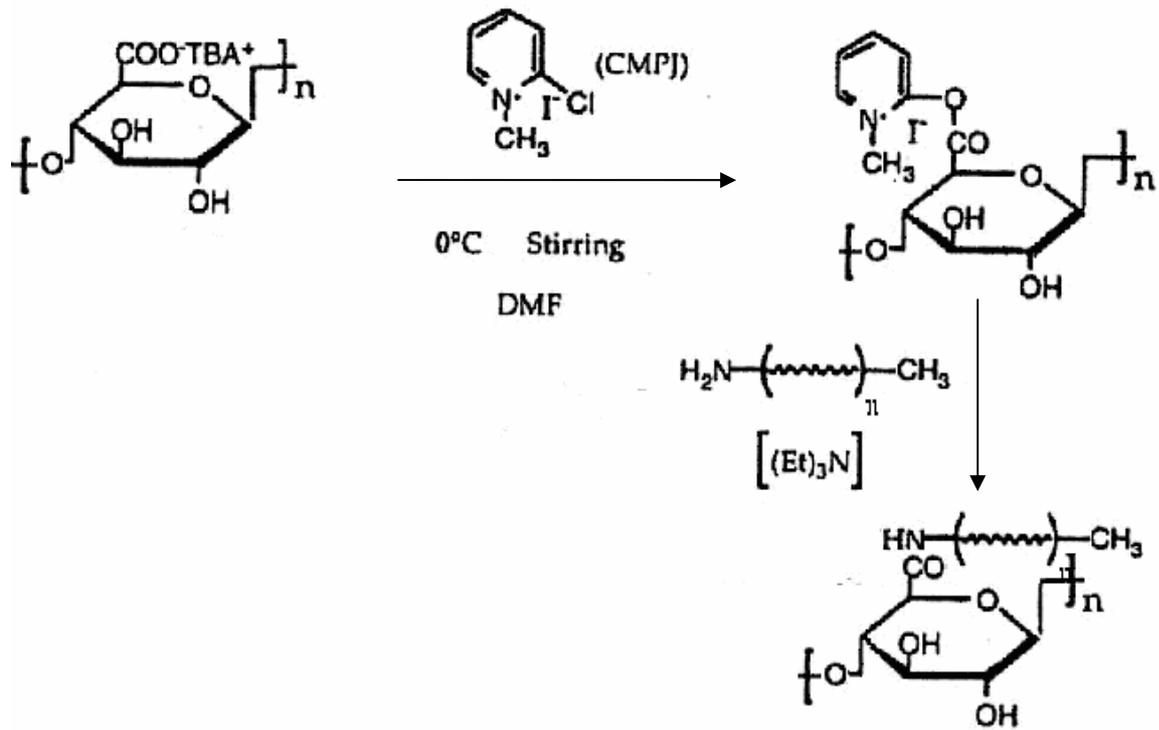
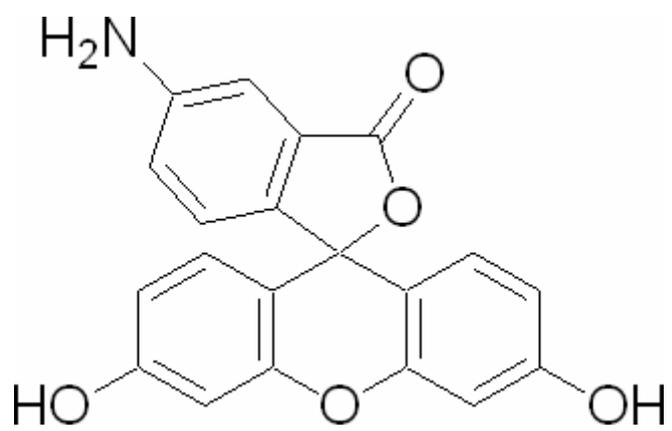
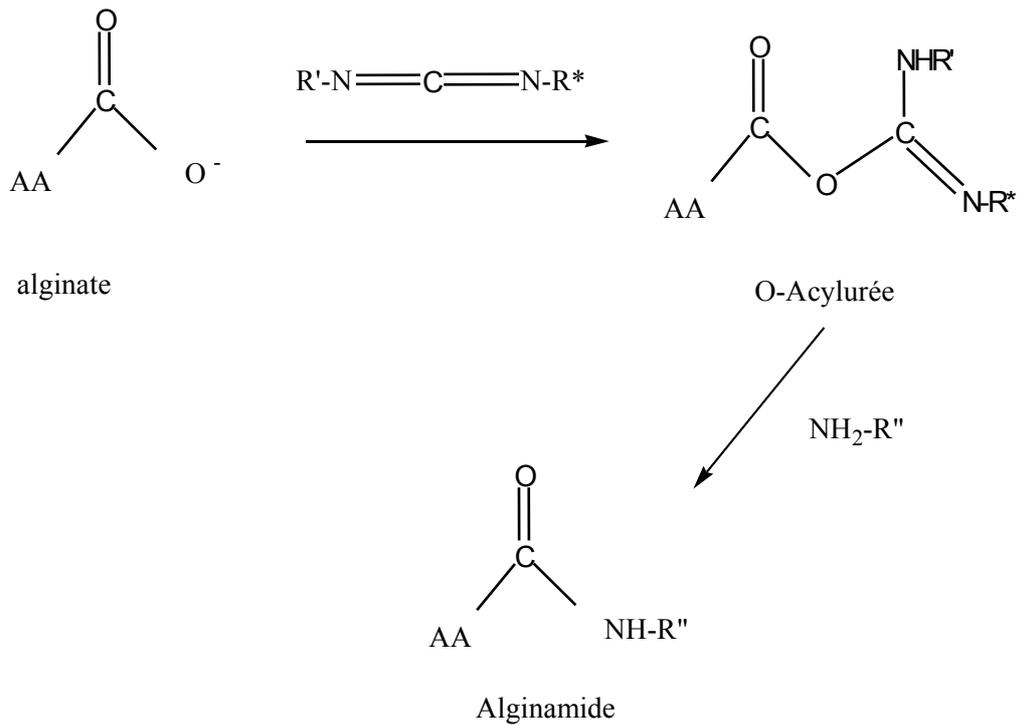


Figure II-4: Synthèse des alginamides avec utilisation du CMPI comme agent de couplage (schéma de synthèse proposé)

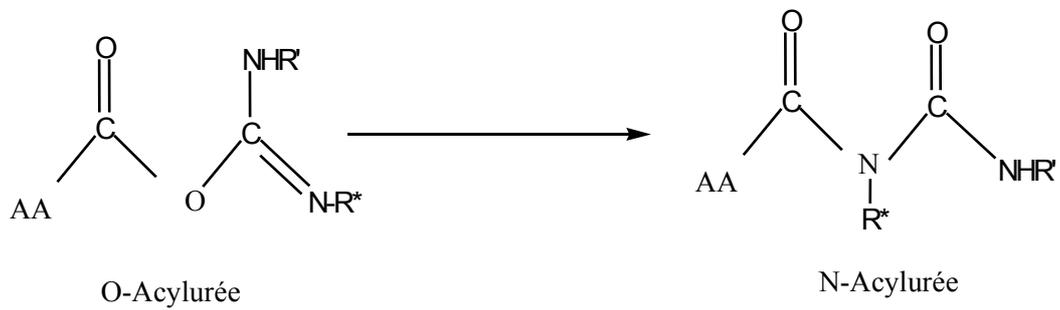


**Figure II-5: Formule de la fluorescéinamine**

a)



b)

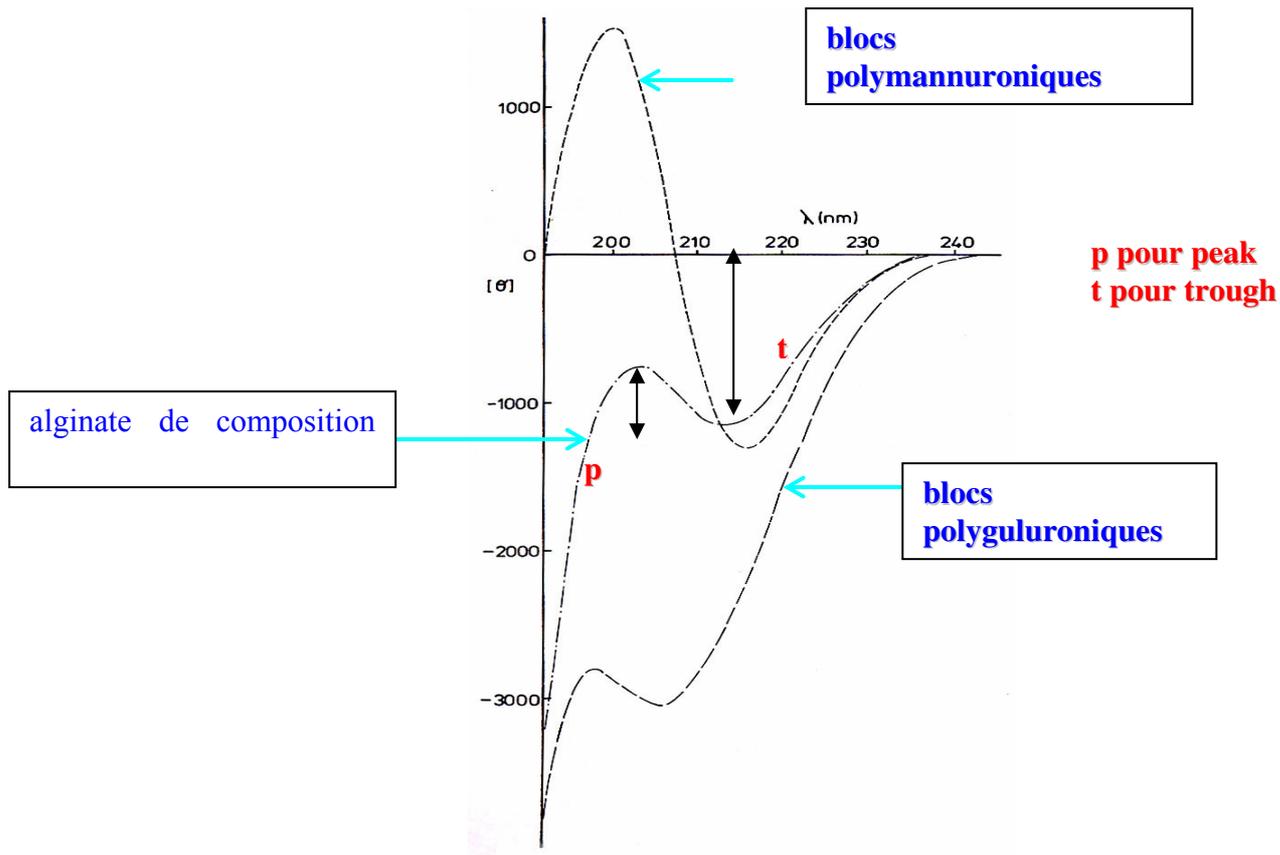


**Figure II-6: Synthèse des alginamides avec utilisation de l'EDC comme agent de couplage**

a : réaction de couplage : formation de la fonction amide

b : réaction secondaire : formation de N-acylurée

(a)



(b)

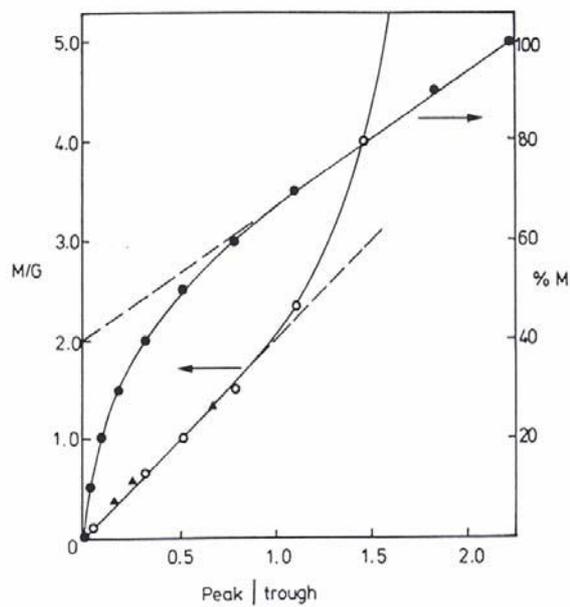


Figure II-7: (a) Spectres de dichroïsme circulaire de blocs poly-guluroniques, blocs polymannuroniques et d'un alginate de composition M/G = 29/71 dans l'eau [Morris, 80]

(b) Courbes de corrélation entre le rapport M/G des dérivés mannuronates et guluronates d'un échantillon d'alginate de sodium et le rapport p/t [Morris, 80]

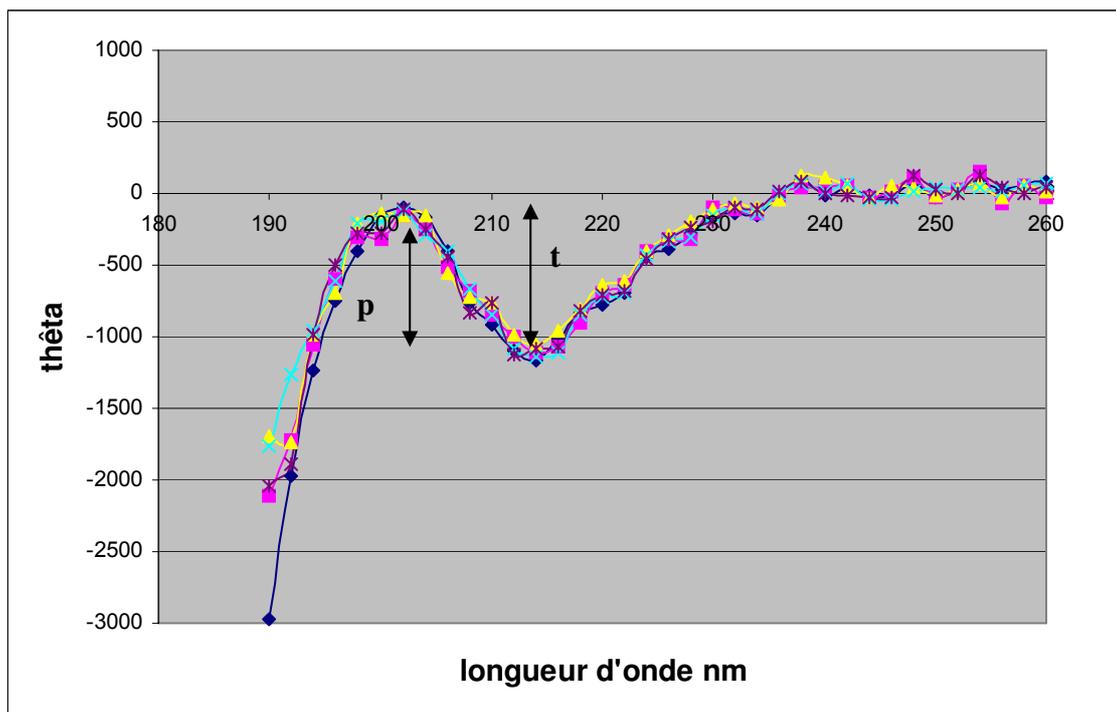


Figure II-8 : Spectres de dichroïsme circulaire de l'alginate natif pour la détermination du rapport M/G.

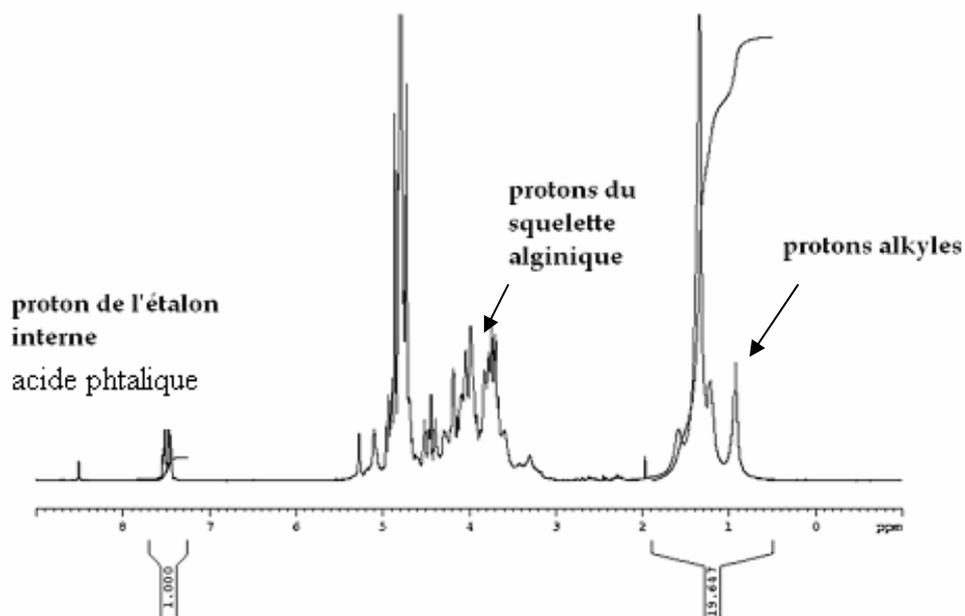


Figure II-9: Spectre RMN <sup>1</sup>H dans D<sub>2</sub>O d'un alginate modifié T-AA<sub>N</sub>-C<sub>12</sub>37,5-CMPI<sub>100</sub>-amine, hydrolysé dans HCl 2 10<sup>-3</sup>M, 20h, 100°C en présence de phtalate comme étalon interne

Produit	$\overline{M}_n$ ( $10^3$ g.mol <sup>-1</sup> )	$\overline{M}_w$ ( $10^3$ g.mol <sup>-1</sup> )
AANa	160	205
AANa (après traitement)	150	203

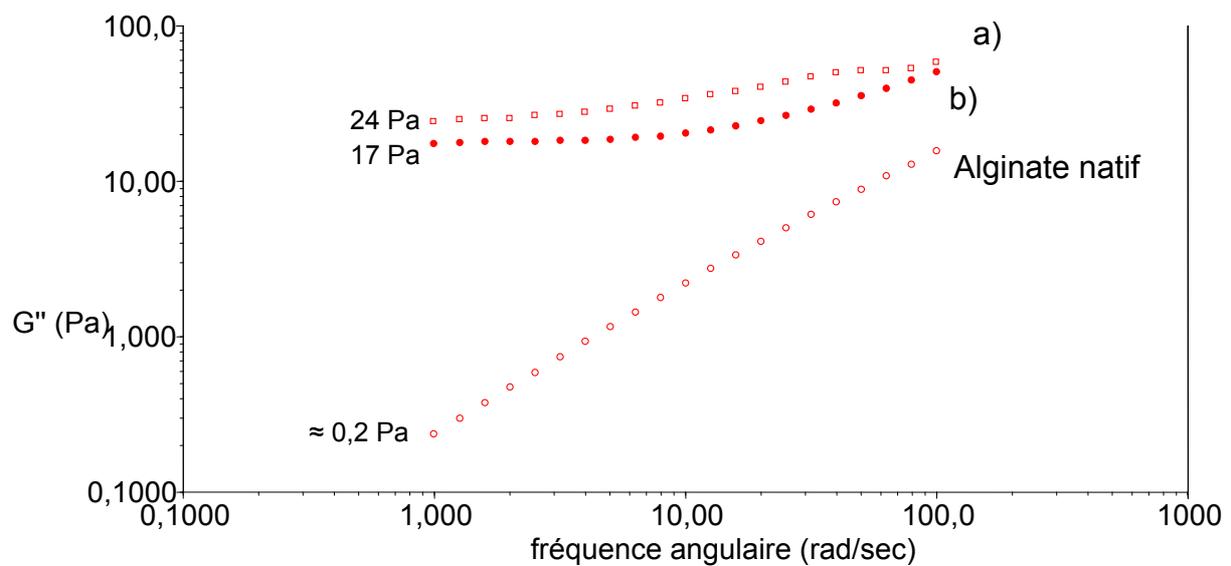
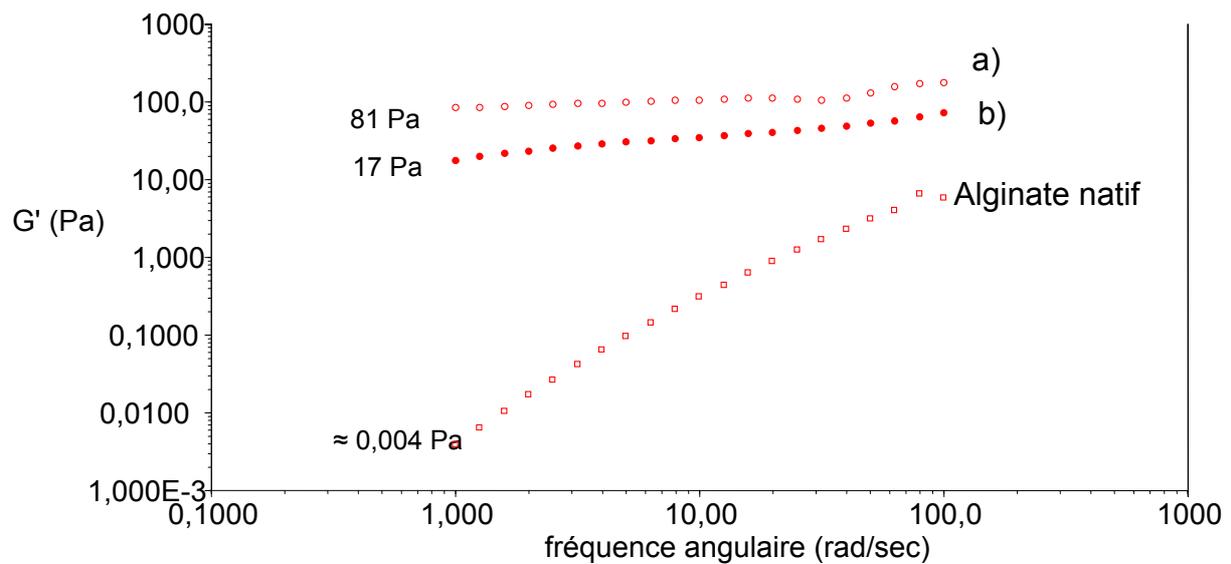
**Tableau II-1 : Masses molaires moyennes en nombre et en masse du squelette alginique avant et après le passage de sa forme alginate de sodium à alginate de tétrabutylamonium**

Polymères	Taux de CMPI en % (1)	Taux de greffage en % obtenus par dosage RMN (2)	Taux de greffage en % obtenus par analyse élémentaire (2)
10-AA <sub>N</sub> -C <sub>12</sub>	15	<u>Moyenne</u> : 11,4 9 ≤ Taux de greffage ≤ 13,5	<u>Moyenne</u> : 10,4 10 ≤ taux de greffage ≤ 10,7
9-AA <sub>N</sub> -C <sub>12</sub>	12,5	<u>Moyenne</u> : 13,7 11 ≤ Taux de greffage ≤ 16	<u>Moyenne</u> : 8,6 8,3 ≤ taux de greffage ≤ 9,1
8-AA <sub>N</sub> -C <sub>12</sub>	17,5	<u>Moyenne</u> : 17,2 13 ≤ Taux de greffage ≤ 22	<u>Moyenne</u> : 7,8 7,4 ≤ taux de greffage ≤ 8,3
8-AA <sub>N</sub> -C <sub>12</sub>	17,5	Non déterminé	<u>Moyenne</u> : 8,3 8 ≤ taux de greffage ≤ 8,5
8-AA <sub>N</sub> -C <sub>12</sub>	17,5	Non déterminé	<u>Moyenne</u> : 8 7,8 ≤ taux de greffage ≤ 8,2

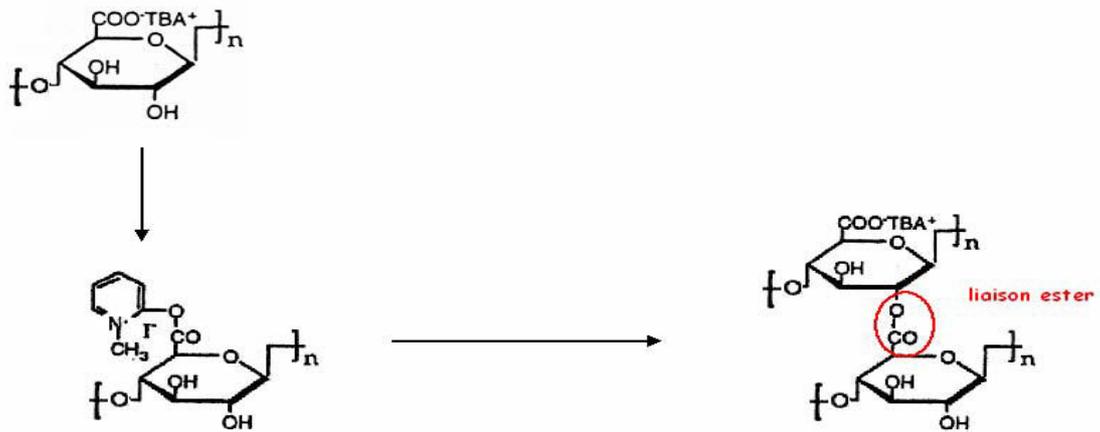
(1) Rapport molaire CMPI/unités d'alginate TBA dans le mélange réactionnel la quantité de dodécylamine est fixée à 100% par rapport au nombre de motifs d'alginate TBA

(2) taux de greffage en chaînes alkyles pour 100 motifs polysaccharides

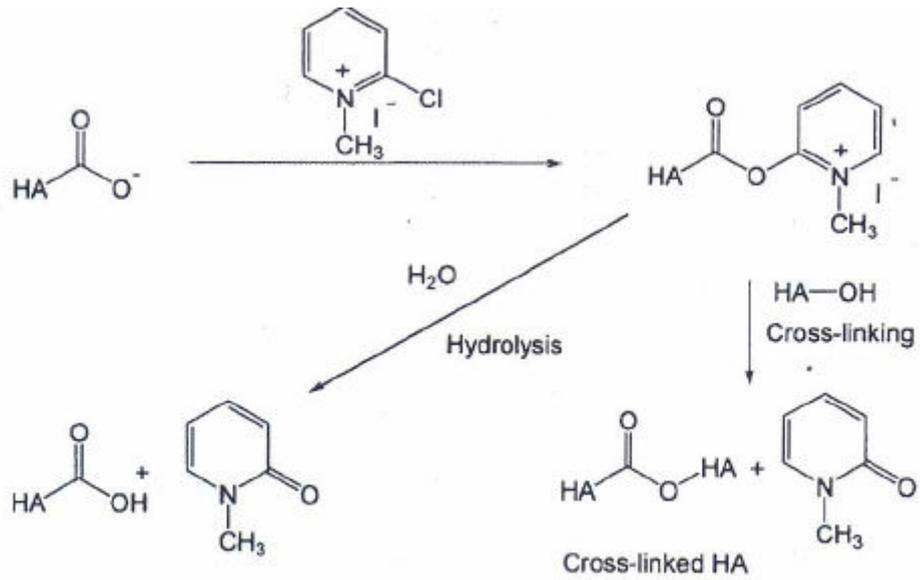
**Tableau II-2 : Dosage du taux de greffage des alginamides (AA<sub>N</sub>-C<sub>12</sub>), par RMN dans D<sub>2</sub>O, et par analyse élémentaire.**



**Figure II-10: Modules élastique et visqueux  $G'$  et  $G''$  à 10g/L dans l'eau d'un blanc d'alginate  $_{0-AA_N-C_{12}}$   $_{50-CMPI}$   $_{0-amine}$  a) synthétisé dans le DMSO à 25°C b) synthétisé dans la DMF à 0°C**

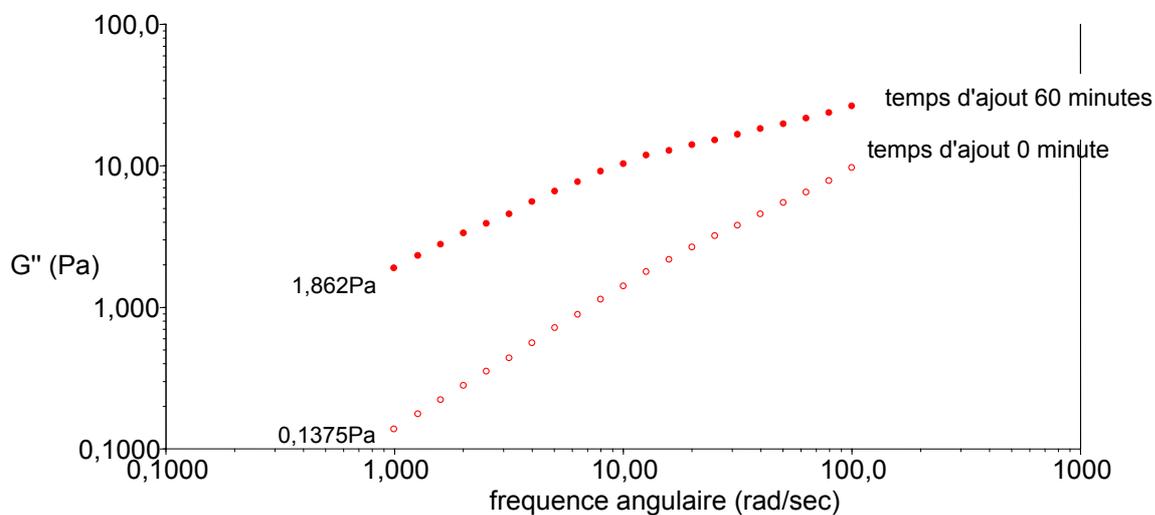
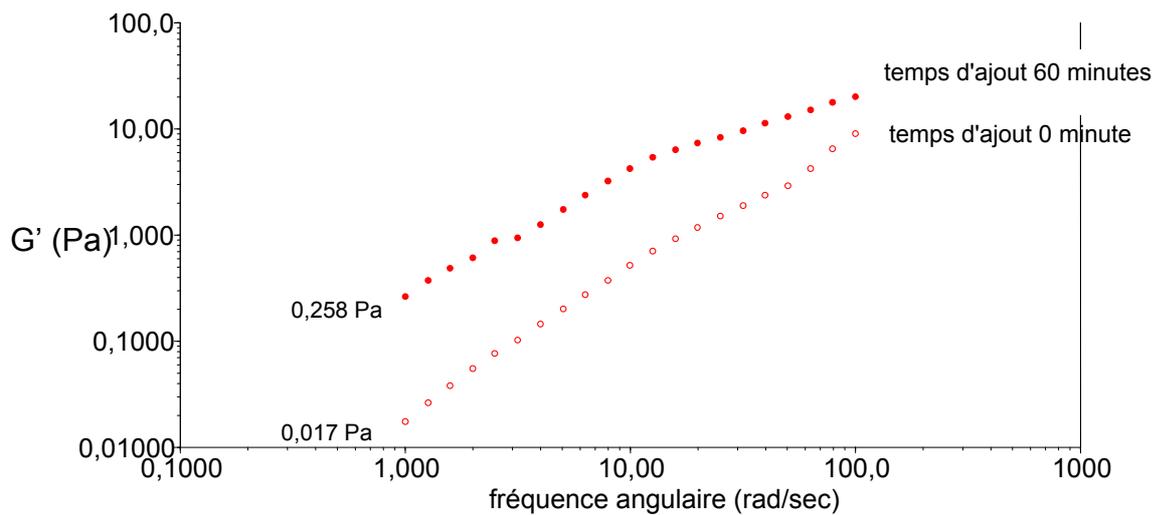


**Figure II-11a : Réaction de réticulation chimique secondaire inter et intra chaînes pour la modification en solvant organique en présence de CMPI**

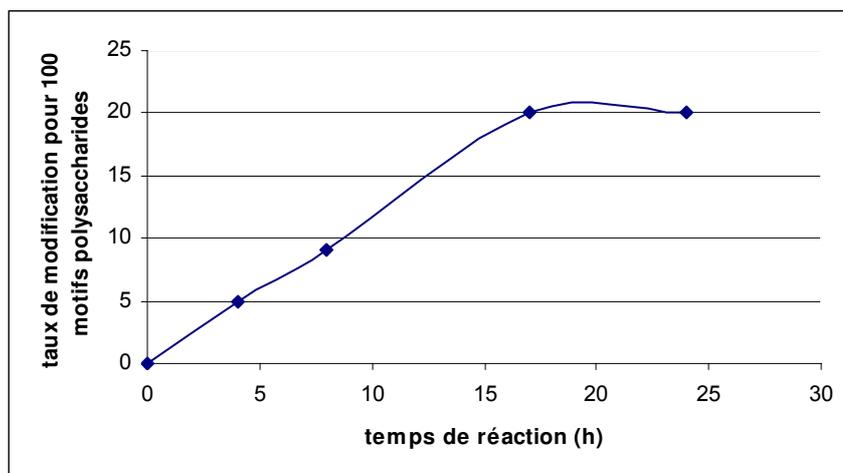


Mechanism of reaction between hyaluronic acid (HA) and 2-chloro-1-methylpyridinium iodide (CMPI).

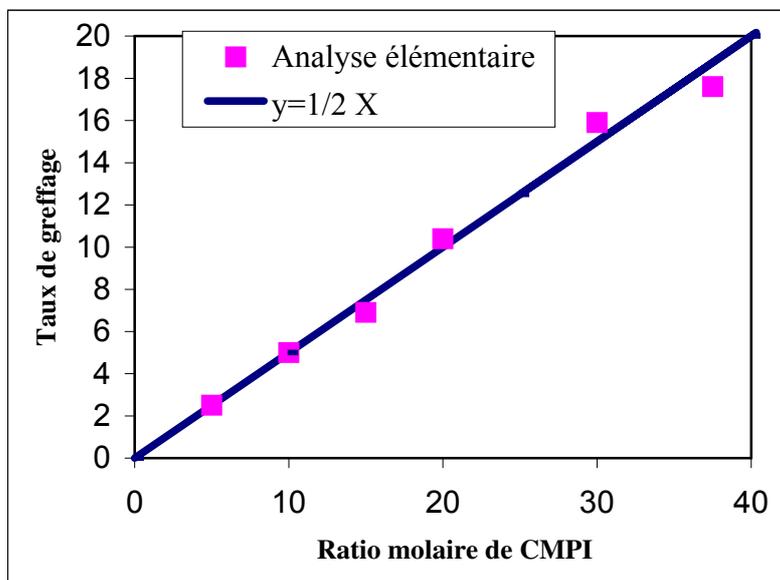
Figure II-11b : Mécanisme de réaction proposé par Young et Coll entre le HA et le CMPI



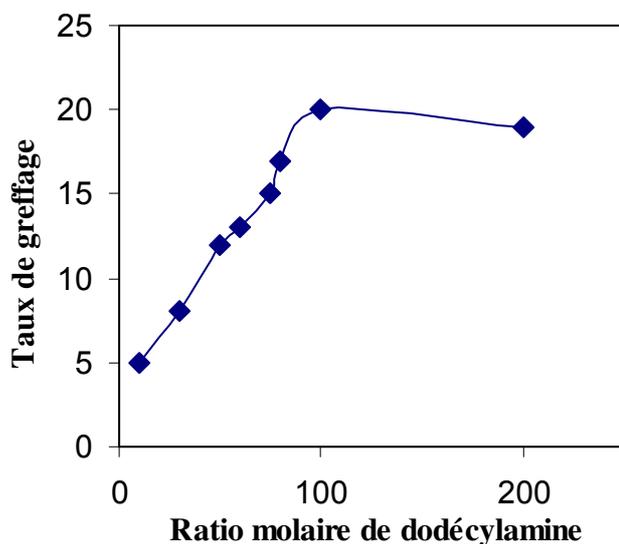
**Figure II-12: Influence de la durée entre l'ajout du CMPI et celui de la dodécylamine sur les propriétés rhéologiques d'un alginate modifié synthétisé dans la DMF  $0-AA_N-C_{12} 50-CMPI_{100}$ .éthanolamine en solution à 10 g/L dans l'eau.**



**Figure II-13: Cinétique de réaction d'un alginate modifié  $T-AA_N-C_{12} 37,5-CMPI_{100}$ -amine. Le taux de greffage est évalué pour 100 motifs saccharides par analyse élémentaire.**



**Figure II-14: Influence du ratio molaire x de CMPI pour 100 motifs saccharide sur le taux de greffage de l'alginate modifié  $T-AA_N-C_{12} x-CMPI_{100}$ -amine synthétisé dans la DMF**  
 Le taux est évalué en mole de greffons pour 100 moles de motifs saccharidiques.



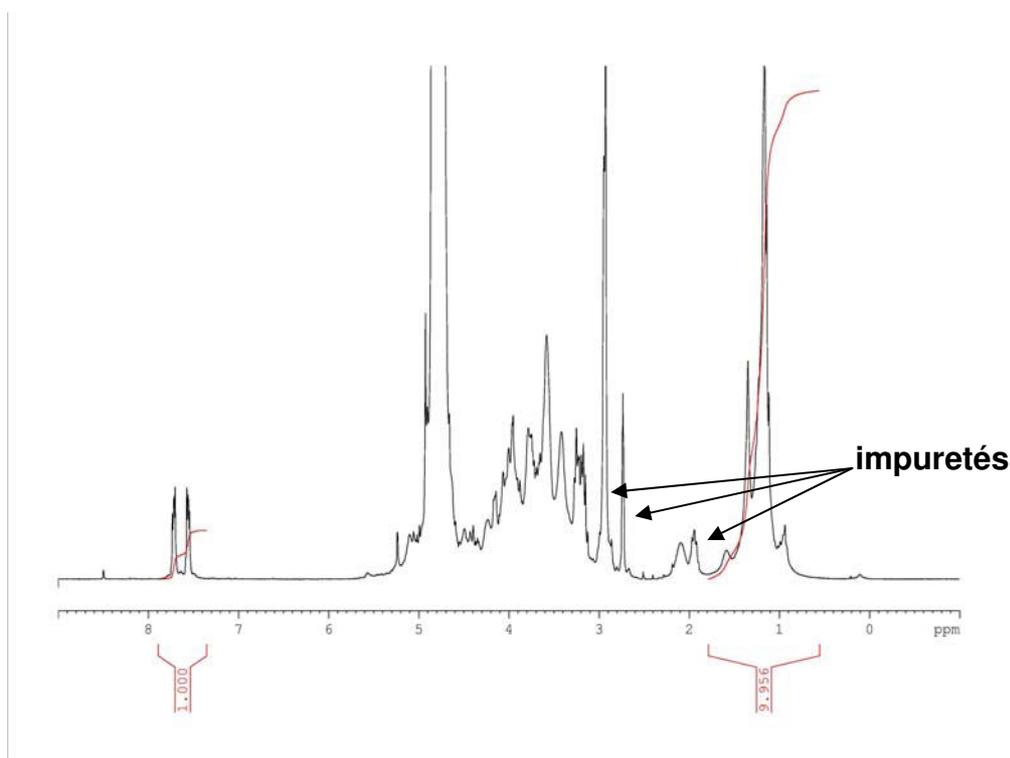
**Figure II-15: Influence du ratio z molaire de dodécylamine pour 100 motifs saccharidiques sur le taux de greffage de l'alginate modifié  $T-AA_N-C_{12} 37,5-CMPI_z$ -amine synthétisé dans la DMF**  
 Le taux est évalué en mole de greffons pour 100 moles de motifs saccharidiques

<b>Masse de AATBA initiale (en gramme)</b>	<b>Taux de greffage obtenus par analyse élémentaire (%)</b>
2	5,5
4	6,0
6	5,7
8	5,2

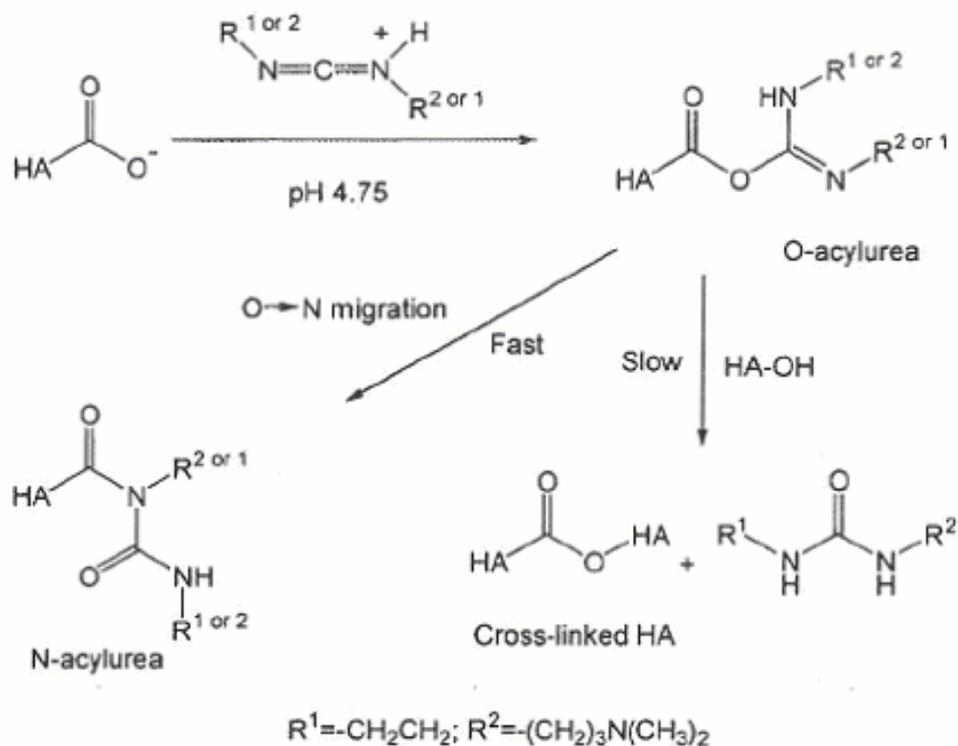
**Tableau II-3 : Influence de la quantité d'AATBA de départ, sur le taux de modification de l'alginate T-AA<sub>N</sub>-C<sub>12</sub> 10-CMPI 100-amine obtenu**

Ratio molaire d'EDC <sup>a)</sup>	Ratio molaire de dodécylamine <sup>a)</sup>	Taux de greffage obtenu par analyse élémentaire
50	100	52
100	100	40
250	100	93
500	100	44

**Tableau II-4 : Taux de greffage d'alginate exprimé en mole pour 100 mole de motifs saccharidiques en présence d'un carbodiimide hydrosoluble (l'EDC).  
a) pour 100 motifs saccharidiques**



**Figure II-16: Spectre RMN <sup>1</sup>H dans D<sub>2</sub>O d'un alginate modifié en présence d'EDC**



Mechanism of reaction between hyaluronic acid (HA) and carbodiimide EDC.

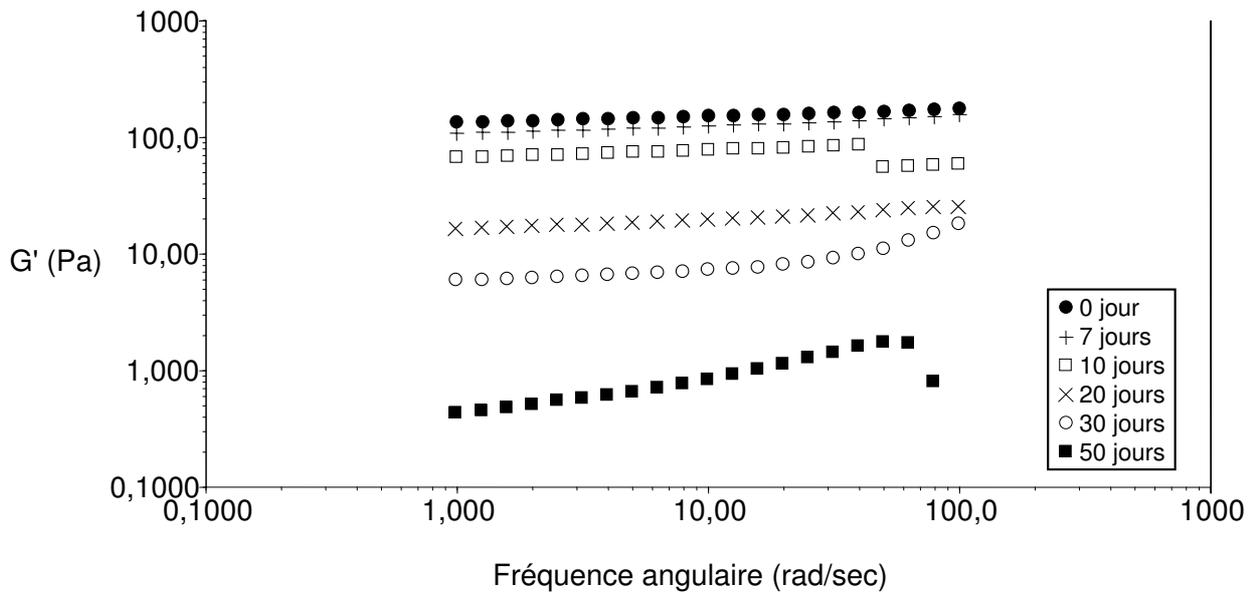
**Figure 17: Mécanisme de réaction entre le HA et l'EDC proposé par Young et Coll. [Young, 2004]**

Produit	$\overline{M}_n$ ( $10^3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ )	$\overline{M}_w$ ( $10^3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ )
AANa	160	205
Blanc de synthèse	170	213

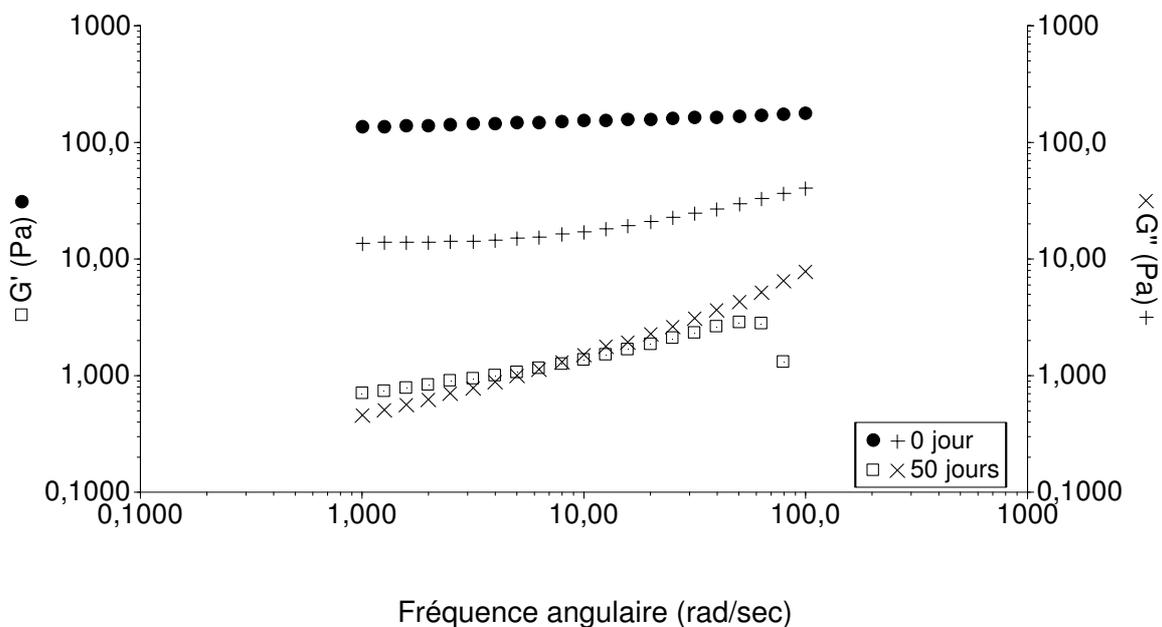
**Tableau II-5 : Masses molaires moyennes en nombre et en masse d'un alginate natif et d'un blanc de synthèse (ratio molaire EDC 50)**

Durée d'incubation de l'alginate (jour)	Module élastique G' (Pa)	Module visqueux G'' (Pa)
0	0.004	0.234
30	0.002	0.171

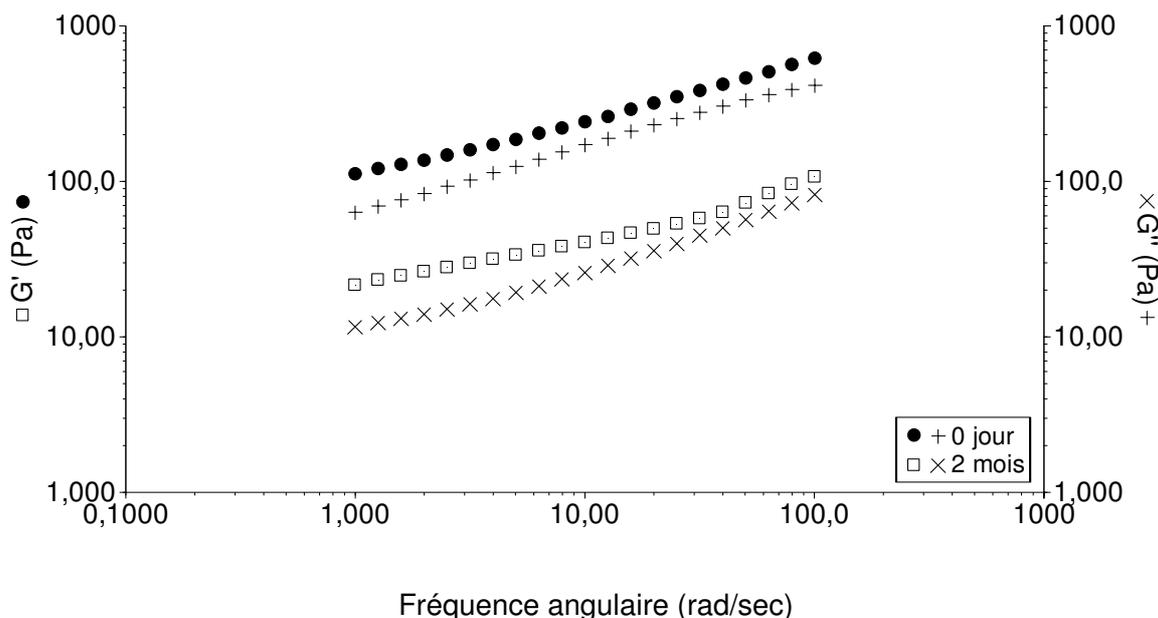
**Tableau III-1: Valeurs du module élastique et visqueux de l'alginate de sodium à 10 g/L après incubation à 37°C et sous agitation pour une fréquence angulaire de 1 rad/s**



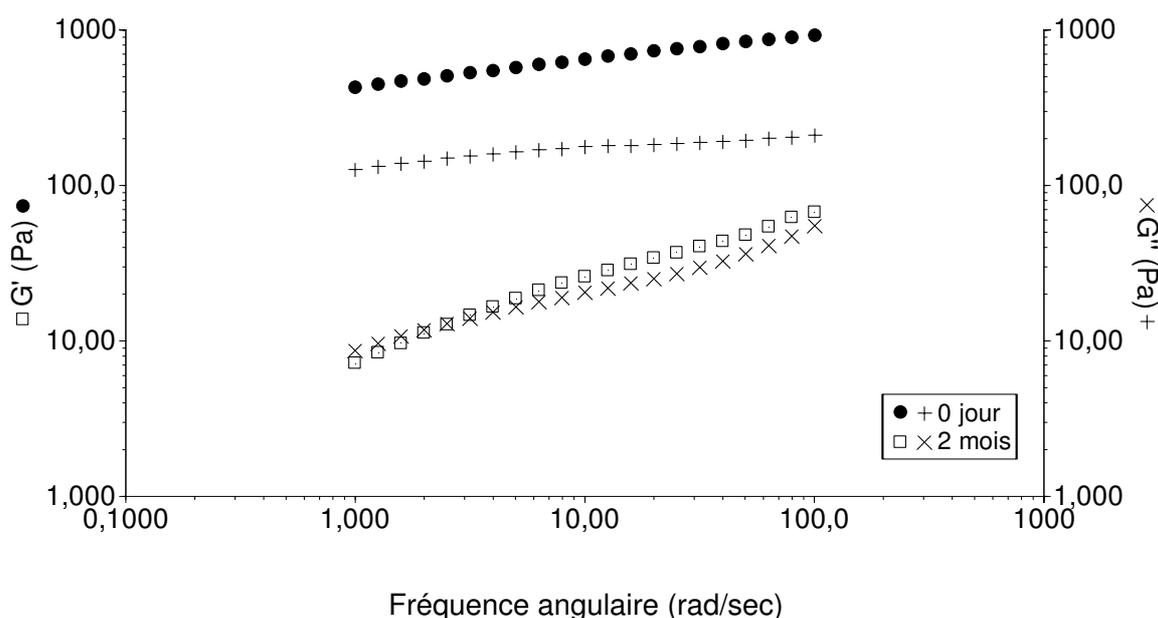
**Figure III-1: Module élastique d'un hydrogel d'alginate ester  $_{10,5-AA-C_{12}}$  à 15g/L dans l'eau placé à l'incubateur à 37°C sous agitation à différents temps d'incubation**



**Figure III-2: Modules élastiques et visqueux d'un hydrogel  $_{10,5-AA-C_{12}}$  à 15g/L dans l'eau placé à l'incubateur à 37°C sous agitation. Comparaison des valeurs de départ avec celles obtenues après 50 jours d'incubation à 37°C sous agitation**



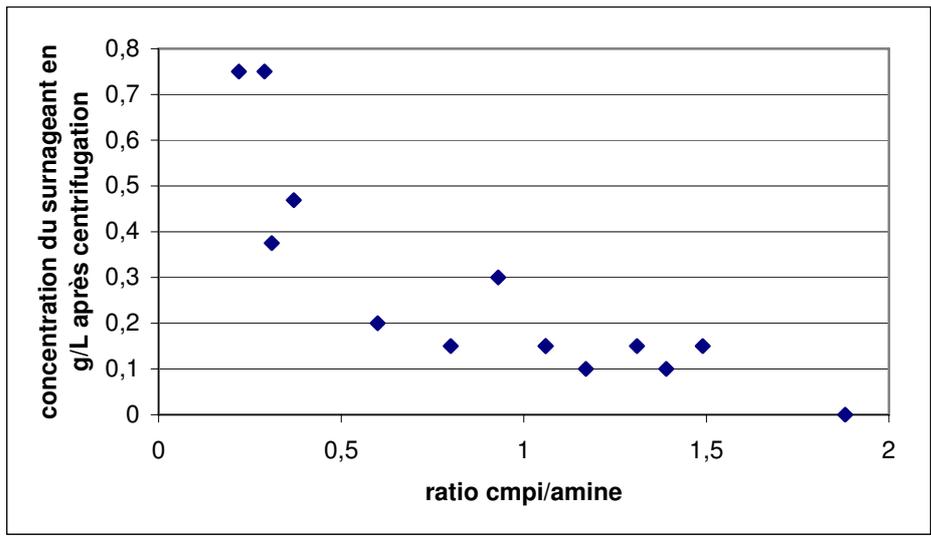
**Figure III-3: Suivi de l'évolution des modules oscillatoires à 25°C d'un hydrogel d'amide  $\epsilon$ -AA<sub>N</sub>-C<sub>12</sub>-<sub>13</sub>CMPI-<sub>100</sub>amine à 30g/L dans du LCR en fonction du temps**



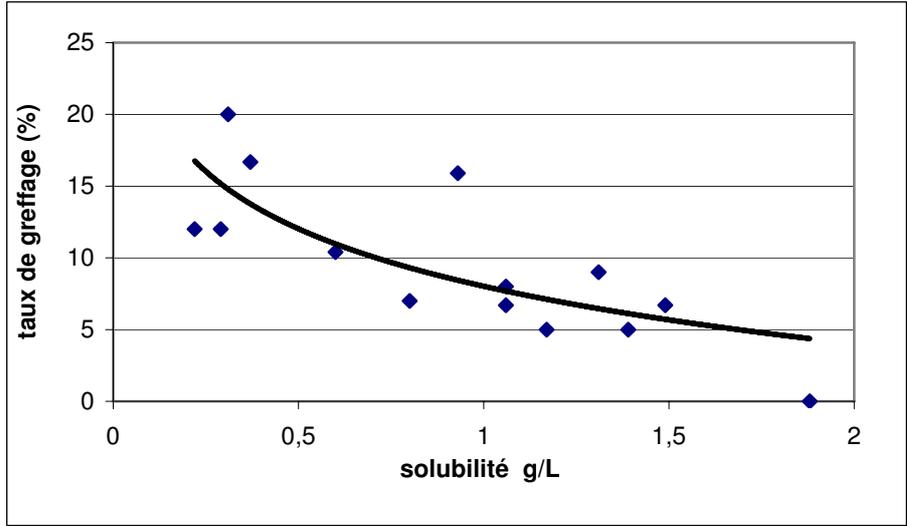
**Figure III-4: Suivi de l'évolution des modules oscillatoires à 25°C d'un hydrogel d'alginate ester  $\epsilon$ -AA-C<sub>12</sub> à 30g/L dans du LCR en fonction du temps**

Echantillon	$\bar{M}_n$ ( $10^3$ g.mol <sup>-1</sup> )	$\bar{M}_w$ ( $10^3$ g.mol <sup>-1</sup> )
Alginate natif	<b>274</b>	<b>310</b>
Alginate natif après 2 mois LCR	<b>249</b>	<b>298</b>

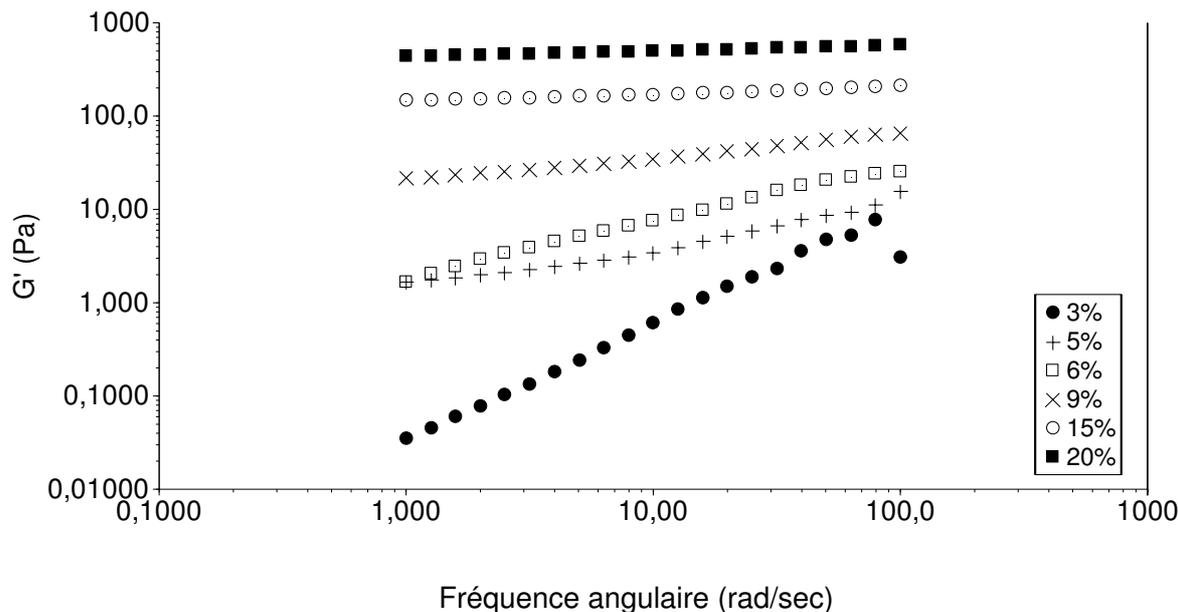
**Tableau III-2: Masses molaires moyennes en nombre  $\bar{M}_n$  et en masse  $\bar{M}_w$  de l'alginate natif avant et après incubation dans du LCR à 37°C**



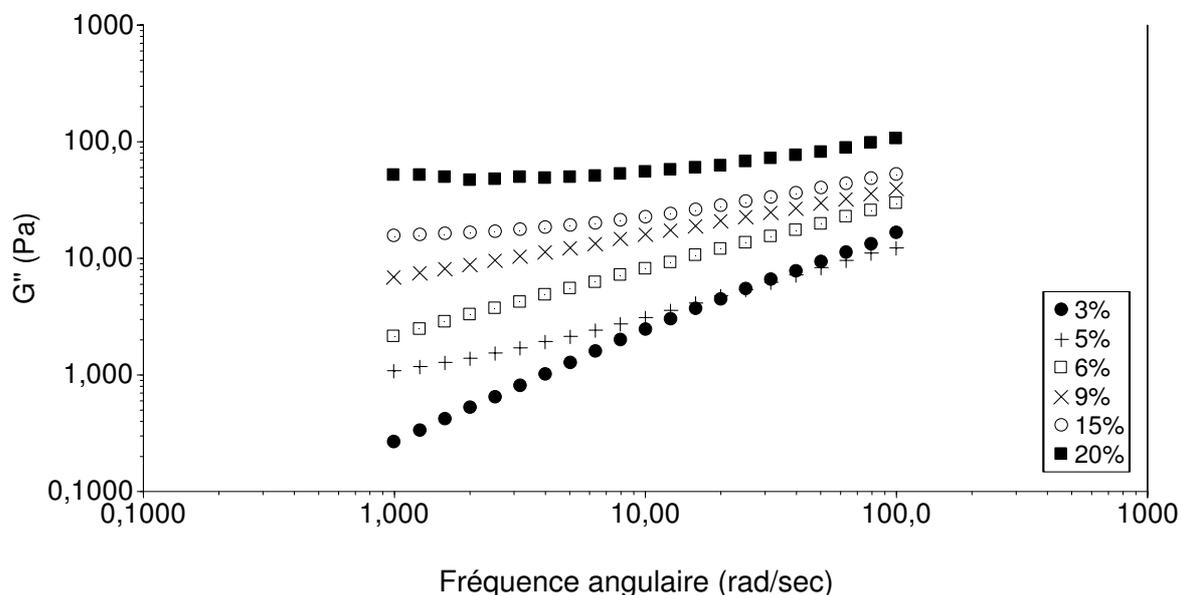
**Figure III-5: Evolution de la concentration du surnageant en g/L en fonction du ratio CMPI/amine après centrifugation (une dissolution totale conduirait à 2g/L).**



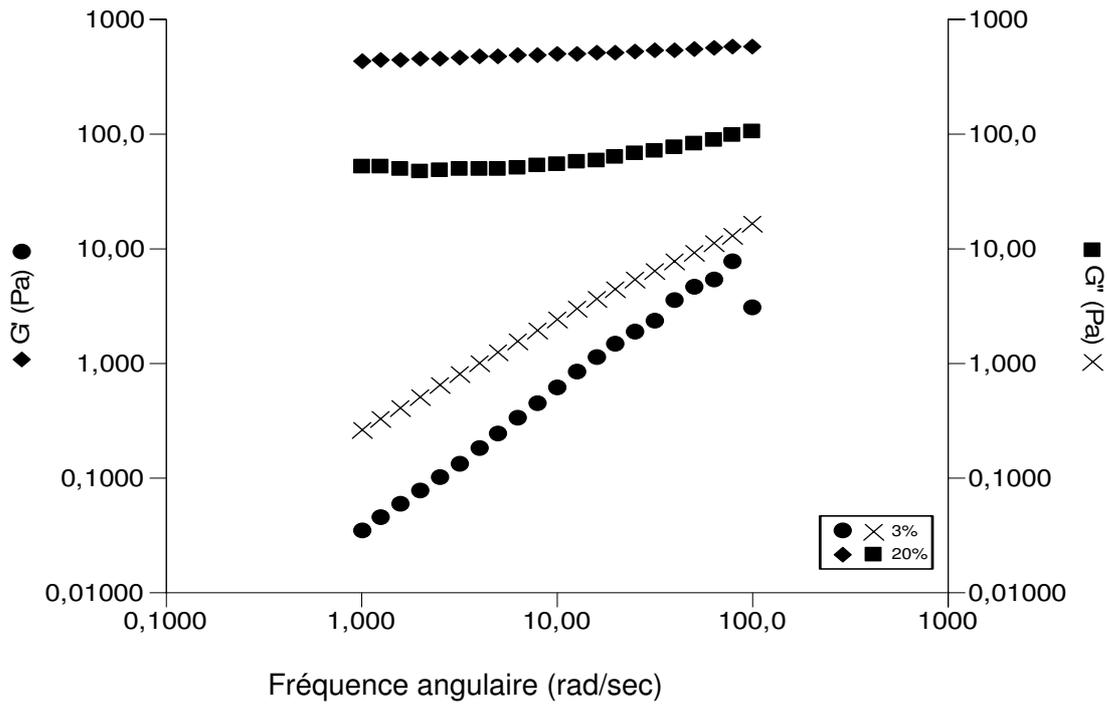
**Figure III-6 : Evolution du taux de greffage des alginamides en fonction de la solubilité**



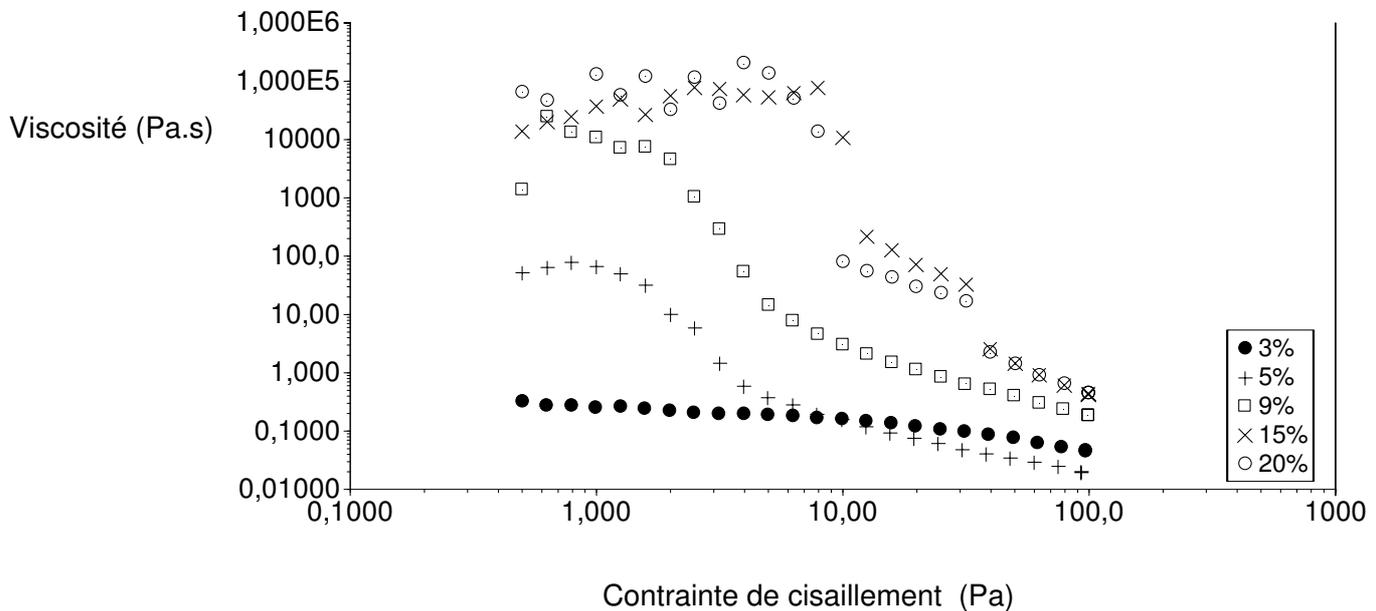
**Figure III-7a: Evolution des modules élastiques d'alginate  $T-AA_N-C_{12}$  à 10g/L dans l'eau à différents taux de greffage**  
 (3- $AA_N-C_{12-5}CMPI-100$ amine; 5- $AA_N-C_{12-11}CMPI-100$ amine; 6- $AA_N-C_{12-12}CMPI-100$ amine, 9- $AA_N-C_{12-16}CMPI-100$ amine; 15- $AA_N-C_{12-29}CMPI-100$ amine; 20- $AA_N-C_{12-43}CMPI-100$ amine)



**Figure III-7b: Evolution des modules visqueux d'alginate  $T-AA_N-C_{12}$  à 10g/L dans l'eau à différents taux de greffage**  
 (3- $AA_N-C_{12-5}CMPI-100$ amine; 5- $AA_N-C_{12-11}CMPI-100$ amine; 6- $AA_N-C_{12-12}CMPI-100$ amine, 9- $AA_N-C_{12-16}CMPI-100$ amine; 15- $AA_N-C_{12-29}CMPI-100$ amine; 20- $AA_N-C_{12-43}CMPI-100$ amine)



**Figure III-7c: Evolution des modules élastiques et visqueux d'un alginamide 3-AA<sub>N</sub>-C<sub>12</sub>-5CMPI-100amine et d'un alginamide 20-AA<sub>N</sub>-C<sub>12</sub>-43CMPI-100amide**



**Figure III-8a: Viscosité de différents alginamides T-AA<sub>N</sub>-C<sub>12</sub> en fonction de la contrainte de cisaillement à 10g/L dans l'eau**

(3-AA<sub>N</sub>-C<sub>12</sub>-5CMPI-100amine; 5-AA<sub>N</sub>-C<sub>12</sub>-11CMPI-100amine, 9-AA<sub>N</sub>-C<sub>12</sub>-16CMPI-100amine; 15-AA<sub>N</sub>-C<sub>12</sub>-29CMPI-100amine; 20-AA<sub>N</sub>-C<sub>12</sub>-43CMPI-100amine)

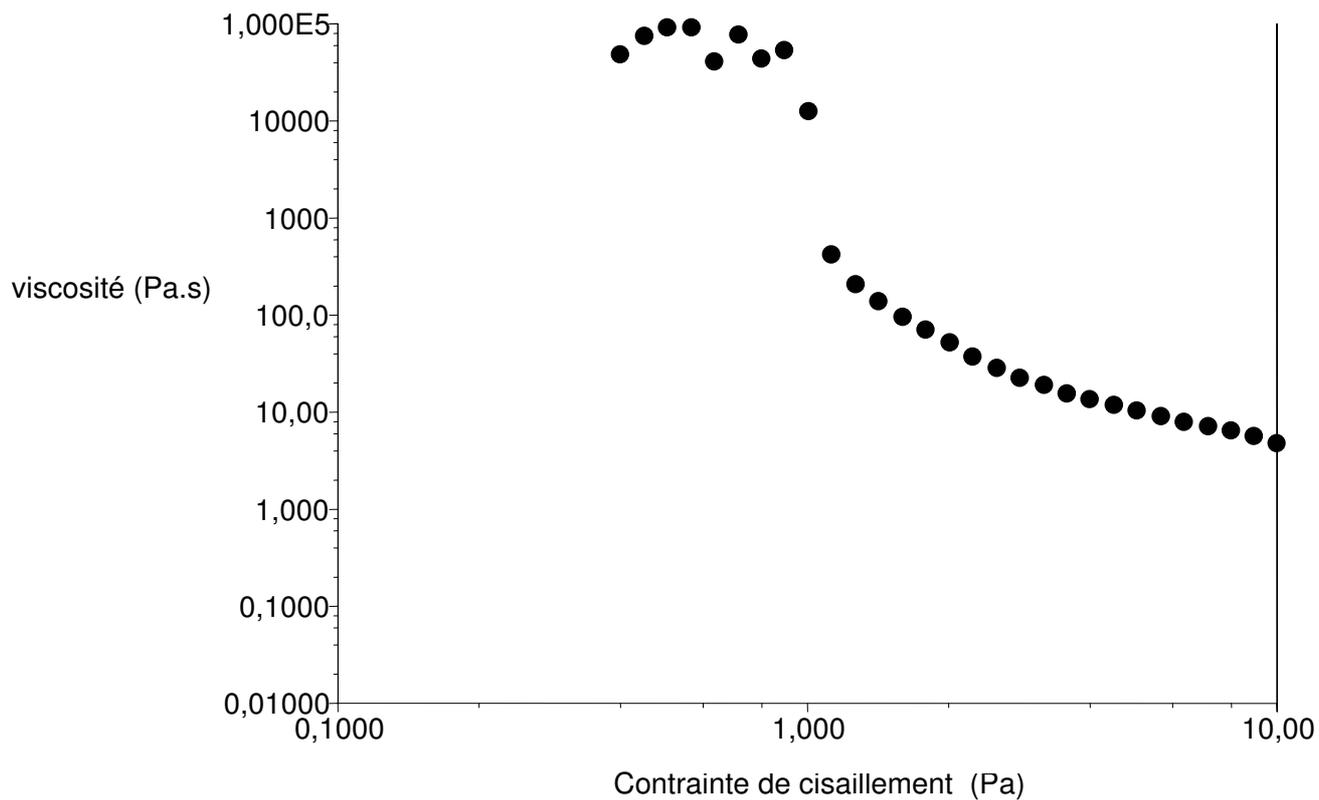


Figure III-8b: Evolution de la viscosité en fonction de la contrainte du blanc de synthèse  $0-AA_N-C_{12}$   $37,5CMPI-0$ -amine à 10 g/L

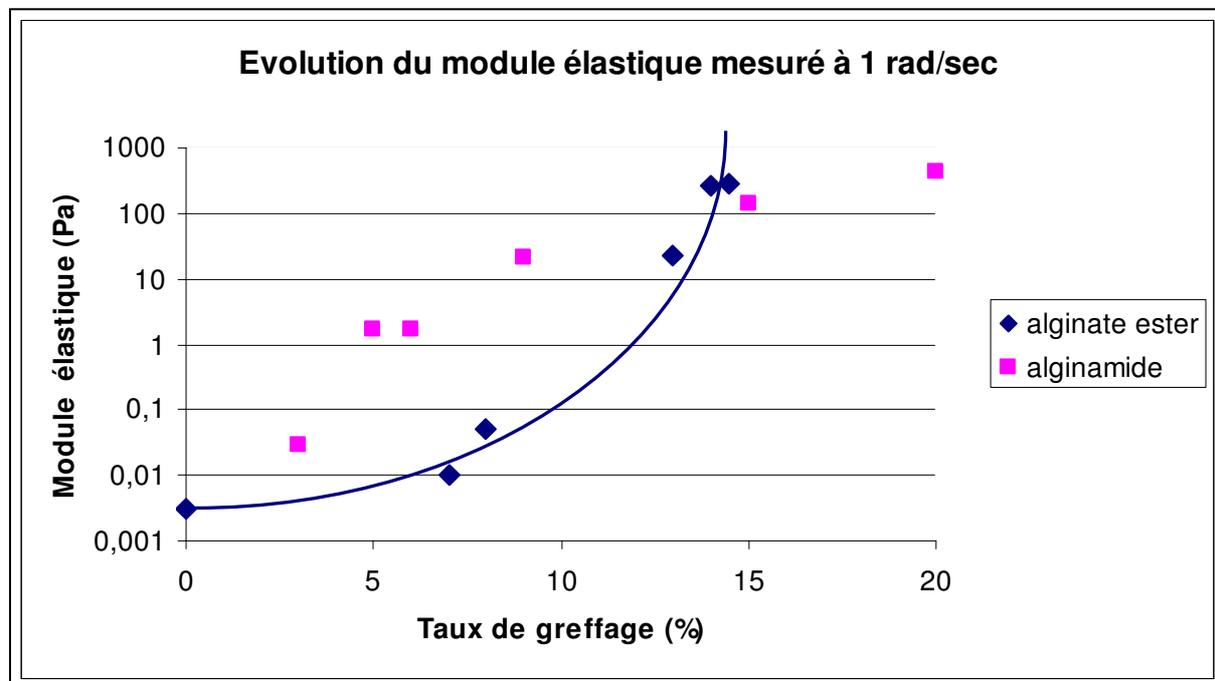
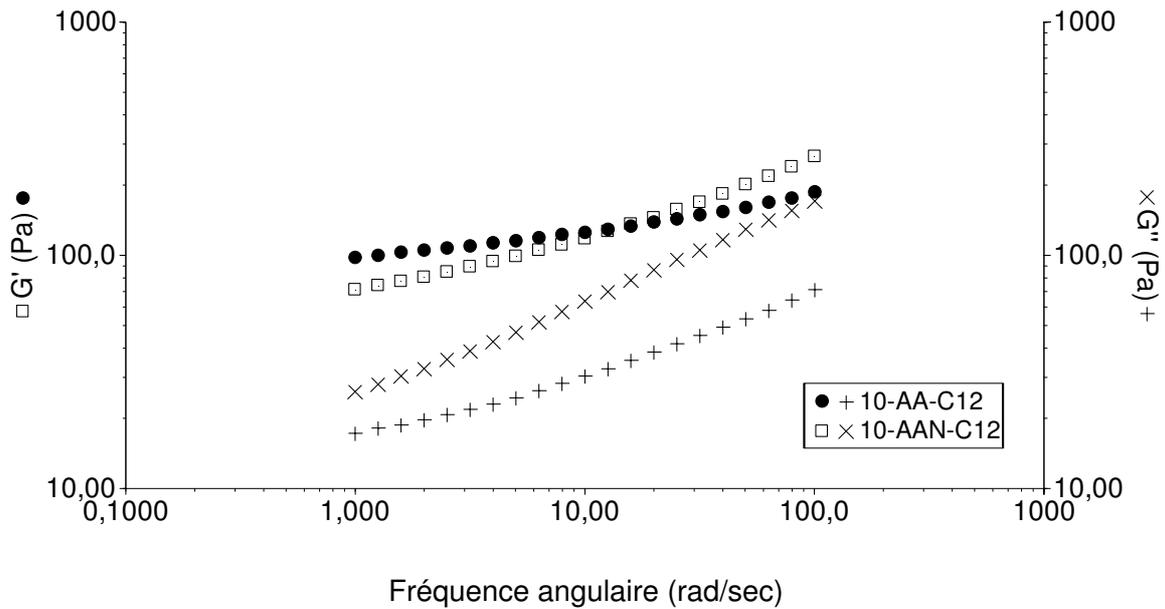
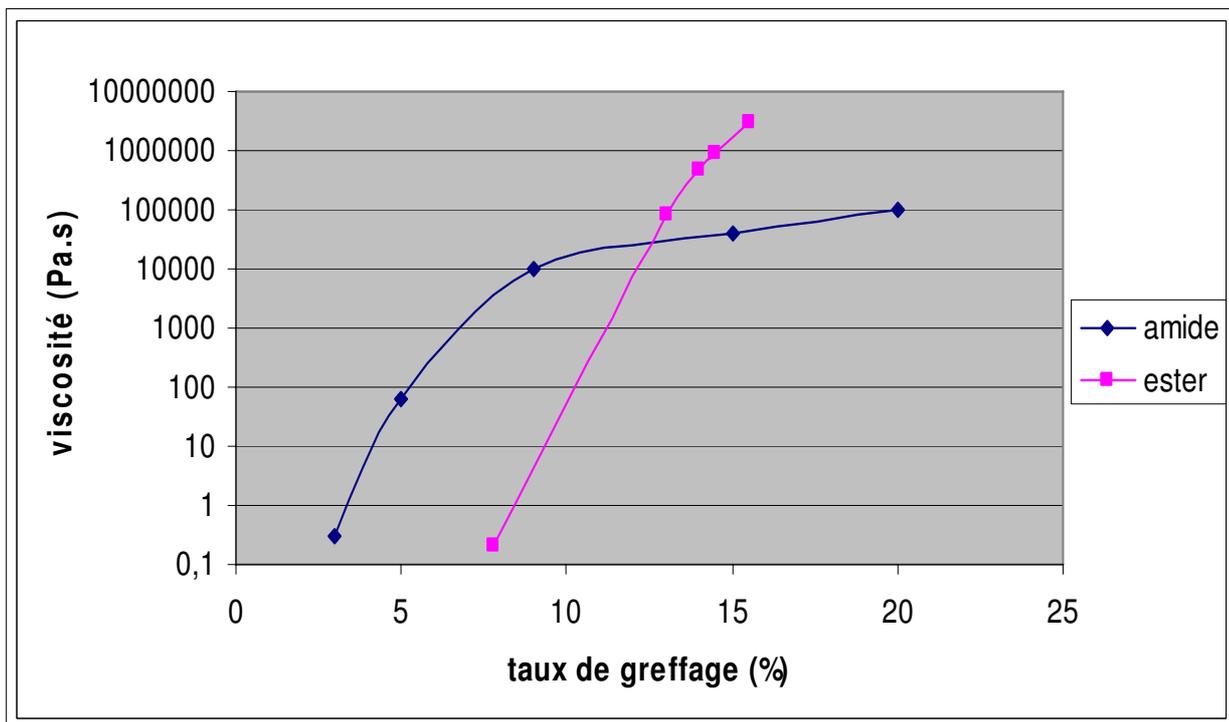


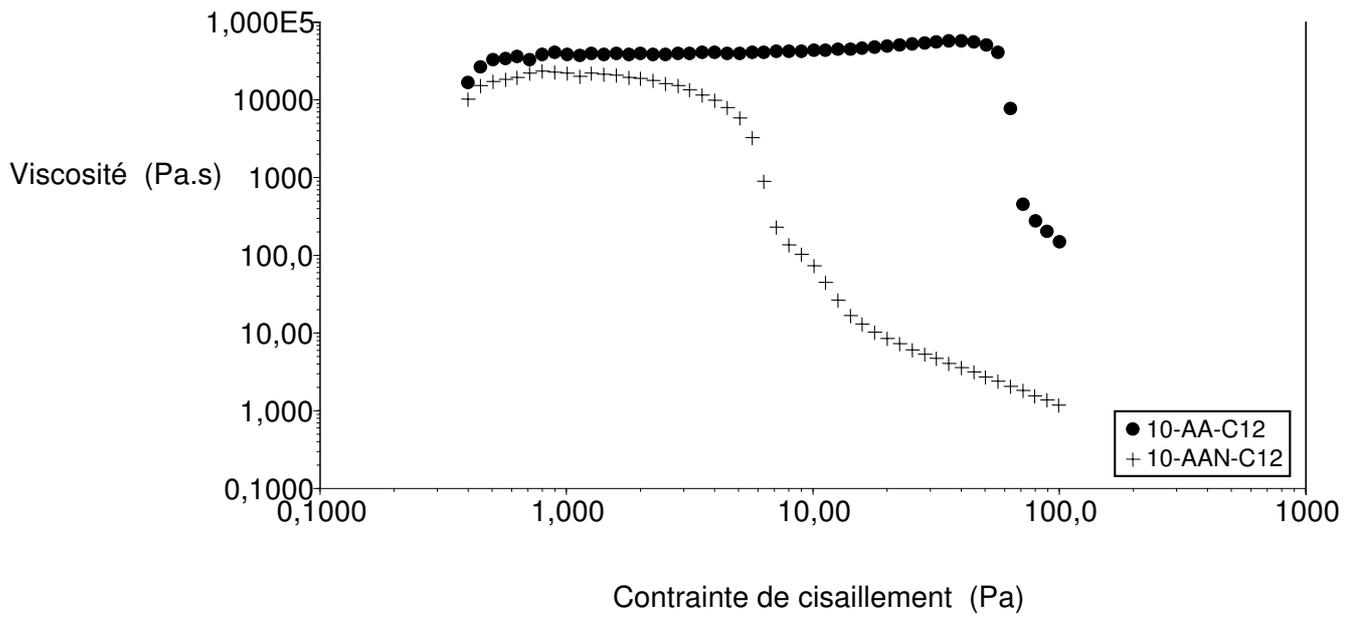
Figure III-9: Comparaison des modules élastiques à 1 rad/sec des alginamides et alginates esters à 10 g/L dans l'eau



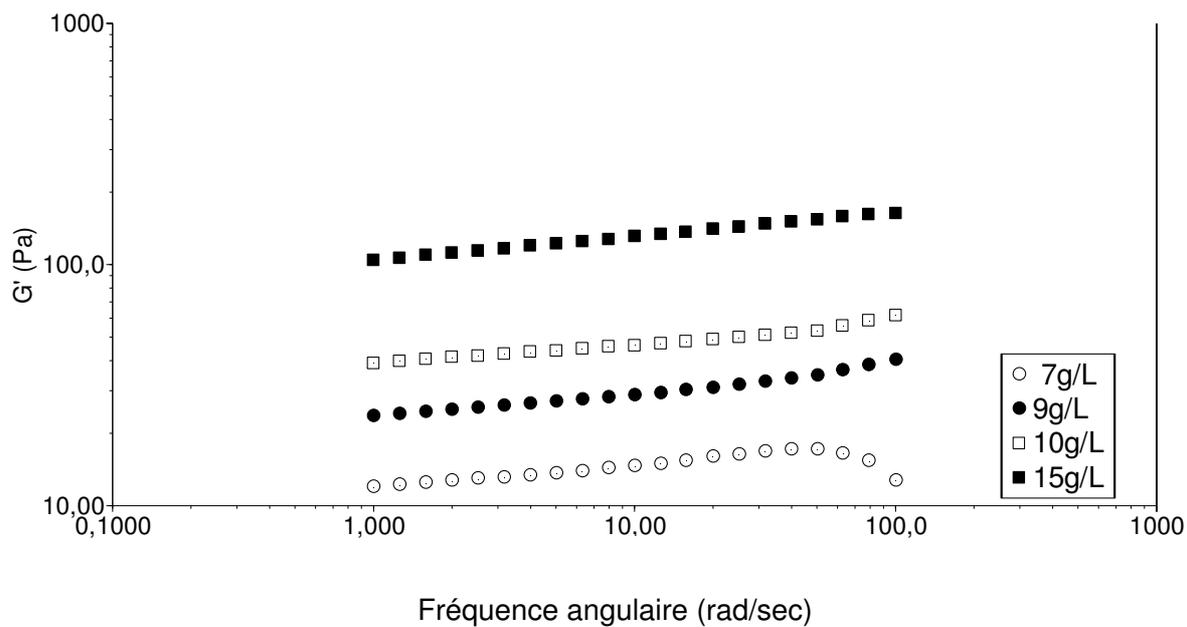
**Figure III-10: Comparaison des propriétés rhéologiques en mode oscillatoire en domaine linéaire d'un alginate ester  $10\text{-AA-C}_{12}$  et d'un alginate amide  $10\text{-AA-N-C}_{12-16}\text{CMPI}_{100}\text{amine}$  à 20 g/L dans l'eau à 25°C**



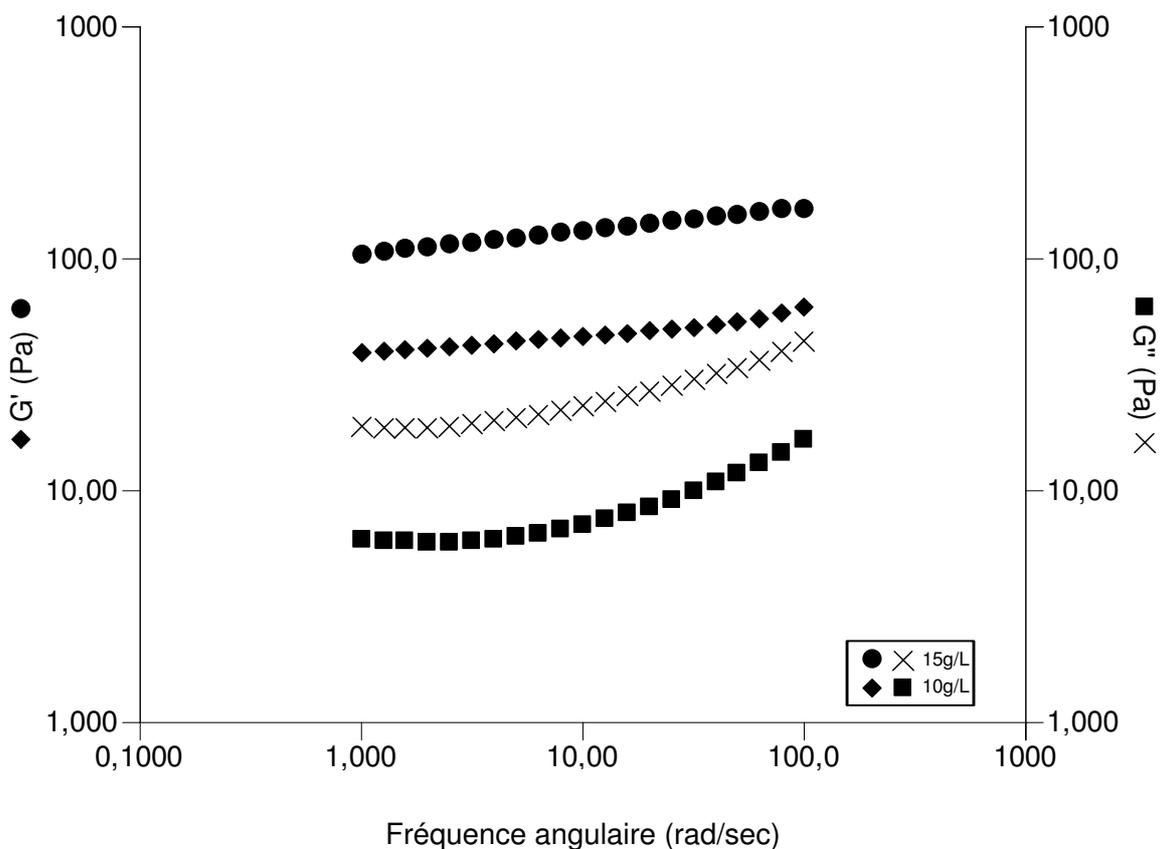
**Figure III-11: Evolution de la viscosité au premier plateau newtonien en fonction du taux de greffage dans l'eau à 25°C et 10 g/L**  
 (3-AA<sub>N</sub>-C<sub>12</sub>-5CMPI<sub>100</sub>amine; 5-AA<sub>N</sub>-C<sub>12</sub>-11CMPI<sub>100</sub>amine; 6-AA<sub>N</sub>-C<sub>12</sub>-12CMPI<sub>100</sub>amine, 9-AA<sub>N</sub>-C<sub>12</sub>-16CMPI<sub>100</sub>amine; 15-AA<sub>N</sub>-C<sub>12</sub>-29CMPI<sub>100</sub>amine; 20-AA<sub>N</sub>-C<sub>12</sub>-43CMPI<sub>100</sub>amine)



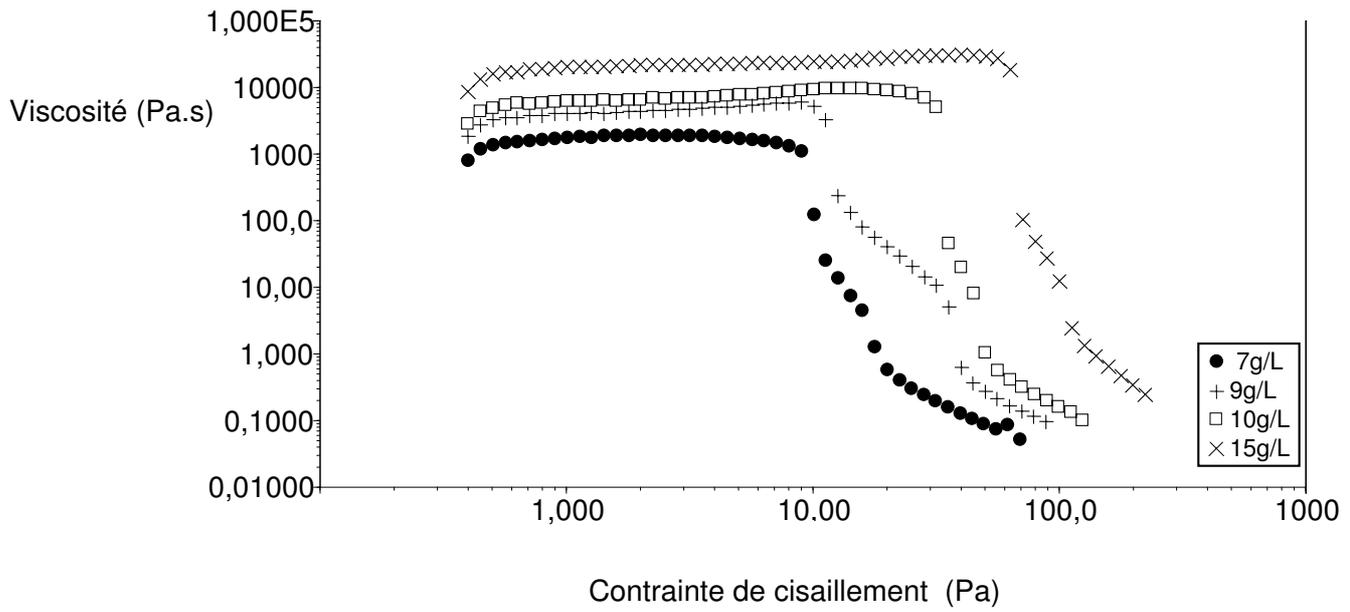
**Figure III-12: Comparaison des propriétés rhéologiques en régime permanent d'un alginate ester  $10\text{-AA-C}_{12}$  et d'un alginamide  $10\text{-AAN-C}_{12-16}\text{CMPI-100}$ amine dans l'eau à  $25^\circ\text{C}$  à  $20\text{ g/L}$**



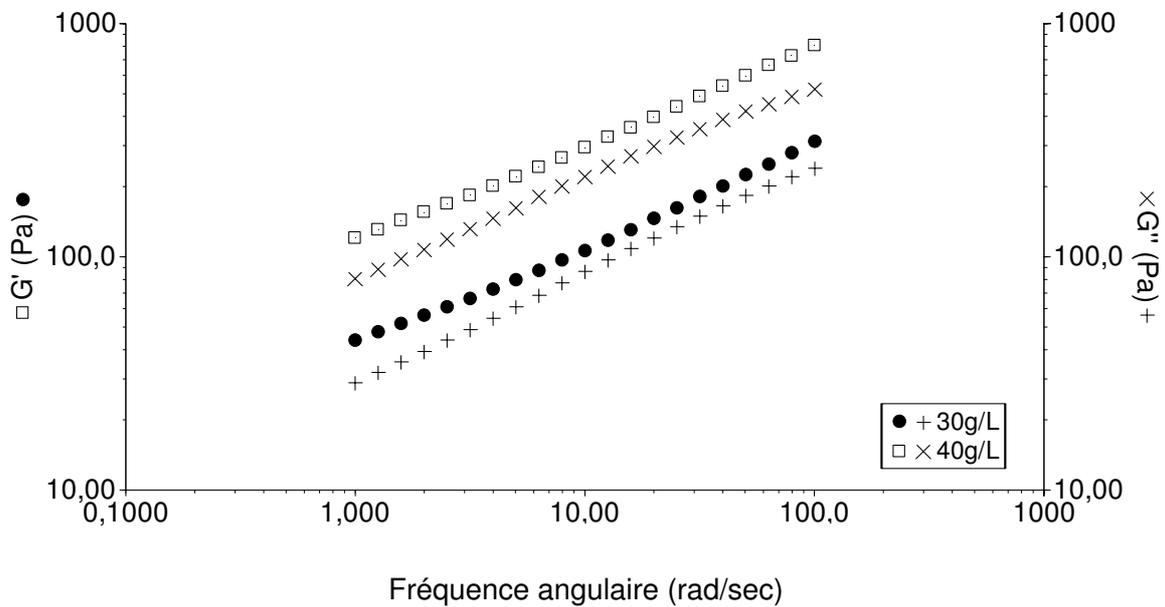
**Figure III-13 : Evolution des propriétés rhéologiques en régime oscillatoire à 25°C d'un alginate ester  $6\text{-AA-C}_{12}$  à 7g/L, 10g/L, 15g/L dans NaCl 0,15M**



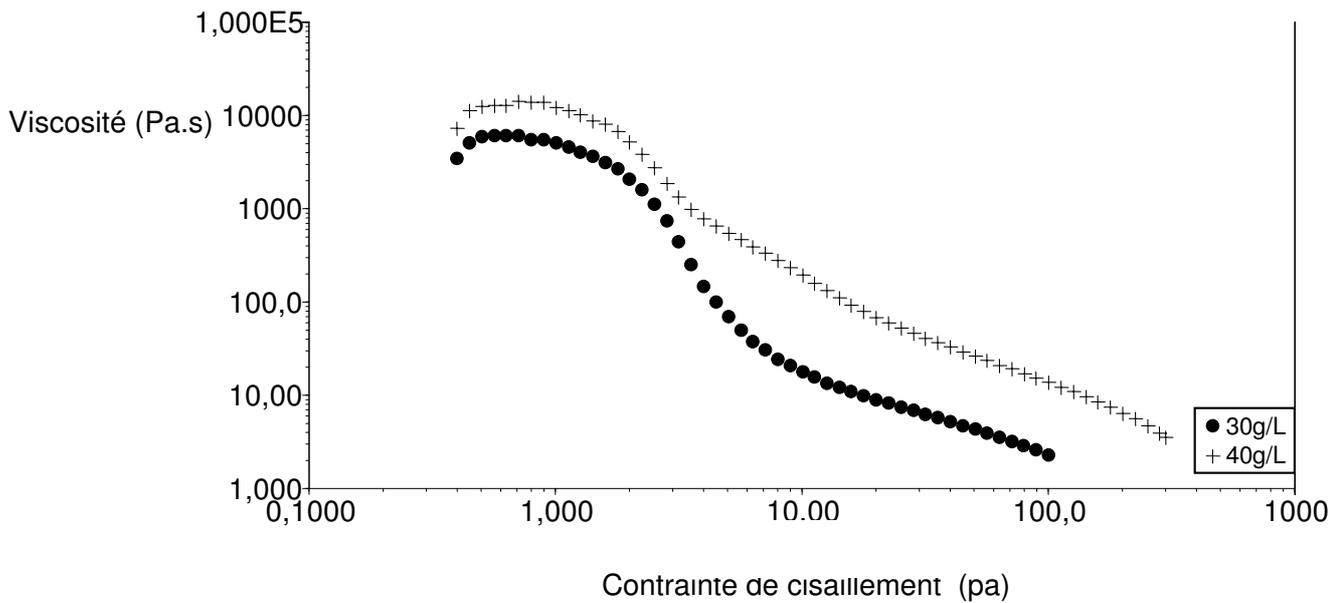
**Figure III-14: Modules élastique et visqueux d'un alginate ester  $6\text{-AA-C}_{12}$  à 10g/L et 15g/L dans NaCl 0,15**



**Figure III-15 : Evolution des propriétés rhéologiques en régime permanent à 25°C d'un alginate ester  $\epsilon$ -AA-C<sub>12</sub> à 7g /L, 10 g/L, 15g/L, 20g/L dans NaCl 0,15M**



**Figure III-16: Evolution des propriétés rhéologiques en régime oscillatoire à 25°C d'un alginamide  $\epsilon$ -AA<sub>N</sub>-C<sub>12</sub>-12CMPI-100amine à 30 g /L et 40 g/L dans NaCl 0,15M**



**Figure III-17: Evolution des propriétés rhéologiques en régime permanent à 25°C d'un alginamide  $6-AA_N-C_{12-12}CMPI_{100}$ amine à 30 g/L et 40 g/L dans NaCl 0,15M**

Concentration d'étude en g/L	Module élastique à 1 rad/sec (Pa)	Module visqueux à 1 rad/sec (Pa)	Tangente delta	Viscosité au premier plateau newtonien (pa.s)	Contrainte de rupture (Pa)	Temps Relaxation (s)
30	44	29	0,66	6000	1	6000
40	121	80	0,66	12400	1	12000

**Tableau III-3: Propriétés rhéologiques d'un alginamide  $6-AA_N-C_{12-12}CMPI_{100}$ amine dans NaCl 0,15M**

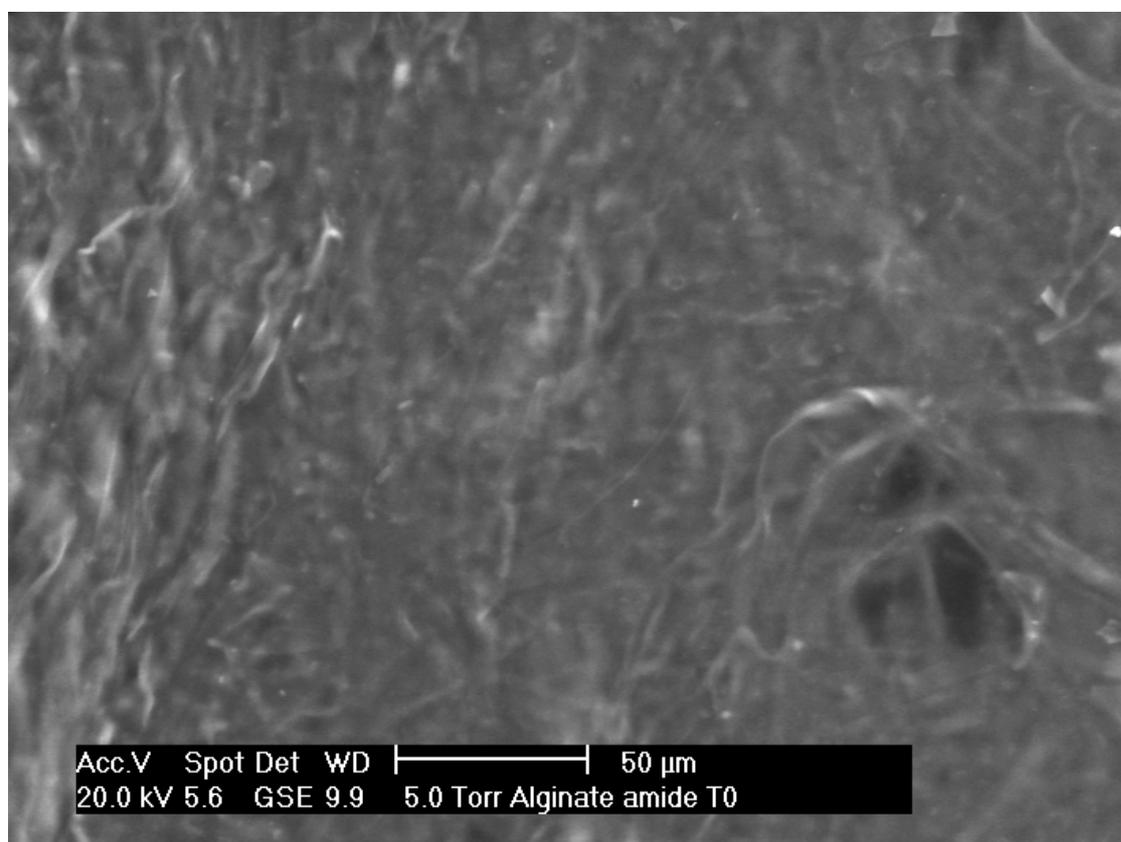
Concentration d'étude en g/L	Module élastique à 1 rad/sec	Module visqueux à 1 rad/sec	Tangente delta	Viscosité au premier plateau newtonien (pa.s)	Contrainte de rupture (Pa)	Temps relaxation max (s)
7	12	2	0,17	1600	8	200
9	24	4	0,17	4200	10	420
10	34	6	0,18	6500	28	250
15	104	19	0,18	22000	56	400

**Tableau III-4: Propriétés rhéologiques d'un alginate ester  $6-AA-C_{12}$  dans NaCl 0,15M**

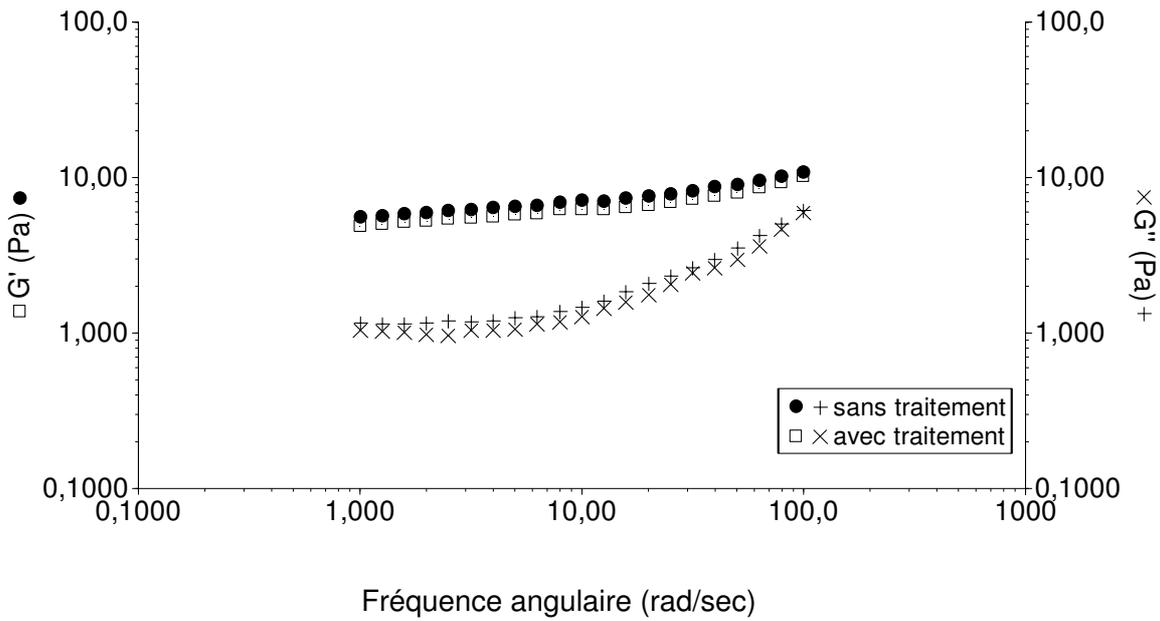
	NaCl 0,15M Ca <sup>2+</sup> 0,0014M	NaCl 0,15M Ca <sup>2+</sup> 0,005M	Cacodylate 0.05M Ca <sup>2+</sup> 0,005M
alginate natif	121	61	58
7-AA <sub>N</sub> C <sub>12</sub>	121	40	33
12-AA <sub>N</sub> C <sub>12</sub>	61	45	47
20-AA <sub>N</sub> C <sub>12</sub>	33	17	19

**Tableau III-5: Taux de gonflement des alginamides dans différents milieux.**

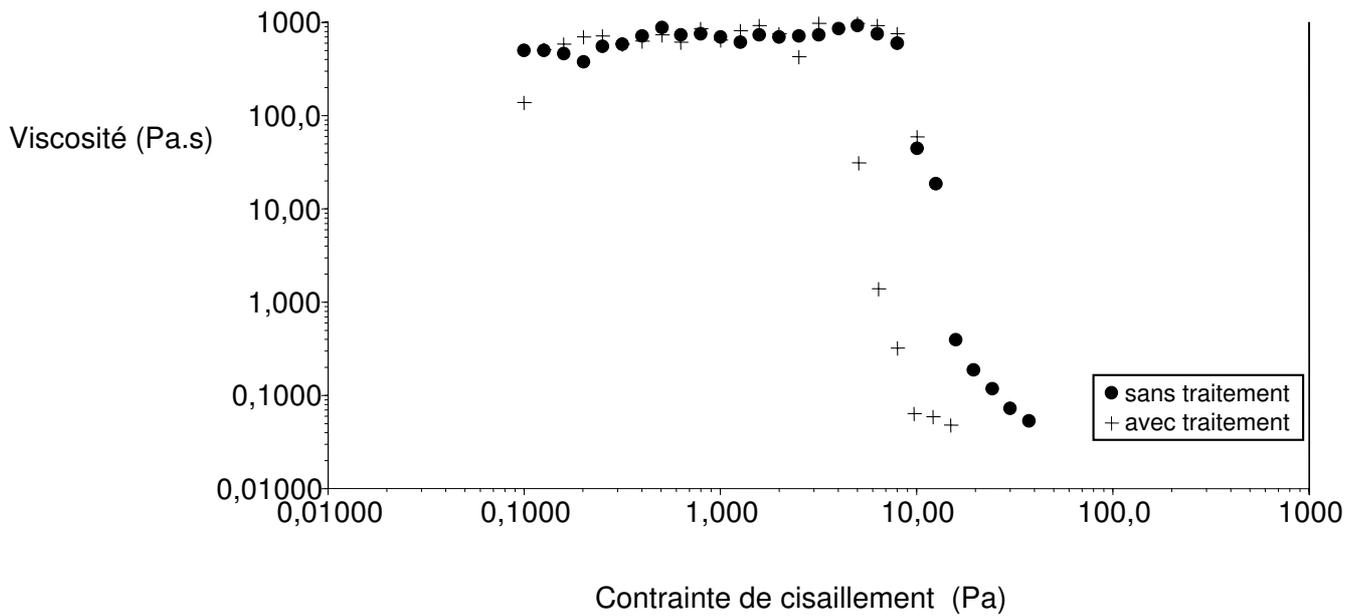
(7-AA<sub>N</sub>C<sub>12-13</sub>CMPI-100amine, 12-AA<sub>N</sub>C<sub>12-21</sub>CMPI-100amine, 20-AA<sub>N</sub>C<sub>12-43</sub>CMPI-100amine)  
(Pour les conditions de préparation, voir la partie expérimentale).



**Figure III-18: Photo par microscopie environnementale d'une bille d'alginamide 7,5-AA<sub>N</sub>-C<sub>12-13</sub>CMPI-100amine dans NaCl 0,15M, et Ca<sup>2+</sup> 1,4mM**

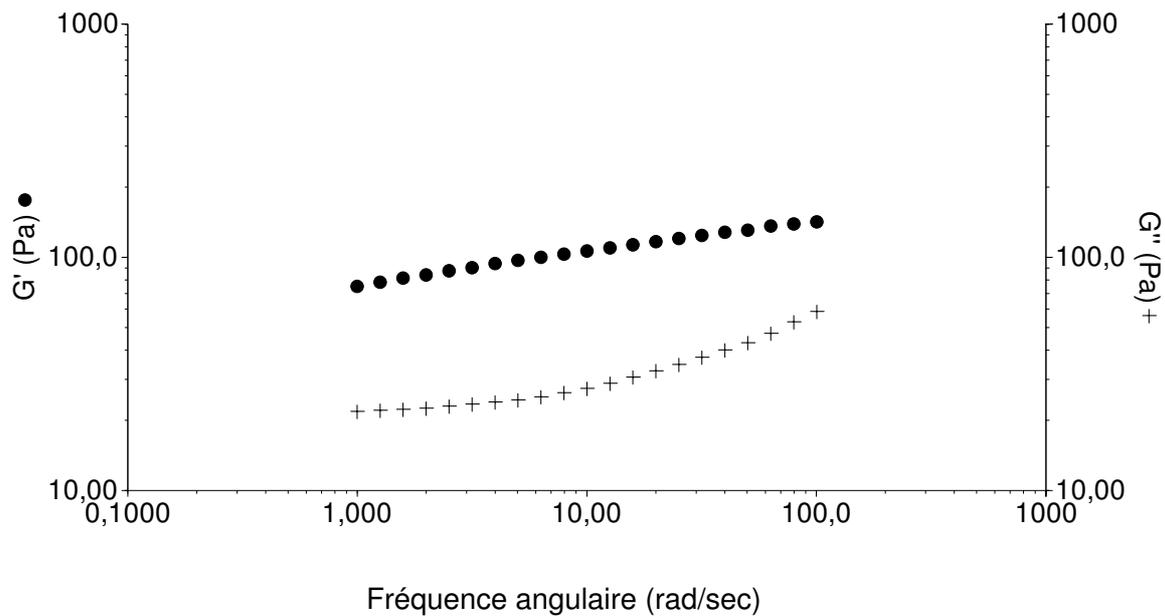


**Figure III-19: Propriétés rhéologiques d'un hydrogel d'alginate ester  $_6\text{-AA-C}_{12}$  à 7g/L dans NaCl 0,15M à 25°C avant et après stérilisation par UV**

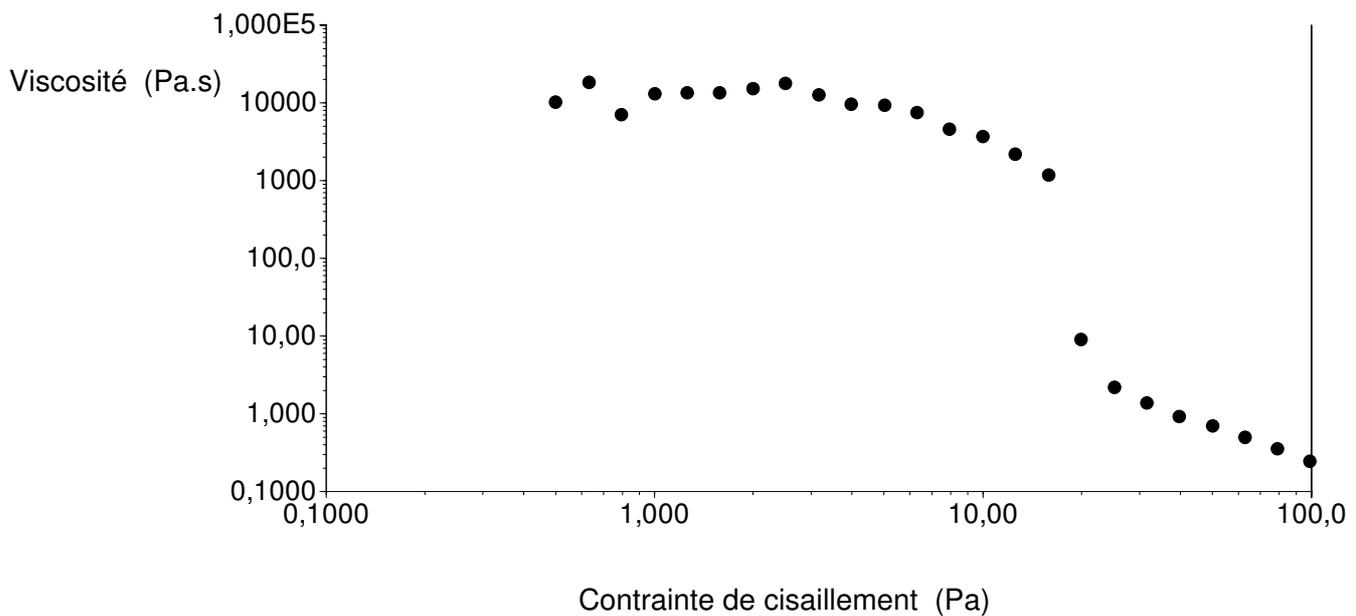


**Figure III-20: Propriétés rhéologiques d'un hydrogel d'alginate ester  $_6\text{-AA-C}_{12}$  à 7g/L dans NaCl 0,15M à 25°C avant et après stérilisation par UV**

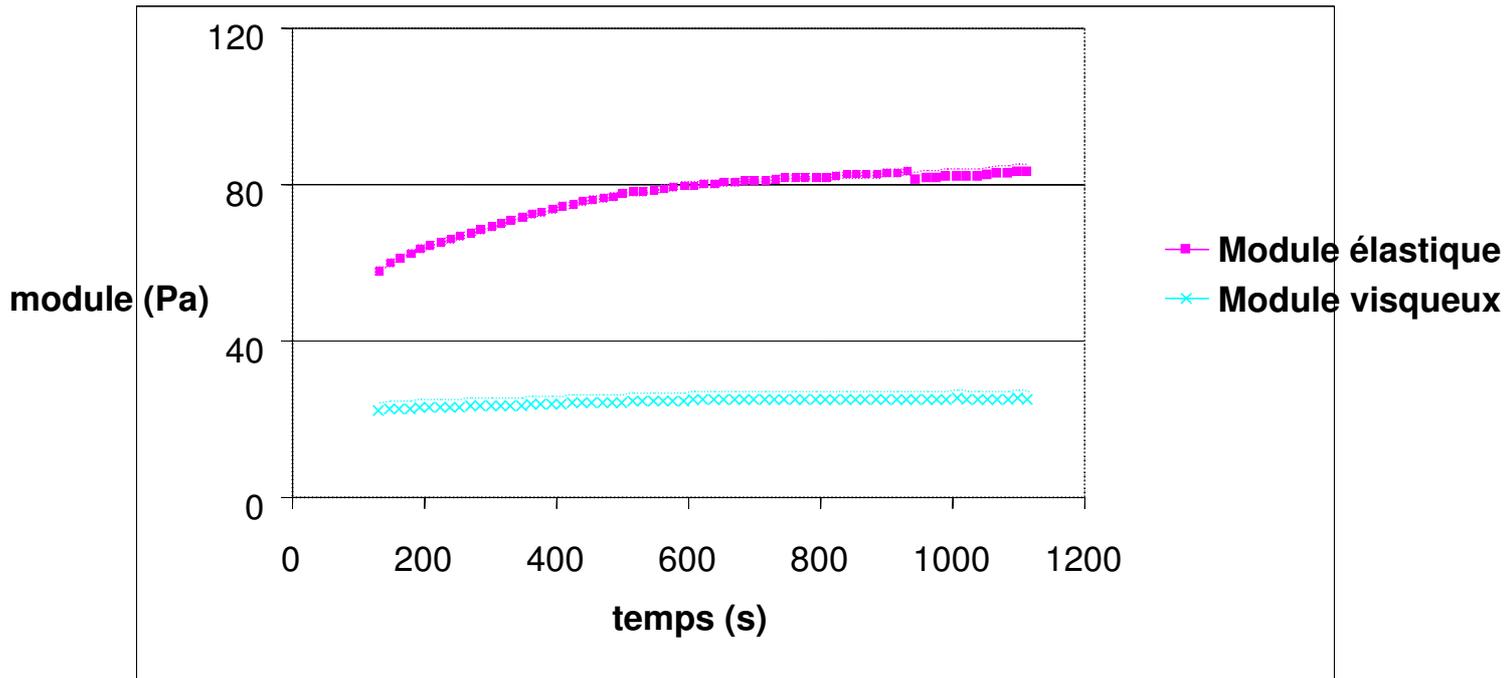




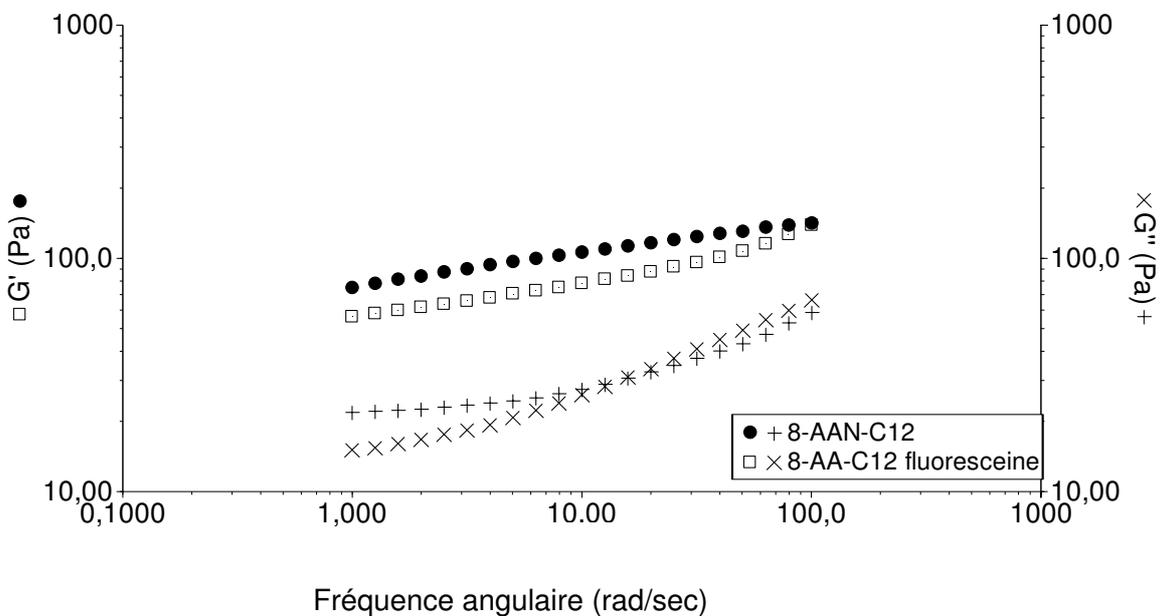
**Figure III-23: Modules élastiques et visqueux en domaine linéaire à 25°C de l'hydrogel d'alginate 8-AA<sub>N</sub>-C<sub>12</sub>-15CMPI-100amine à 20g/L dans NaCl 0,15M**



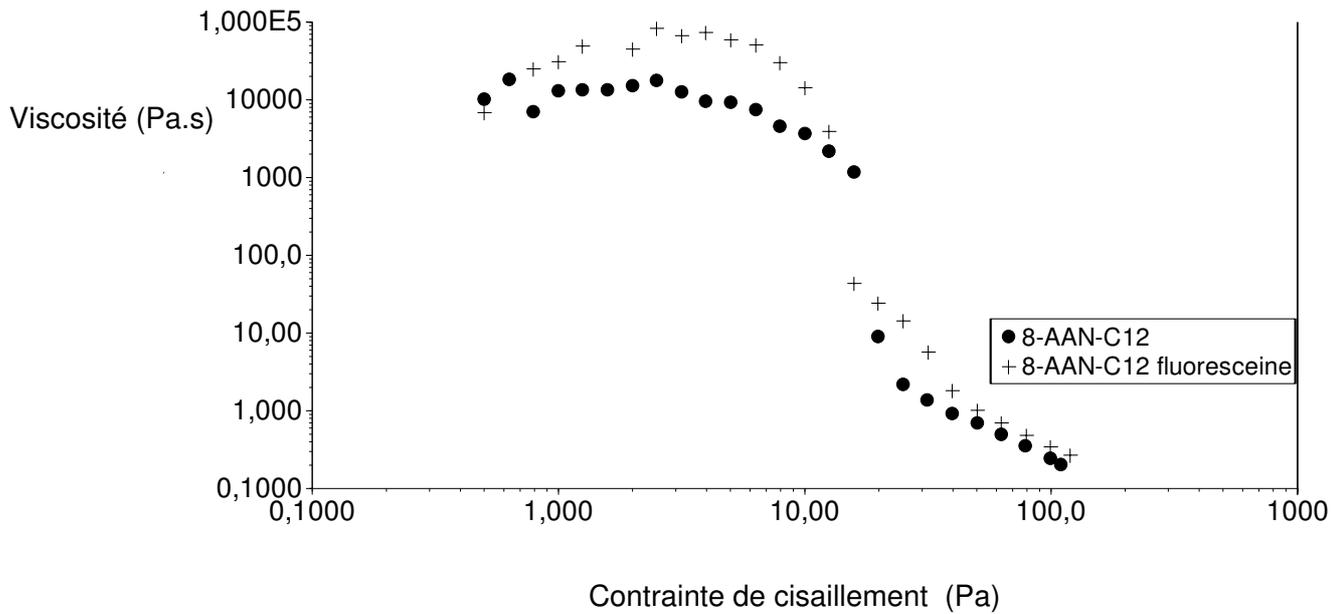
**Figure III-24: Evolution des propriétés rhéologique en régime permanent de l'hydrogel d'alginate 8-AA<sub>N</sub>-C<sub>12</sub>-15CMPI-100amine à 20g/L dans NaCl 0,15M à 25°C**



**Figure III-25: Evolution du module élastique et visqueux en fonction du temps à une fréquence de 1 rad/sec et une température de 25°C après injection de l'hydrogel 8-AA<sub>N</sub>-C<sub>12</sub>-15CMPI-100amine à 20g/L dans NaCl 0,15M à 25°C au moyen d'une seringue**



**Figure III-26: Comparaison des propriétés rhéologiques en mode oscillatoire en domaine linéaire à 25°C de l'hydrogel d' alginamide 8-AA<sub>N</sub>-C<sub>12</sub>-15CMPI-100amine à 20g/L dans NaCl 0,15M et de l'hydrogel d'alginamide fluorescent 8-AA<sub>N</sub> fluorescent-C<sub>12</sub> correspondant**



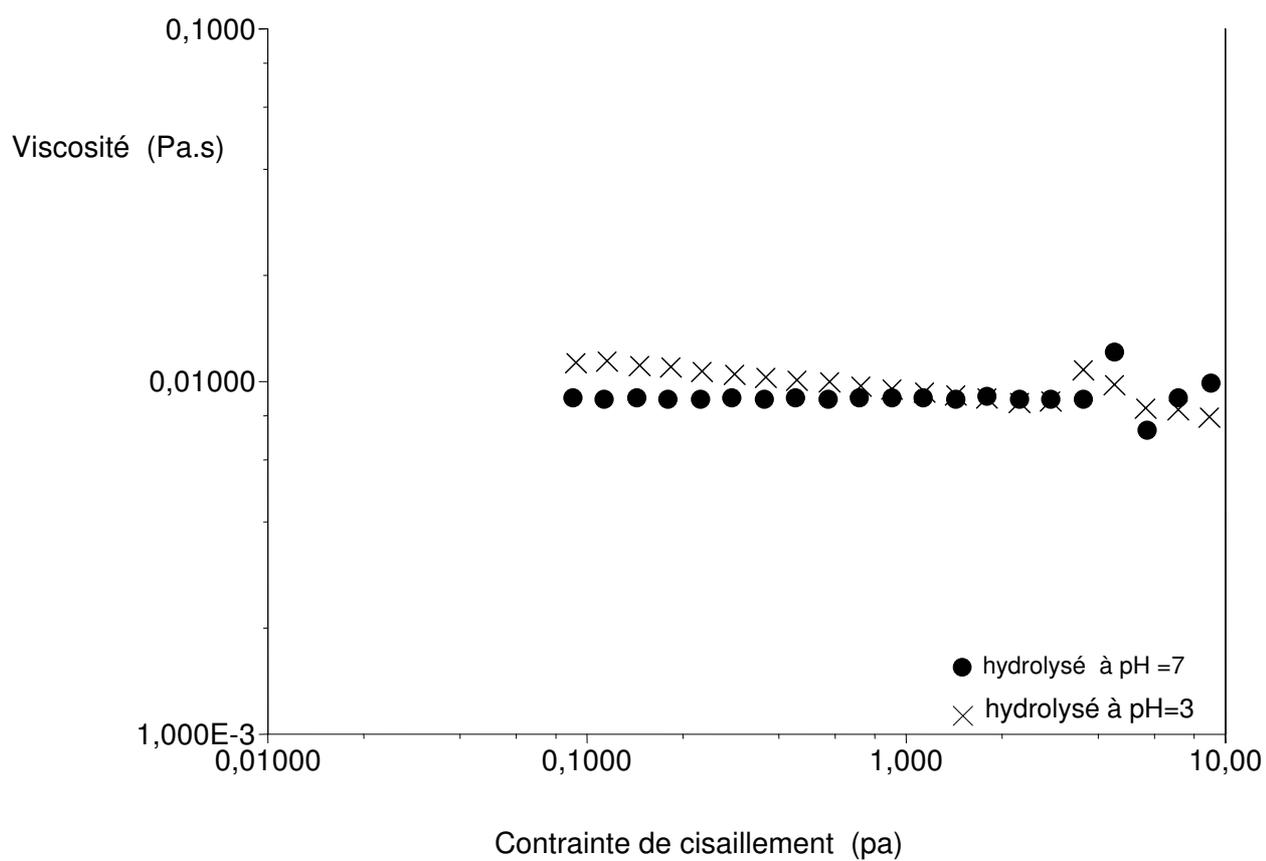
**Figure III-27: Comparaison des propriétés rhéologiques en régime permanent en domaine linéaire à 25°C de l'hydrogel d' alginamide 8-AA<sub>N</sub>-C<sub>12-15</sub>CMPI-100amine à 2% dans NaCl 0,15M et de l'hydrogel d'alginamide fluorescent 8-AA<sub>N</sub> fluorescent-C<sub>12</sub> correspondant**

Echantillon	$\bar{M}_n$ ( $10^3$ g.mol <sup>-1</sup> )	$\bar{M}_w$ ( $10^3$ g.mol <sup>-1</sup> )
Alginate natif non hydrolysé	<b>277</b>	<b>310</b>
Alginate natif après hydrolyse pH=3, 48h	<b>203</b>	<b>246</b>

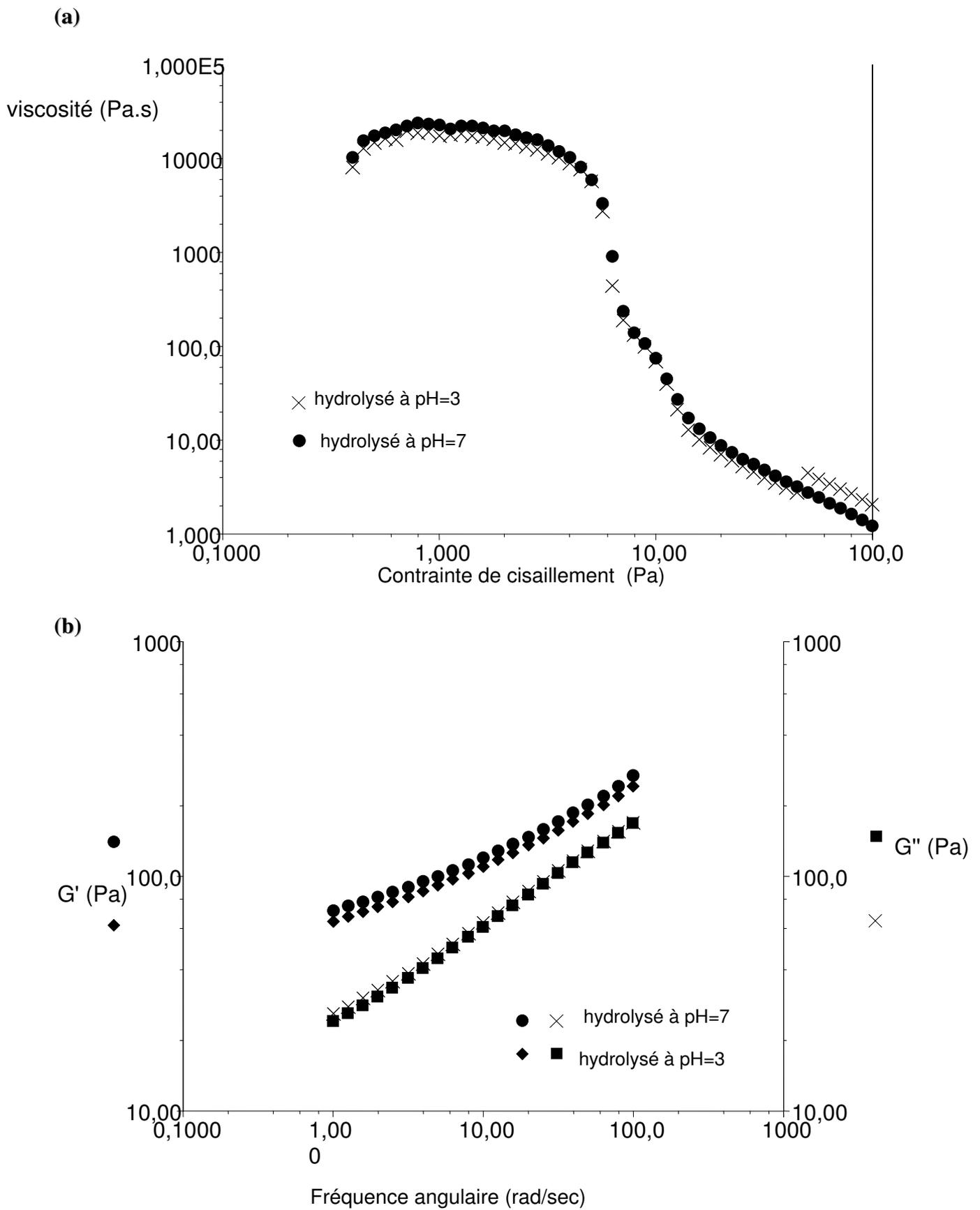
**Tableau III-6: Masses molaires moyennes en nombre et en masse de l'alginate natif et du blanc de synthèse après hydrolyse acide à pH= 3.**

polymère	Fraction massique dans la « solution » <u>avant hydrolyse</u>	Fraction massique dans la « solution » <u>après hydrolyse (pH=3)</u>
alginamide 10-AA <sub>N</sub> -C <sub>12</sub>	37,6%	38%
blanc de synthèse 0-AA <sub>N</sub> -C <sub>12-37,5</sub> CMPI	18,4%	22,5%

**Tableau III-7: Fraction massique de polymère dans la « solution » avant et après l'étape d'hydrolyse acide**



**Figure III-28: Evolution de la viscosité en fonction de la contrainte de l'alginate natif après hydrolyse acide à pH=3 pendant 48 heures, à 10 g/L dans l'eau**



**Figure III-29: Evolution du comportement de l'alginate  $10\text{-AA}_N\text{-C}_{12-16}\text{CMPI-100}$ amine après l'hydrolyse acide à pH 3 pendant 48 heures, à 20 g/L dans l'eau En régime permanent (a), (b) En régime oscillatoire**

pH de la solution de NaOH avant ajout du polymère	$\overline{M}_n$ (en g/mol)	$\overline{M}_w$ (en g/mol)
14	55 000	79 000
13	42 000	67 000
12	173 000	206 000
11	182 000	213 000

**Tableau III-8a: Masses molaires en nombre  $\overline{M}_n$  et en masse de l'alginate de sodium  $\overline{M}_w$  après traitement durant 24h par une solution de NaOH à différentes concentrations.**  
 Alginate de sodium natif (lot 1) de départ  $\overline{M}_n = 160\ 000$  g/mol et  $\overline{M}_w = 205\ 000$  g/mol.

pH de la solution de NaOH avant ajout du polymère	$\overline{M}_n$ (en g/mol)	$\overline{M}_w$ (en g/mol)
14	27 000	42 000
12,9	58 300	77 000

**Tableau III-8b: Evolution de la masse molaire en nombre et en poids du blanc d'alginate 0-AA<sub>N</sub>-C<sub>12</sub> 50-CMPI- 0-amine après traitement par NaOH.**

Alginate de sodium natif de départ  $\overline{M}_n = 160\ 000$  g/mol et  $\overline{M}_w = 205\ 000$  g/mol (lot 1).  
 Blanc d'alginate  $\overline{M}_n =$  non mesurable et  $\overline{M}_w =$  non mesurable

Echantillon	$\overline{M}_n$ ( $10^3$ g.mol <sup>-1</sup> )	$\overline{M}_w$ ( $10^3$ g.mol <sup>-1</sup> )
Alginate natif	322	378
Alginate natif pH=12, 20 minutes	207	249
Alginate natif pH=12, 1 heure	181	239
Alginate natif pH=12, 5 heures	191	244
Blanc de synthèse pH=12, 20 minutes	344	405
Blanc de synthèse pH=12, 1 heure	157	227
Blanc de synthèse pH=12, 5 heures	118	168

Blanc de synthèse : 0-AA<sub>N</sub>-C<sub>12</sub> 37,5-CMPI- 0-amine

**Tableau III-9: Résultats SEC-MALLS - Evaluation de la dégradation de l'alginate natif et du blanc de synthèse à pH=12 en milieu tamponné (NaHCO<sub>3</sub>/ NaH<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)**

Echantillon	$\bar{M}_n$ ( $10^3$ g.mol <sup>-1</sup> )	$\bar{M}_w$ ( $10^3$ g.mol <sup>-1</sup> )
Alginate natif non hydrolysé	<b>350</b>	<b>404</b>
Alginate natif pH=9, 20 minutes	<b>367</b>	<b>405</b>
Alginate natif pH =9, 1 heure	<b>295</b>	<b>356</b>
Alginate natif pH=9, 5 heures	<b>257</b>	<b>317</b>
Alginate natif pH=9,24 heures	<b>201</b>	<b>274</b>
Blanc de synthèse non hydrolysé	<b>X</b>	<b>X</b>
Blanc de synthèse pH=9, 20 minutes	<b>X</b>	<b>X</b>
Blanc de synthèse pH 9, 5 heures	<b>X</b>	<b>X</b>

Blanc de synthèse : alginate modifié obtenu sans ajout de dodécylamine mais ayant subi toutes les étapes de synthèse, à 25°C dans le DMF

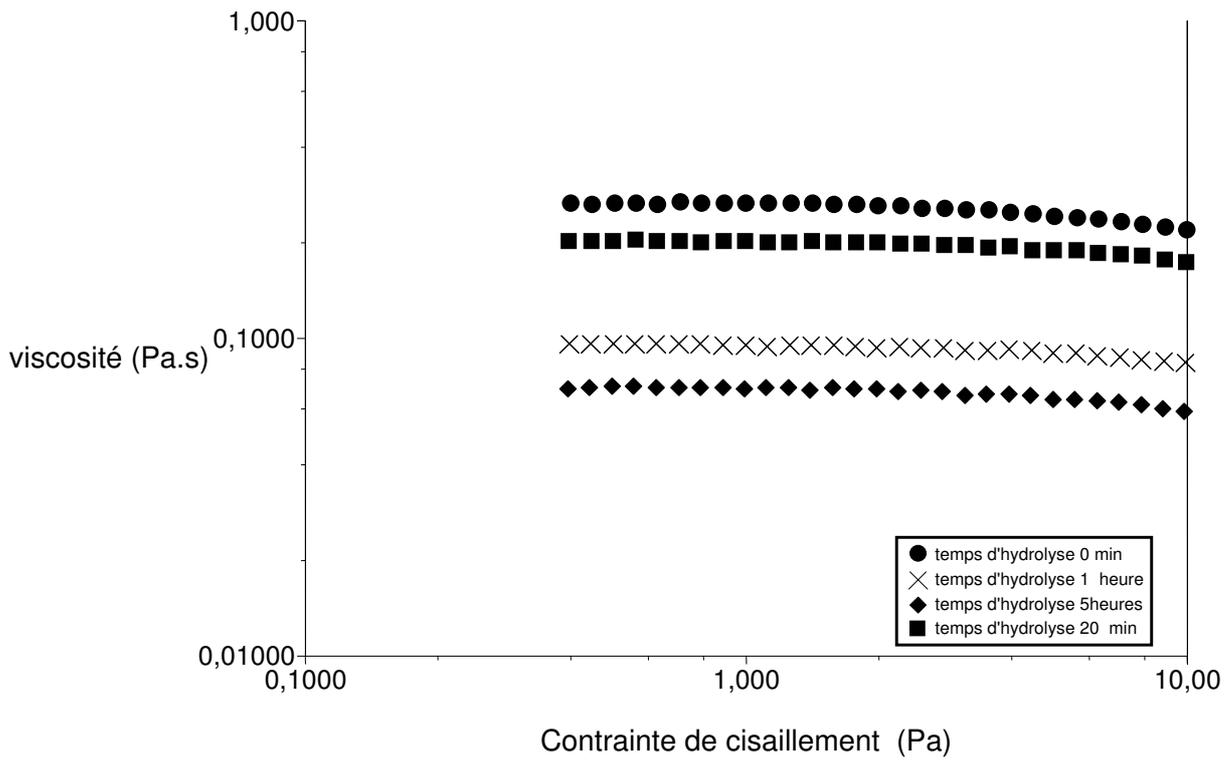
**Tableau III-10: Résultats SEC-MALLS - Evaluation de la dégradation de l'alginate natif et du blanc de synthèse après hydrolyse basique à pH=9.**

	Taux de chaînons alkyle (moles de chaînons alkyles /100 moles de motifs monosaccharidiques) Dosé par analyse élémentaire
$6-AA_N-C_{12}$ avant hydrolyse	6
$6-AA_N-C_{12}$ après hydrolyse	2

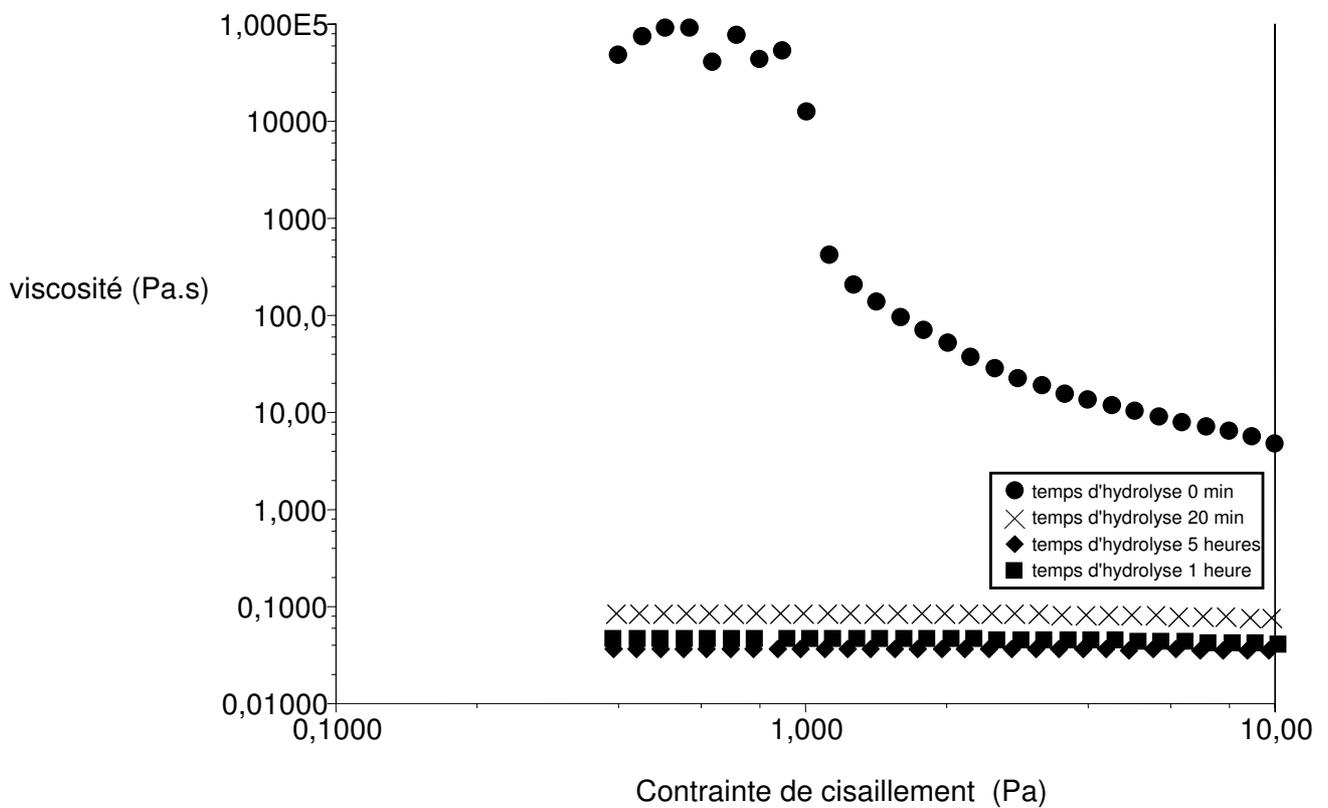
**Tableau III-11a: Variation du taux de chaînons alkyles du polymère  $6-AA_N-C_{12}$  avant et après hydrolyse à pH=12 pendant 1 heure (NaHCO<sub>3</sub>/ NaH<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)**

	Taux de chaînons alkyle (moles de chaînons alkyles /100 moles de motifs monosaccharidiques) Dosé par analyse élémentaire
$6-AA_N-C_{12}$ avant hydrolyse	4
$6-AA_N-C_{12}$ après hydrolyse 20 minutes	3,9
$6-AA_N-C_{12}$ après hydrolyse 1 heure	4,1
$6-AA_N-C_{12}$ après hydrolyse 5 heure	3,8
$6-AA_N-C_{12}$ après hydrolyse 24 heure	4

**Tableau III-11b: Variation du taux de chaînons alkyles du polymère  $6-AA_N-C_{12-10}CMPI-100$  amine avant et après hydrolyse à PH=9 à différents temps en milieu tanponné (NaHCO<sub>3</sub>/ NaH<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)**



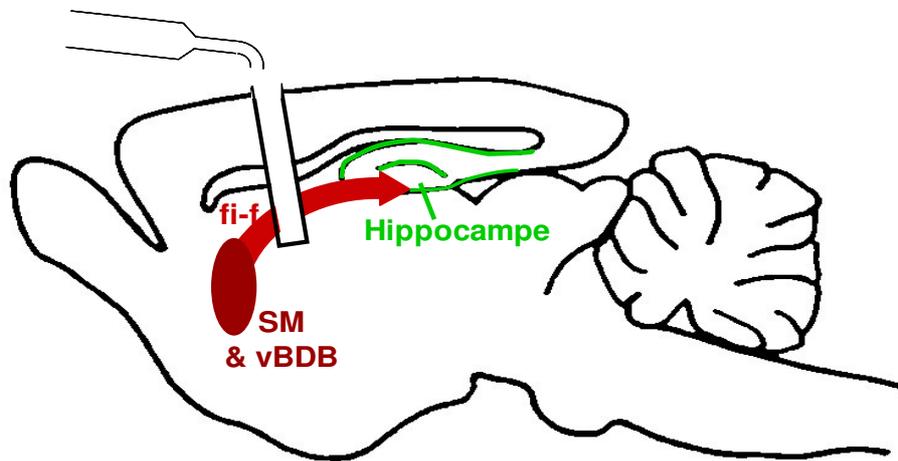
**Figure III-30: Evolution de la viscosité en fonction de la contrainte pour différentes durées d'hydrolyse basique à pH 12 de l'alginate natif à 10 g/L**



**Figure III-31: Evolution de la viscosité en fonction de la contrainte pour différentes durées d'hydrolyse basique à pH=12 du blanc de synthèse à 10 g/L**







**Figure IV-1: Lésion des voies septo-hippocampiques dorsales. Plan longitudinal**

**fi-f : fimbria fornix (voie nerveuse entre SM et l'hippocampe)**

**SM et vBDB : septum médium et bras vertical de la bande diagonale de Broca (point de convergence pour les informations provenant de l'hypothalamus et se dirigeant vers la formation hippocampique)**

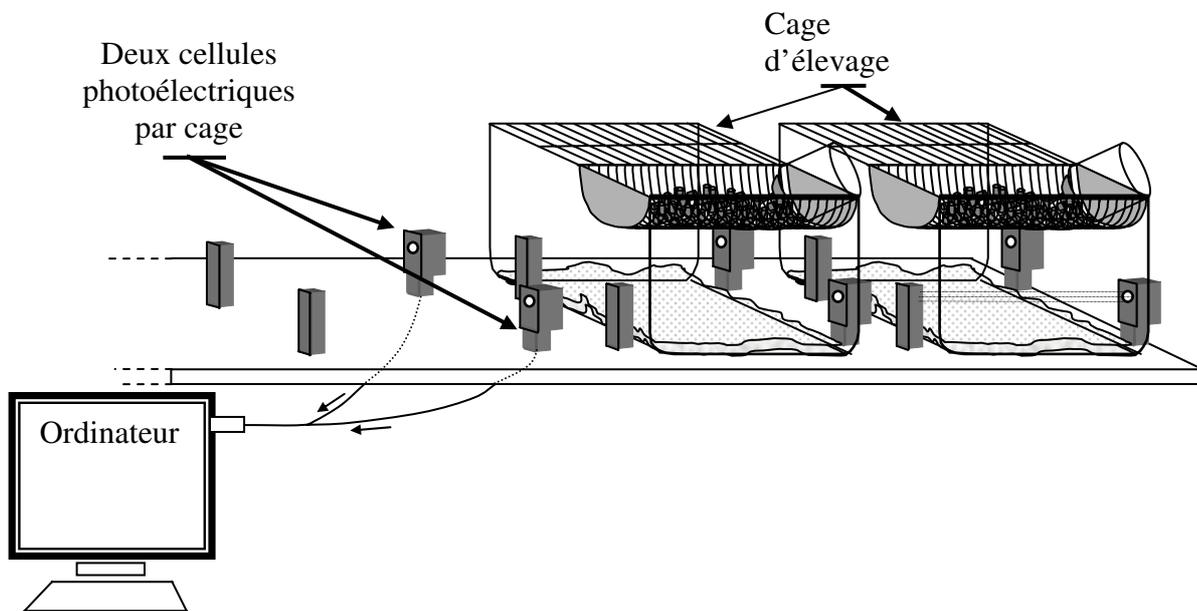
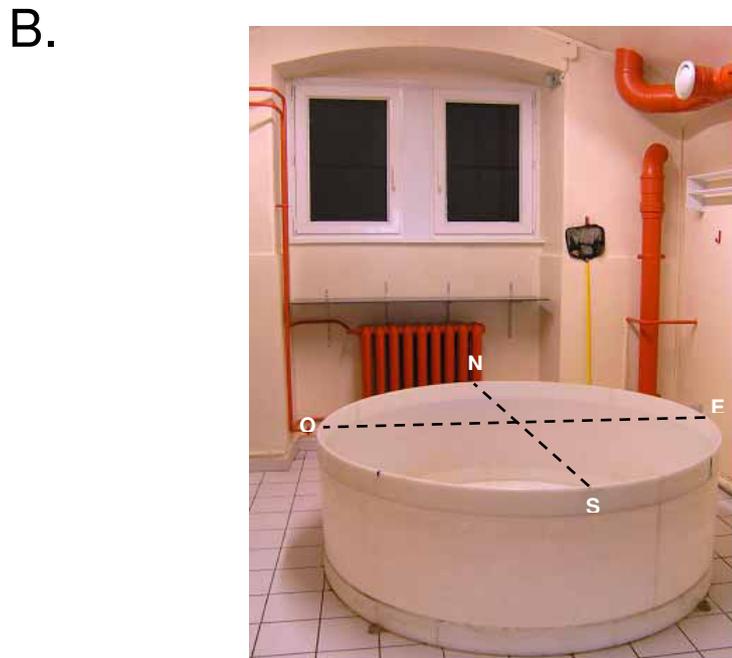
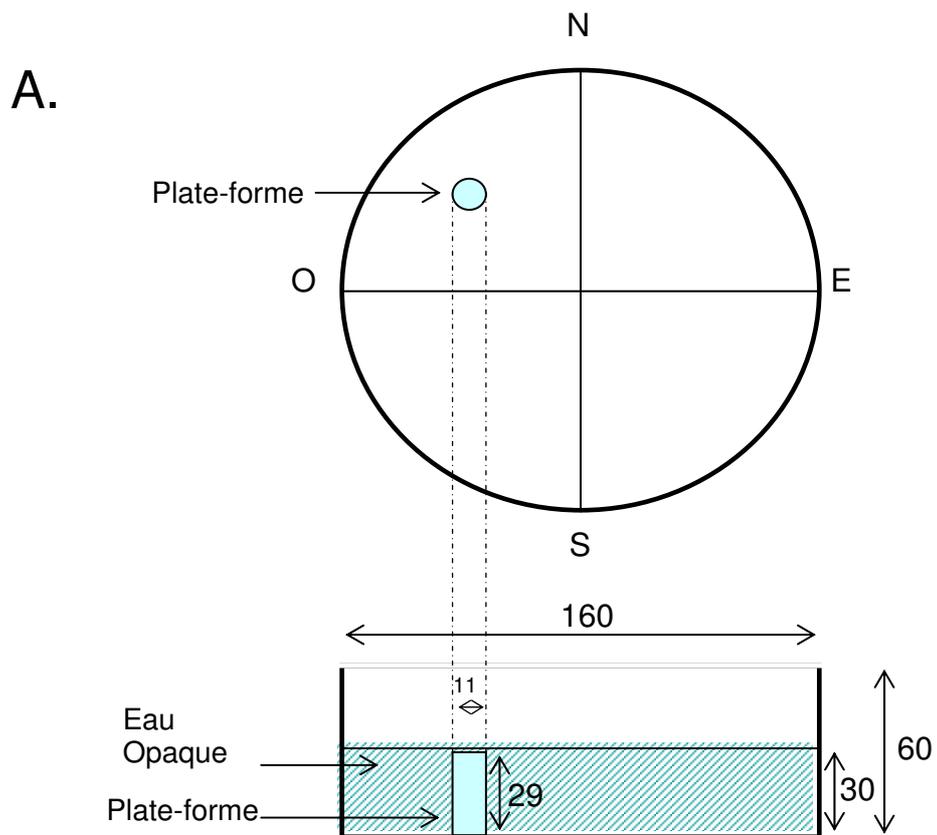


Figure IV-2: Représentation schématique du test d'actographie

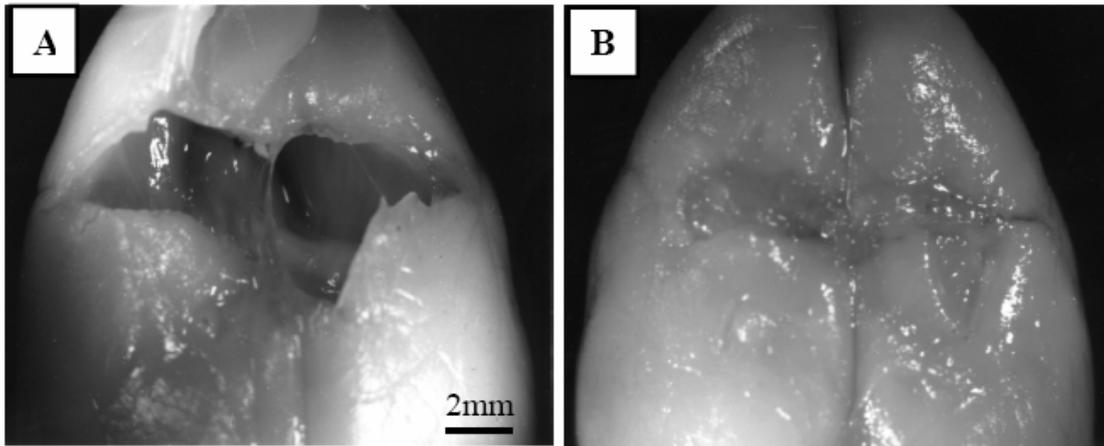


Figure IV-3 : Test de la barre

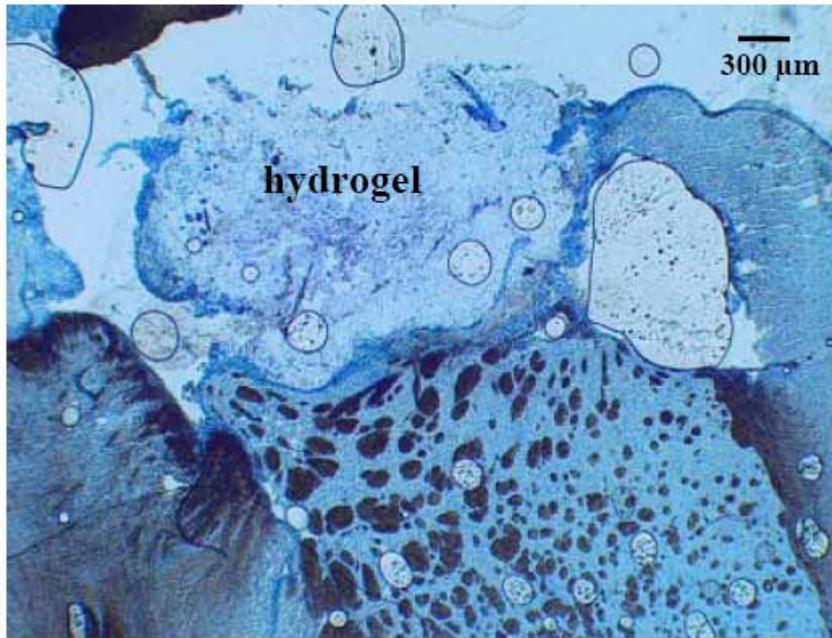




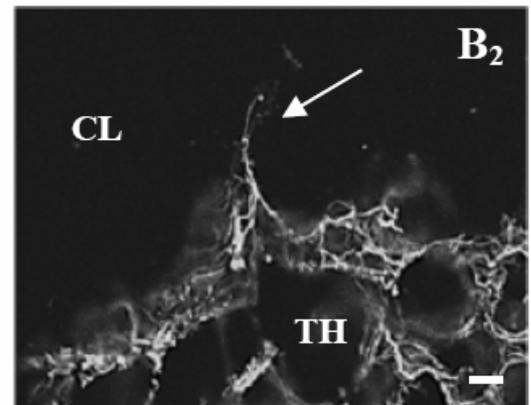
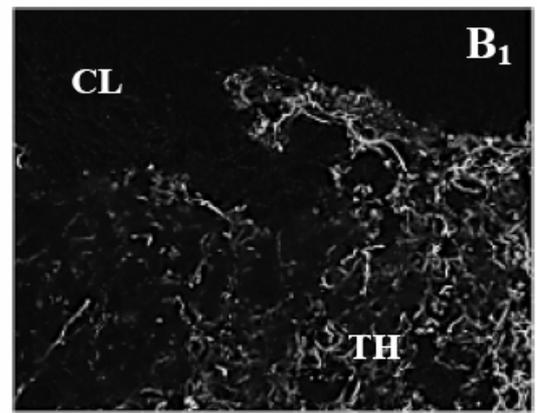
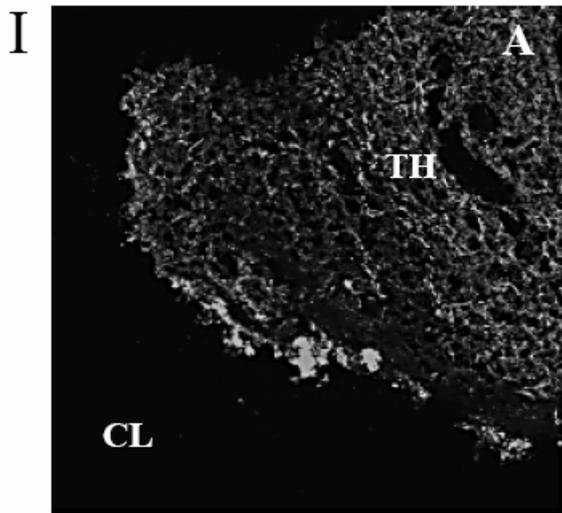
**Figure IV-4 : Descriptif du dispositif de la piscine de Morris**  
**A: Dimension de la piscine en centimètres**  
**B: Photographie du dispositif ( n =Nord, S=Sud, E=Est, O= Ouest)**



**Figure IV-5: Vue supérieure macroscopique de cerveaux de rats, 1 mois après lésion, en absence (A) et en présence (B) d'un hydrogel d'alginate dans la cavité lésionnelle.**



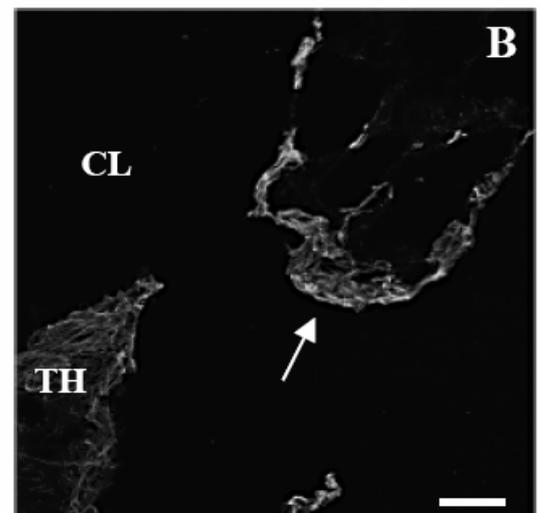
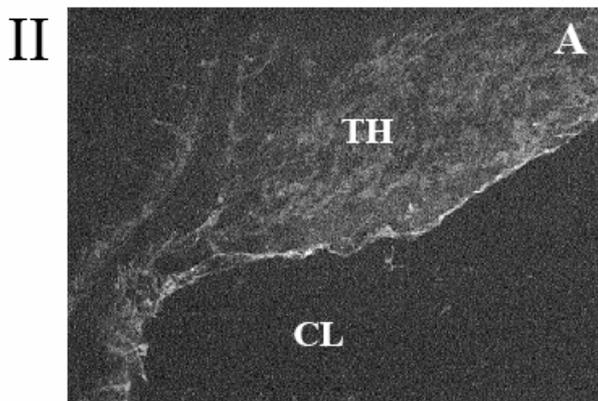
**Figure IV-6 : Coupe transversale de cerveau de rat, colorée au bleu de méthylène, montrant l'insertion de l'hydrogel d'alginate ester dans la cavité lésionnelle.**

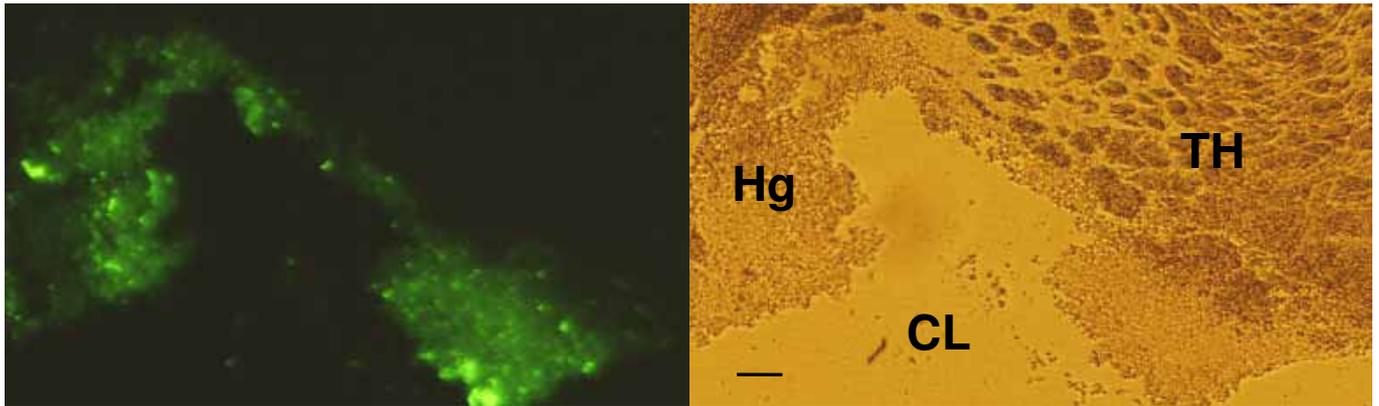


**Figure IV-7: Coupes longitudinales de cerveaux de rats, 6 semaines après lésion, en absence (A) et présence (B) d'un hydrogel dans la cavité lésionnelle(CL). Barre : 50  $\mu$ m.**

**I : Immunomarquage des neurofilaments phosphorylés. Noter l'aspect plus désorganisé des fibres en absence de l'hydrogel (A), et, à plus fort grossissement, la pénétration d'une fibre (flèche) dans l'hydrogel (B<sub>2</sub>).**

**II : Immunomarquage de la GFAP, montrant la présence de cellules gliales formant un cordon en bordure de la lésion. La flèche indique un fragment de tissu emprisonné dans l'hydrogel.**

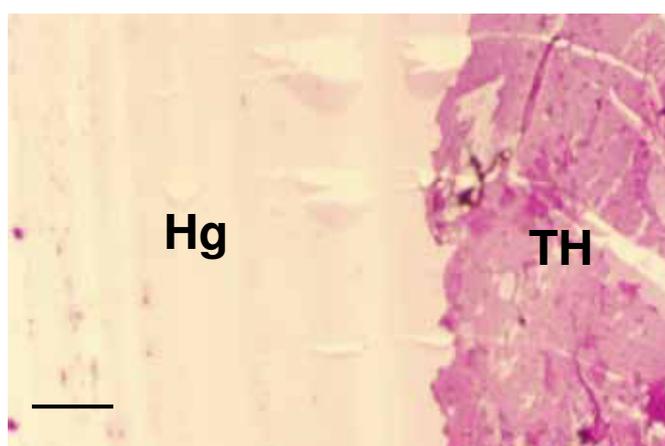




**Figure IV-8 : Coupe longitudinale d'un cerveau de rat, 1 mois après l'implantation d'un hydrogel marqué à la fluorescéine dans la cavité lésionnelle (CL). Observation en épifluorescence (à gauche) et en lumière transmise (à droite). Noter le contact étroit entre l'hydrogel (Hg) et le tissu hôte (TH). L'hydrogel ne remplit pas complètement l'ensemble de la cavité. Barre : 300  $\mu$ m.**

Protocole	Résultat
Fixation des tissus par immersion dans solution supplémentée en calcium 10 mM	Concluant
Immunocytochimie après fixation des tissus par immersion dans solution supplémentée en calcium 10 mM	Non concluant, la réaction est perturbée
Fixation des tissus par immersion dans solution supplémentée en calcium 5 mM	Concluant
Immunocytochimie après fixation des tissus par immersion dans solution supplémentée en calcium 5 mM	Concluant
Fixation des tissus par perfusion dans solution supplémentée en calcium 5 mM	Non concluant, difficulté de coupes au cryostat
Coloration des coupes au bleu de toluidine après prétraitement dans solution calcium 10 mM	Non concluant, la réaction est perturbée
Coloration des coupes au bleu de toluidine après prétraitement dans solution calcium 5 mM	Concluant mais la réaction est légèrement perturbée

**Tableau IV-1: Influence du calcium dans les protocoles morphologiques**



**Figure IV-9 : Coupe longitudinale d'un cerveau de rat, 2 semaines après l'implantation d'un hydrogel d'alginate fluorescent. Coloration de la coupe au bleu de toluidine après fixation de 5 minutes dans une solution de formaldéhyde, cacodylate et calcium 5 mM. Noter le marquage léger et uniforme de l'hydrogel (Hg).  
Barre : 100 µm; TH : tissu hôte**

### Activité locomotrice: période nocturne

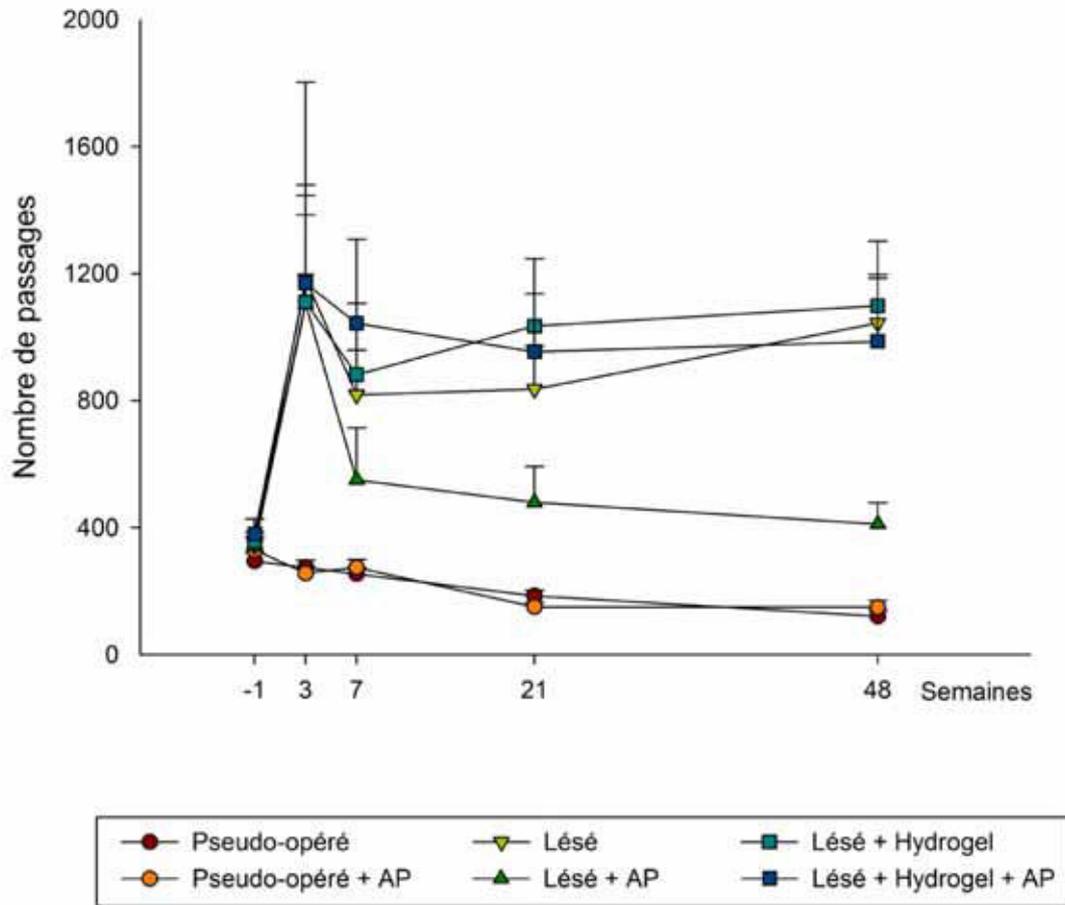


Figure IV-10 : Activité locomotrice en cage d'élevage

### Performance au test de la barre

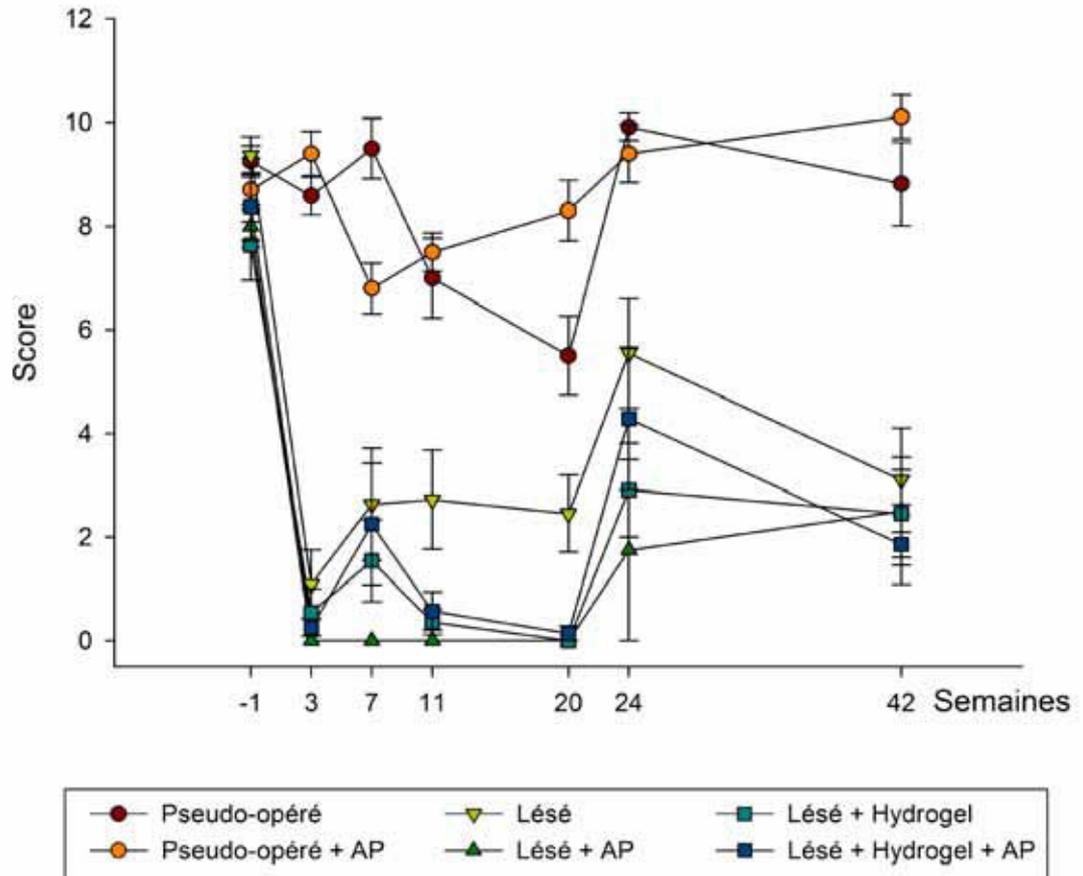


Figure IV-11 : Coordination sensorimotrice

Groupes d'animaux	Poids moyen en gramme	Erreur type
Témoins	595	8,4
Témoins AP	560	15,2
Lésés	430	5,2
Lésés AP	426	16,8
Lésés + hydrogel	442	8,8
Lésés + hydrogel + AP	421	12,2

Tableau IV-2: Moyenne des poids dans chaque groupe expérimental, 42 semaines après l'opération (poids moyen 1 semaine avant l'opération : 280 grammes)



### Piscine de Morris

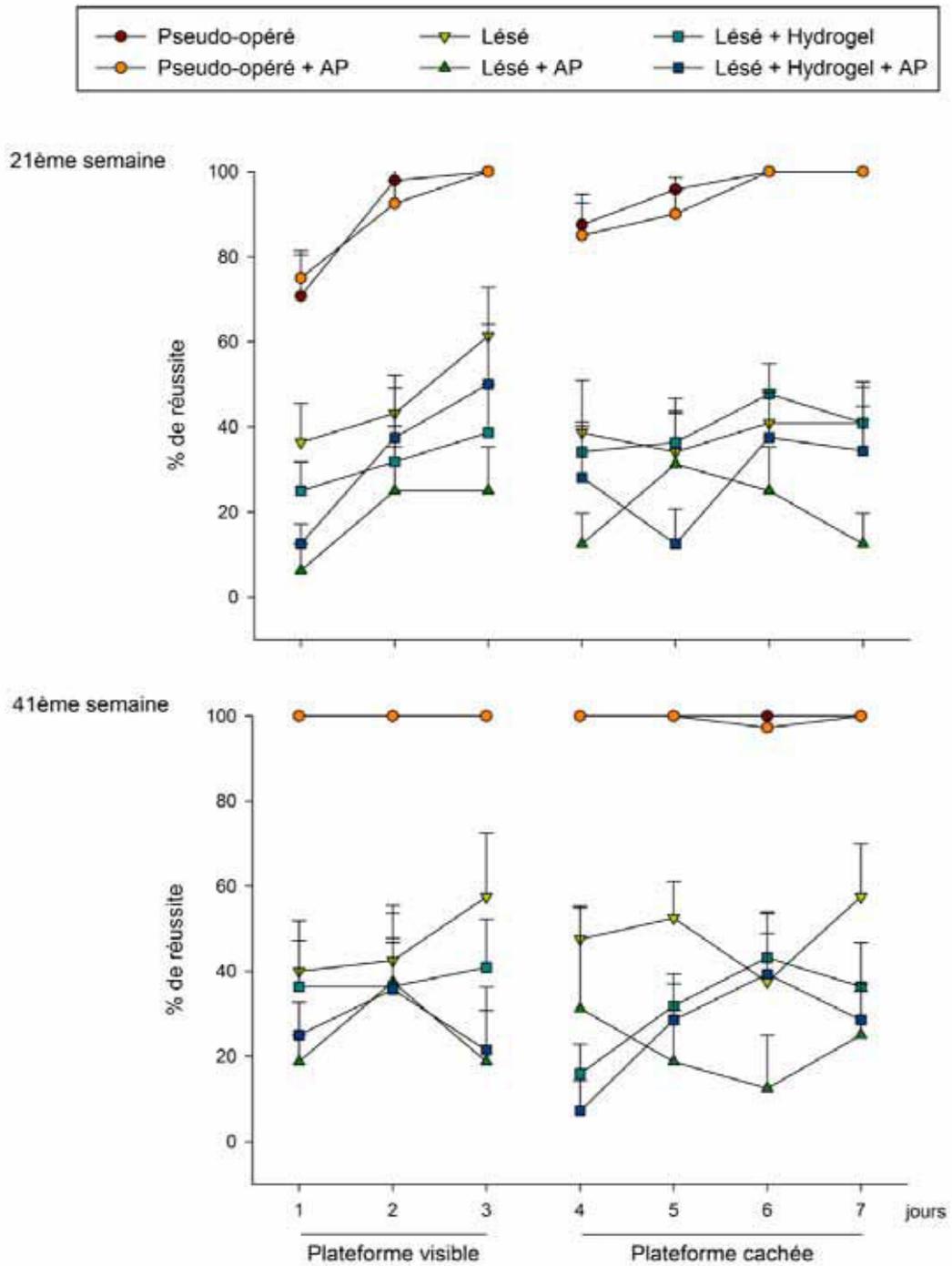
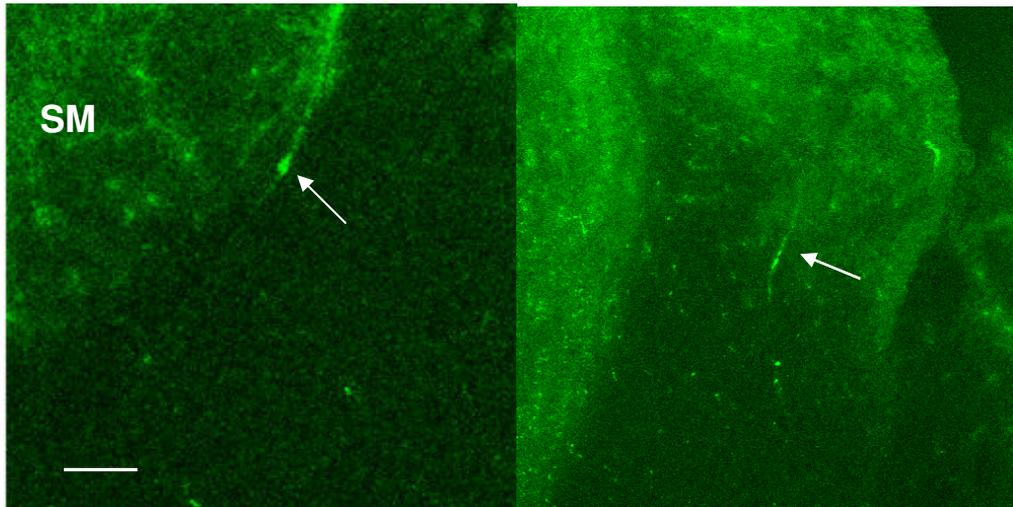
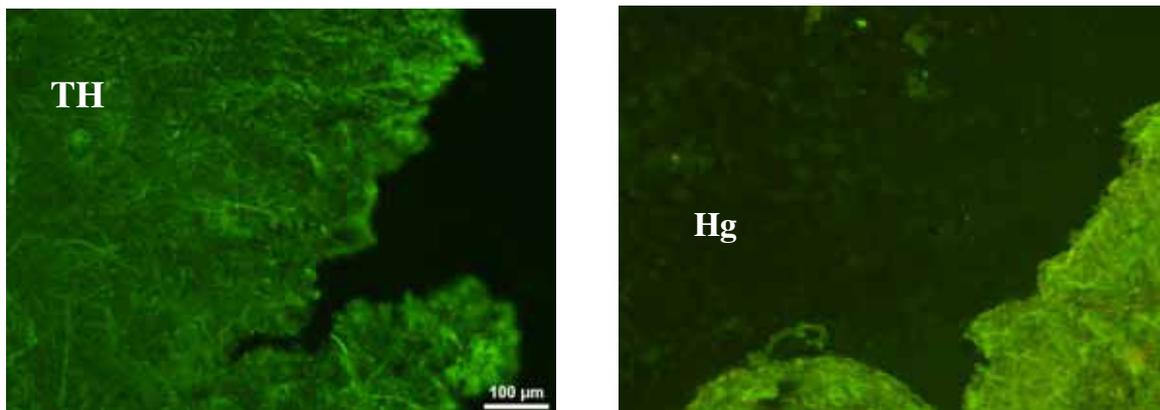


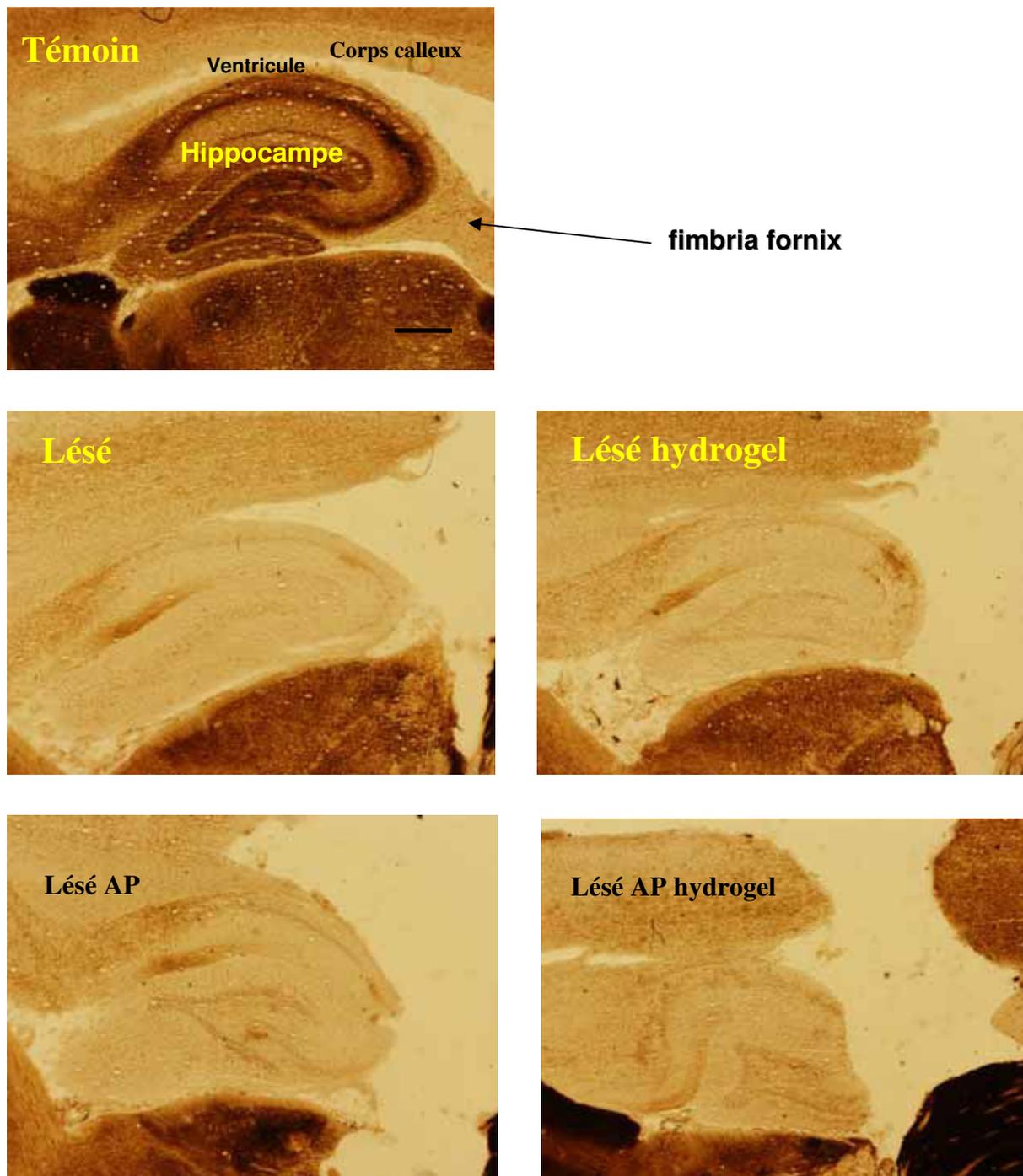
Figure IV-12 : Test de mémoire spatiale



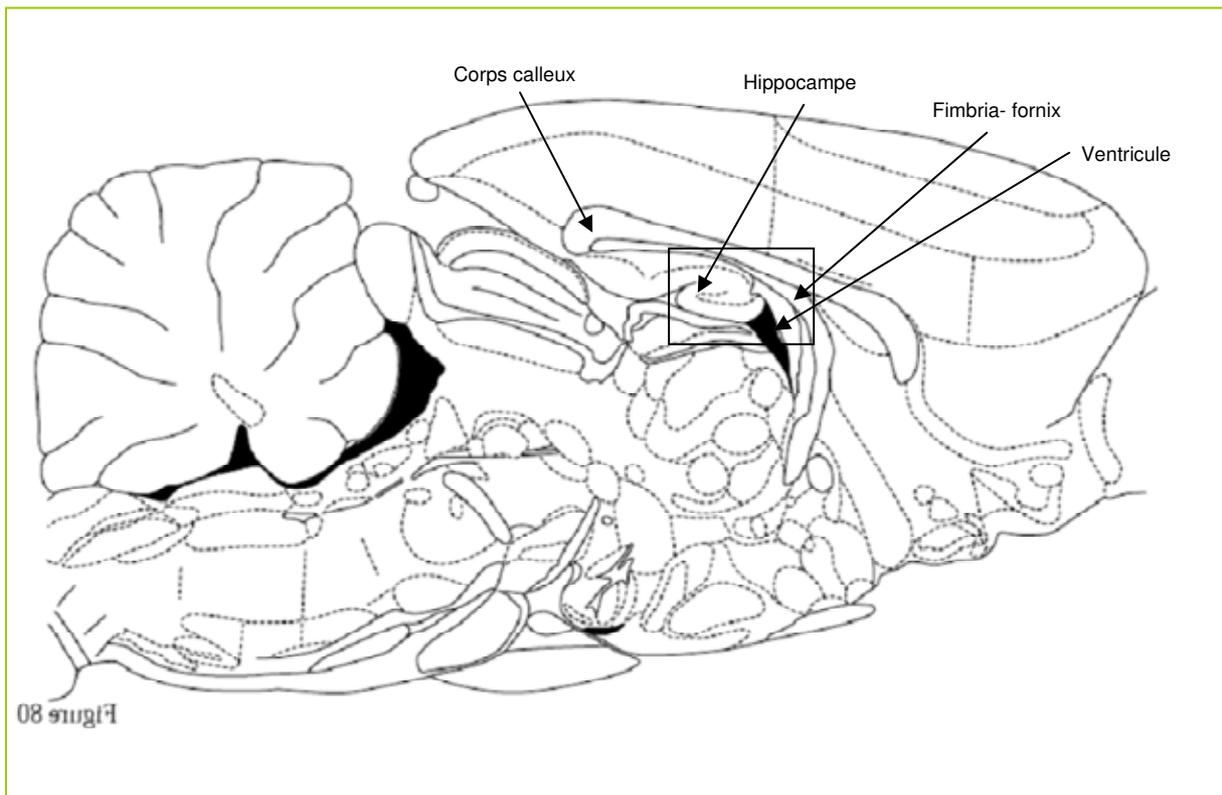
**Figure IV-13: Coupes sagittales au travers du septum médian (SM) d'un cerveau de rat témoin, observées au microscope confocal 4 jours après injection de fluorogold dans l'hippocampe. On peut noter, sur la photo de gauche, la présence (flèche) d'un neurone avec ses prolongements, et sur la photo de droite, la présence d'une fibre (flèche), marqués par transport rétrograde du traceur. Barre : 50  $\mu$ m.**



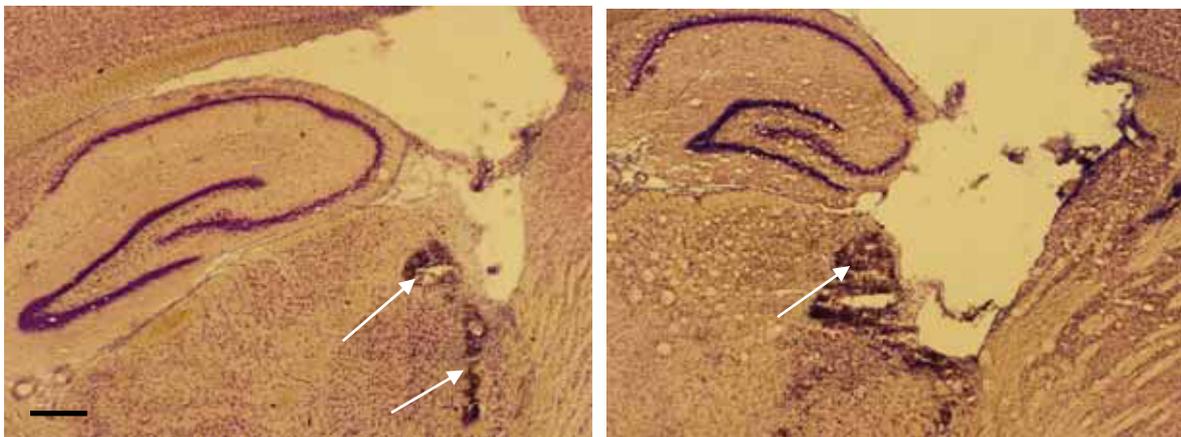
**Figure IV-14: Marquage immunocytochimique de la GFAP sur des coupes sagittales de cerveaux d'un rat lésé (gauche) et d'un rat lésé avec implantation d'un hydrogel d'alginate (droite), au stade de 1 an post-chirurgical. Noter la présence de cellules gliales marquées dans le tissu hôte (TH) et l'absence de cicatrice gliale marquée en bordure de la lésion. On peut noter l'absence de cellules gliales dans l'hydrogel (droite).**



**Figure IV-15a: Observation de coupes sagittales de cerveau, dans les différents groupes d'animaux, 11 mois post-chirurgicaux, après révélation de l'activité de l'AChE. Noter la disparition des fibres cholinergiques, dans l'hippocampe, chez tous les animaux lésés, ayant reçu ou non l'implantation d'un hydrogel et le traitement AP. Barre : 500  $\mu$ m.**



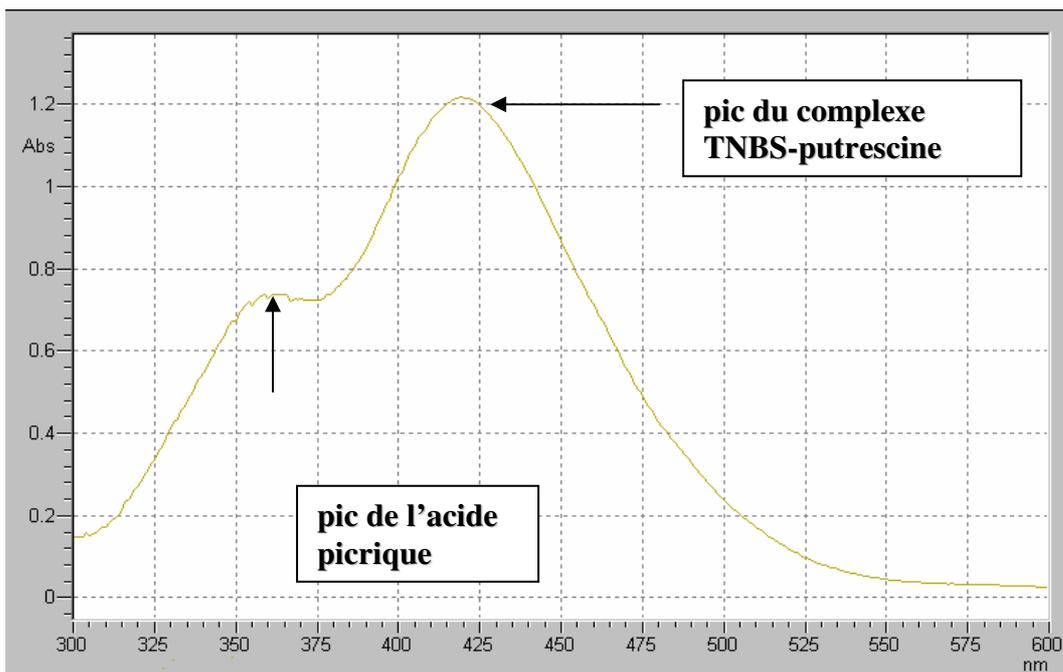
**Figure IV-15b: Coupe schématique sagittale d'un cerveau de rat  
(Atlas de Paxinos et Watson, latéralité 0,9mm)**



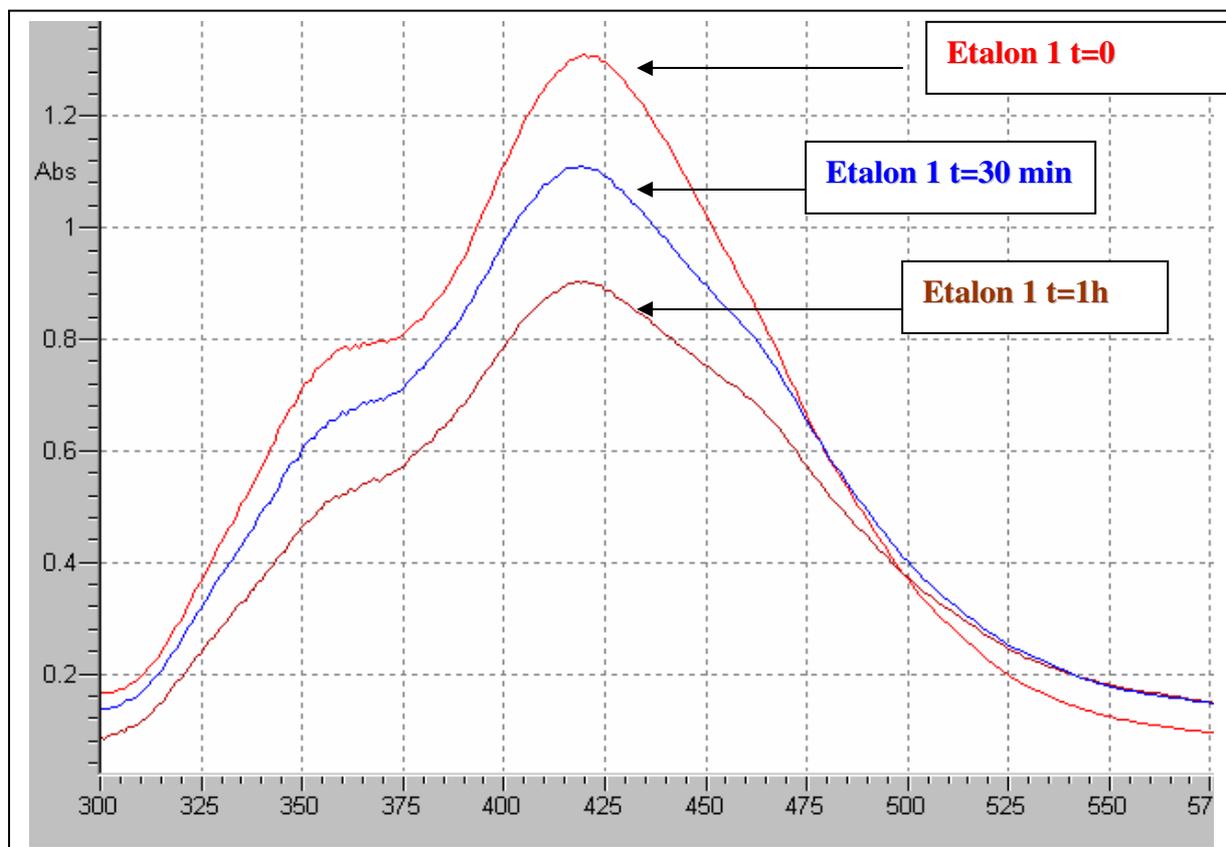
**Lésé**

**Lésé hydrogel**

**Figure IV-16 : Coloration au violet de crésyl de coupes sagittales de cerveau de rats lésés ayant reçu ou non de l'implantation d'un hydrogel d'alginate, 11 mois post-chirurgicaux. Noter la présence d'une nécrose dans le thalamus (flèches), liée à une dégénérescence secondaire post-lésionnelle. Barre : 100  $\mu$ m.**



**Figure IV-17: Spectre UV-Visible correspondant à la réaction entre la putrescine et l'acide trinitrobenzensulfonique (TNBS)**



**Figure IV-18: Evolution du spectre UV-Visible de la réaction putrescine-TNBS au cours du temps, pour une solution de concentration en amine de 0,024 mg/ml (étalon 1)**

Echantillon	Q <sup>a*</sup> en mg/ml d'hydrogel +/- 5 %	Q <sup>b*</sup> en mg/ml d'hydrogel +/- 50%
<b>Alginate natif</b>	Moyenne : 1,34 Ecart Type : 0	Moyenne : 1,41 Ecart Type : 0,16
<b>Alginamide 10-AA<sub>N</sub>-C<sub>12</sub></b>	Moyenne : 0,48 Ecart Type : 0,02	Moyenne : 0,49 Ecart Type : 0,20
<b>Alginate ester 10-AA-C<sub>12</sub></b>	Moyenne : 0,45 Ecart Type : 0	

\* : Q<sup>a</sup> : Capacité de saturation, en mg/ml d'hydrogel, avec 1,37 mg de putrescine (10% $\times$ Q<sub>th</sub>), soit 0,14 mg/ml

Q<sup>b</sup> : Capacité de saturation, en mg/ml d'hydrogel, avec 27,4 mg de putrescine (2 $\times$ Q<sub>th</sub>), soit 2,88 mg/ml

Capacité de saturation théorique en putrescine par ml d'hydrogel à 20 g/l :

- pour les alginates modifiés à 10% : 13,7 mg/ml
- pour l'alginate natif : 16,2 mg/ml

**Tableau IV-3 : Dosage par spectrométrie UV-Visible de la putrescine (chlorhydrate de putrescine) dans le surnageant à l'équilibre, après mise en contact d'un hydrogel d'alginamide 10-AA<sub>N</sub>-C<sub>12</sub>, d'alginate ester 10% et d'alginate natif avec une solution de NaCl, CaCl<sub>2</sub> et putrescine**

Echantillon	Q <sup>a*</sup> en mg/ml d'hydrogel +/- 5%	Q <sup>b*</sup> en mg/ml d'hydrogel +/- 50%
<b>Alginate natif</b>	Moyenne : 0,38 Ecart Type : 0,01	Moyenne : 0,89 Ecart Type : 0,16
<b>Alginamide 10-AA<sub>N</sub>-C<sub>12</sub></b>	Moyenne : 0,30 Ecart Type : 0,02	Moyenne : 0,66 Ecart Type : 0,32

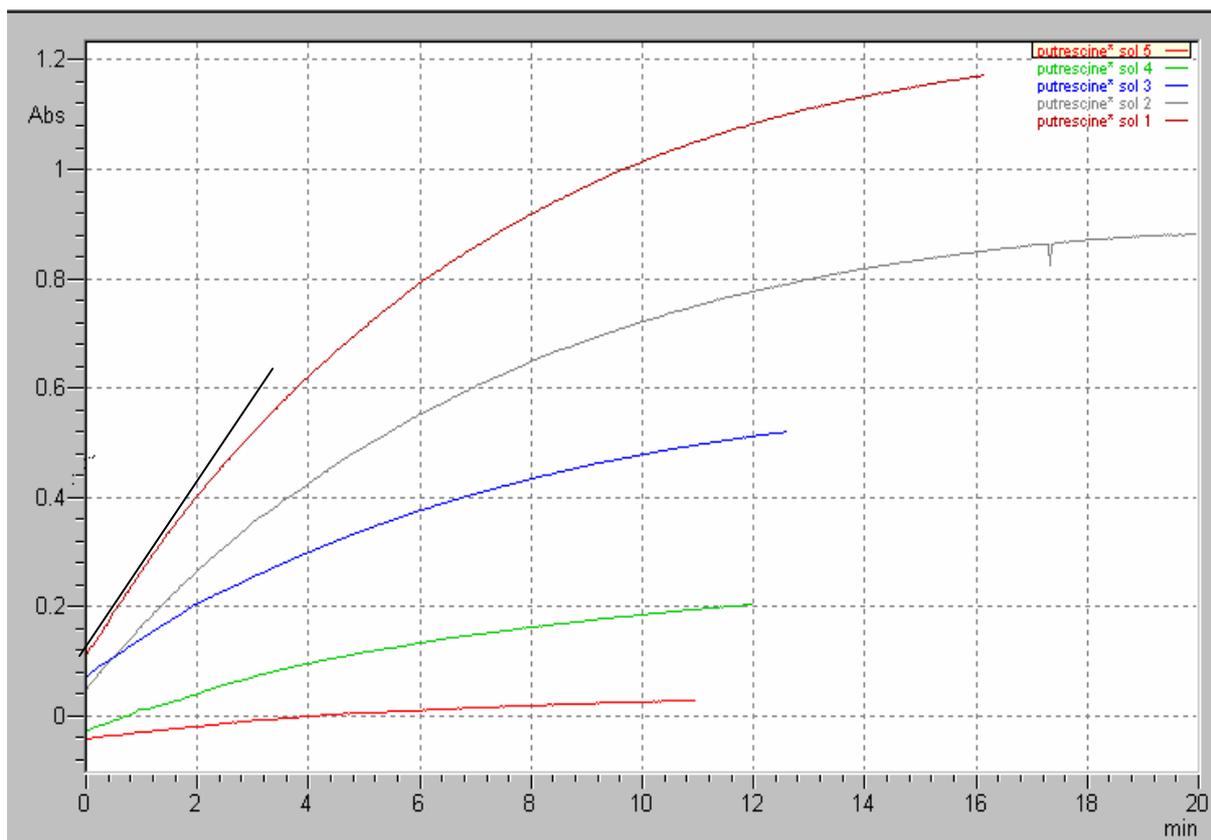
\* : Q<sup>a</sup> : Capacité de saturation, en mg/ml d'hydrogel, avec 0,94 mg d'aminoguanidine (10% $\times$ Q<sub>th</sub>), soit 0,09 mg/ml

Q<sup>b</sup> : Capacité de saturation, en mg/ml d'hydrogel, avec 18,74 mg d'aminoguanidine (2 $\times$ Q<sub>th</sub>), soit 1,97 mg/ml

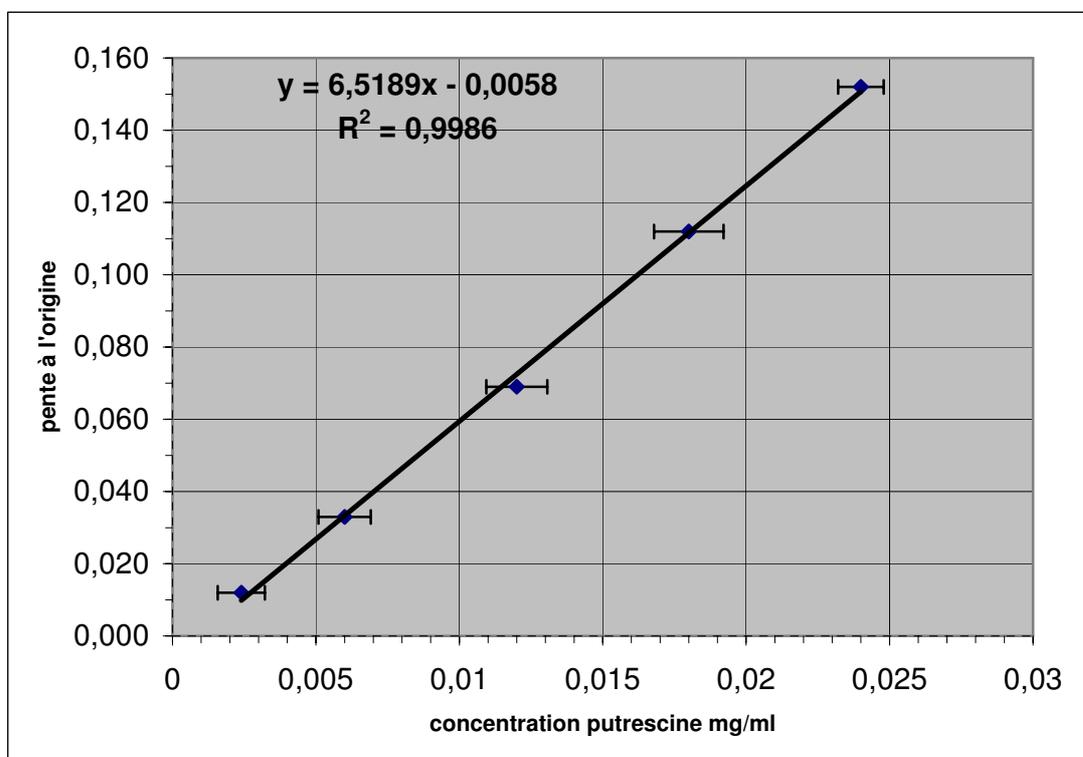
Capacité de saturation théorique en aminoguanidine par ml d'hydrogel à 20 g/l :

- pour les alginates modifiés à 10% : 9,37 mg/ml
- pour l'alginate natif : 11,16 mg/ml

**Tableau IV-4: Dosage par spectrométrie UV-Visible de l'aminoguanidine (chlorhydrate) dans le surnageant à l'équilibre, après mise en contact d'un hydrogel d'alginamide 10-AA<sub>N</sub>-C<sub>12</sub>, non hydrolysé et d'alginate natif avec une solution de NaCl, CaCl<sub>2</sub> et aminoguanidine**



**Figure IV-19: Cinétique de la réaction putrescine–TNBS, courbes représentant l’absorbance en fonction du temps  $A=f(t)$  pour les 5 solutions étalons**



**Figure IV-20 : Dosage par spectrométrie UV-Visible de la putrescine.**  
 Droite d'étalonnage :  $p = f(c)$  ; p : pente à l'origine de la courbe représentant l'évolution de l'absorbance en fonction du temps à 420 nm des solutions étalons  
 c: concentration en mg/ml de putrescine des solutions étalons

(a)



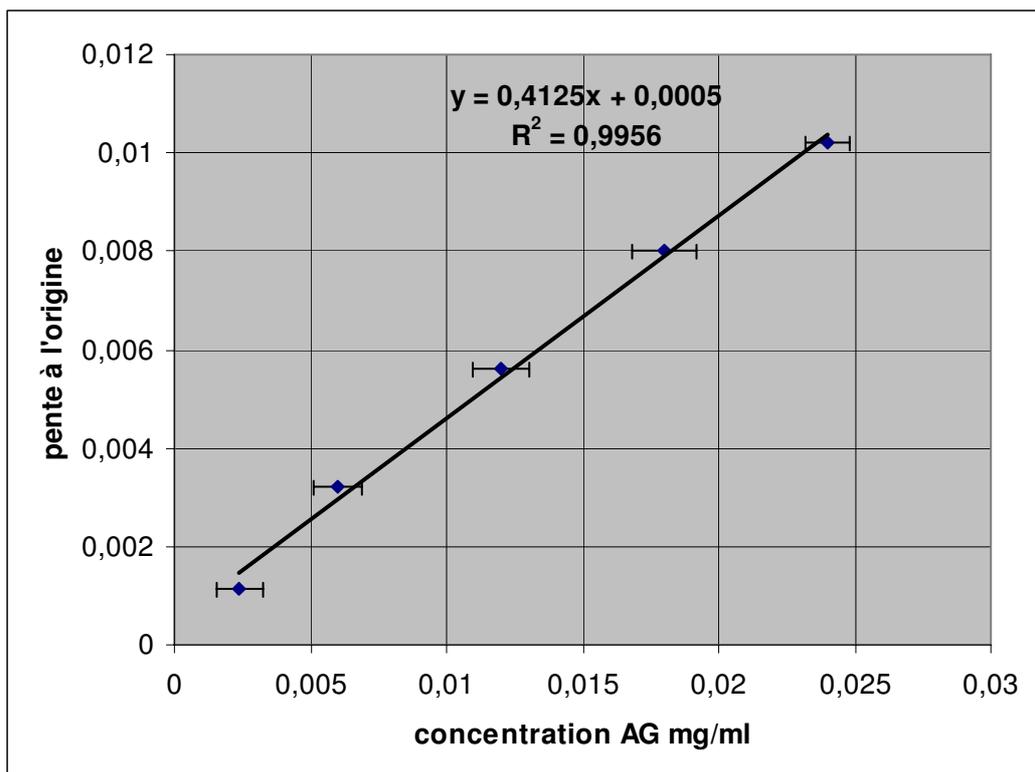
(b)



**Figure IV-21 : Aspect des hydrogels dans une solution de NaCl 0,15 M, CaCl<sub>2</sub> 1,4 mM, et putrescine 0,14 mg/ml**

**(a) alginate natif**

**(b) alginamide <sub>10-AA<sub>N</sub>-C<sub>12</sub></sub>**



**Figure IV-22 : Dosage par spectrométrie UV-Visible de l'aminoguanidine. Droite d'étalonnage :**

**p = f( c )**

**p : pente à l'origine de la courbe représentant l'évolution de l'absorbance en fonction du temps à 500 nm des solutions étalons**

**c : concentration en mg/ml d'aminoguanidine des solutions étalon**

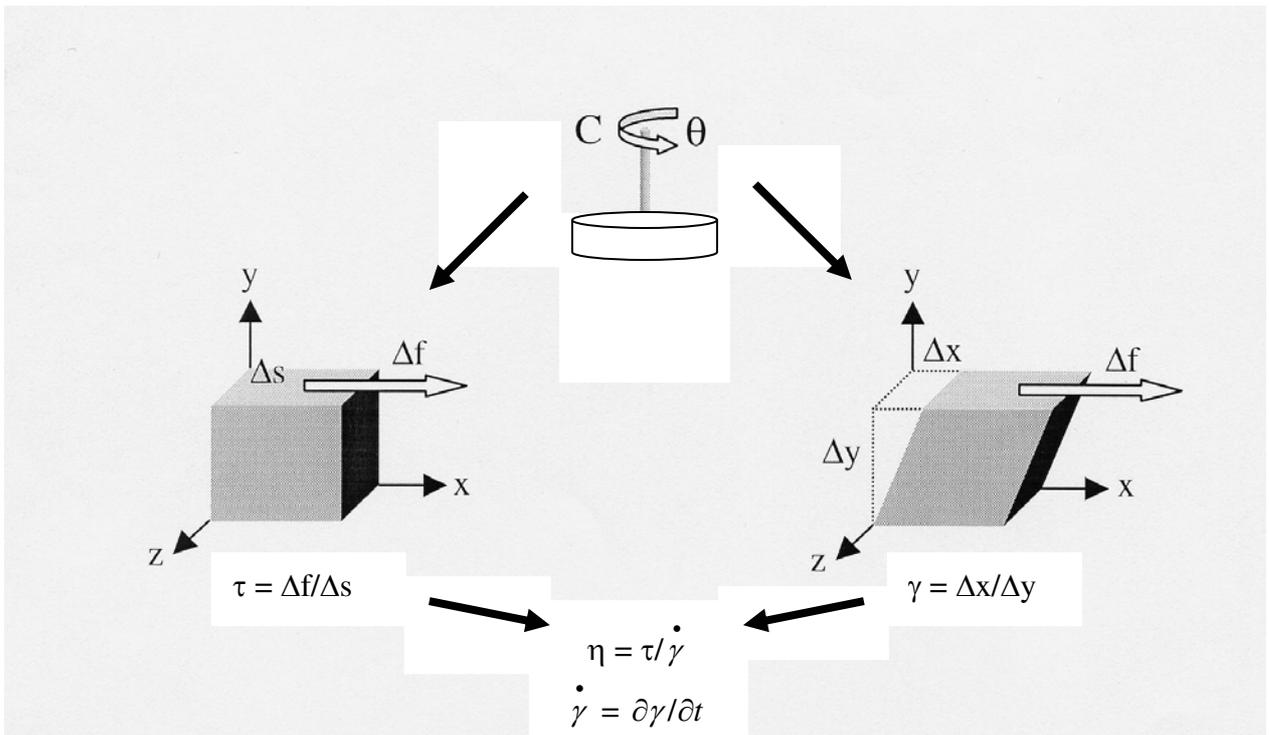


Figure A-1 : Principe des mesures rhéologiques en cisaillement simple

(C : couple ;  $\theta$  : déplacement angulaire ; échantillon de surface  $\Delta s$  et d'épaisseur  $\Delta y$  ;  $\Delta f$  : force appliquée sur l'échantillon ;  $\Delta x$  : déplacement de l'échantillon)

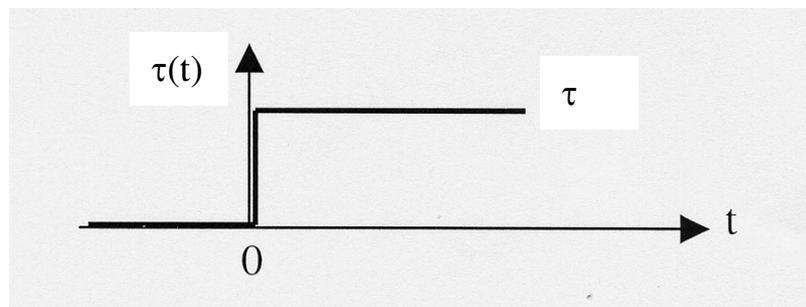


Figure A- 2 : Représentation graphique d'un échelon de contrainte

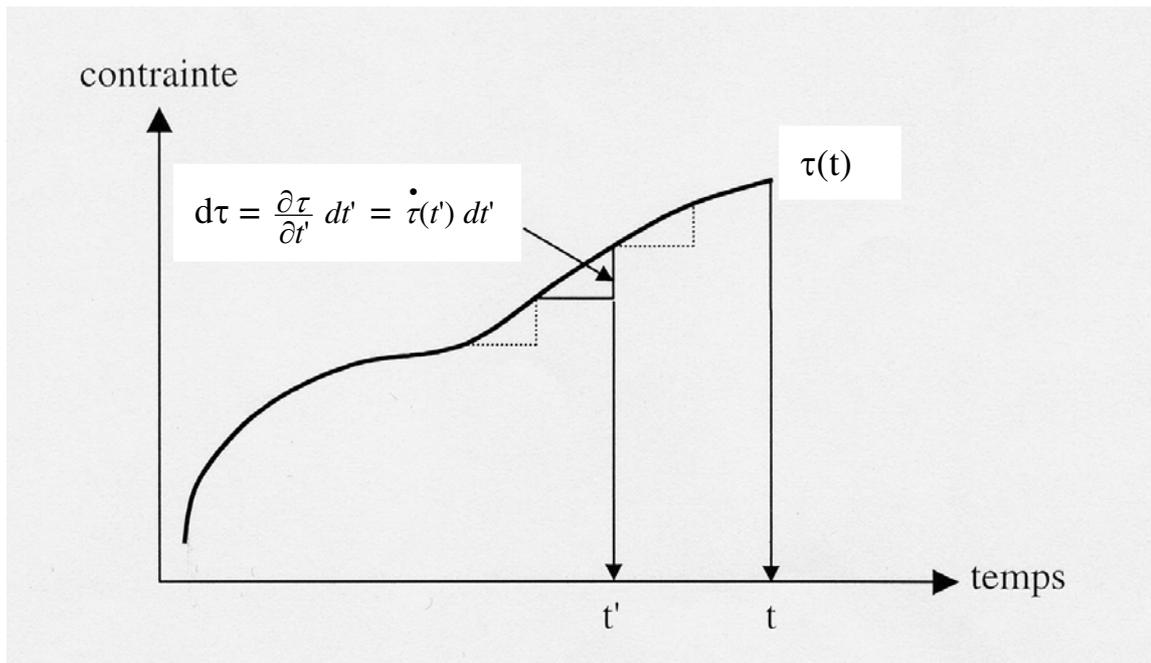


Figure A-3 : Représentation graphique de la décomposition en échelons de  $\tau(t)$

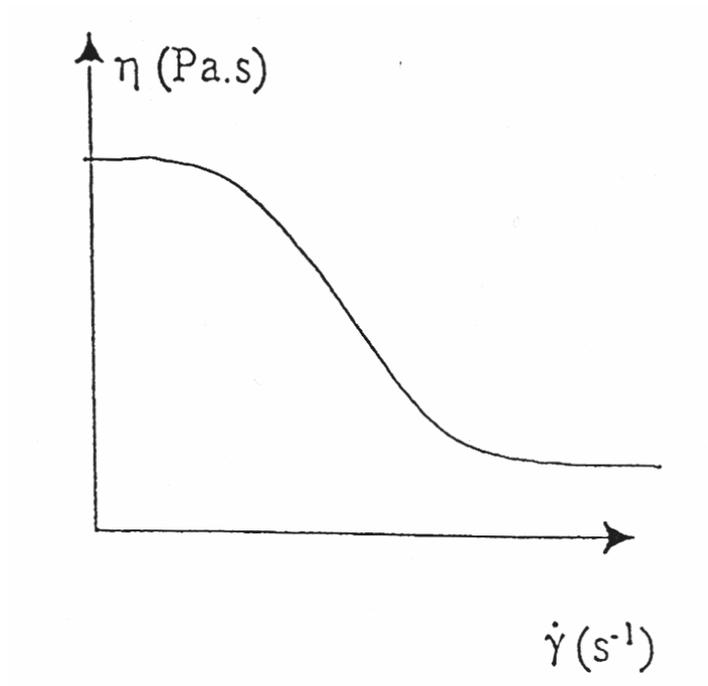


Figure A-4 : Courbe  $\eta$  vs  $\dot{\gamma}$  pour un fluide pseudoplastique ou rhéofluidifiant

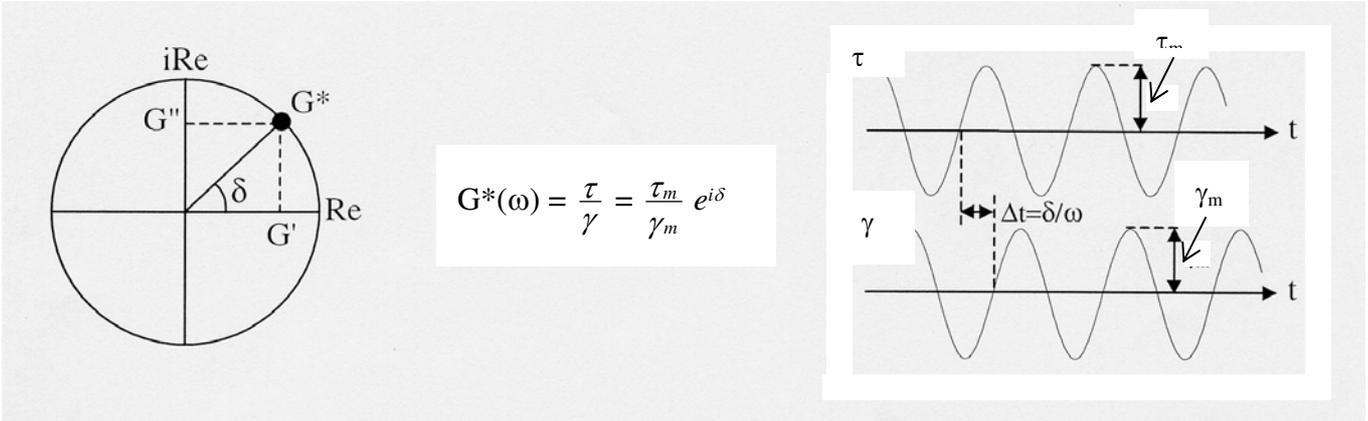


Figure A-5 : Principe des mesures expérimentales en régime oscillatoire

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE  
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL  
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

**Monsieur Jean-Christophe CASSEL, Directeur de Recherche, LN2C, Faculté de Psychologie et des Sciences de l'Education, Strasbourg**

**Monsieur Yves CHEVALIER, Directeur de Recherche, Université Claude Bernard Lyon 1, ESCPE, Villeurbanne**

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

**Monsieur VALLÉE Frédéric**

NANCY BRABOIS  
2, AVENUE DE LA  
FORET-DE-HAYE  
BOITE POSTALE 3  
F - 54501  
VANCEUVRE CEDEX

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,  
une thèse intitulée :

**"Synthèse et caractérisation d'un hydrogel d'alginate pour la régénération de voies nerveuses lésées au sein du Système Nerveux Central chez le rat"**

en vue de l'obtention du titre de :

**DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE**

**Spécialité : « Génie des procédés et des produits »**

Fait à Vandoeuvre, le 04 décembre 2007

Le Président de l'I.N.P.L.,

F. LAURENT



## Résumé

Ce travail avait pour objectif la synthèse d'hydrogels d'alginate stables dans le temps et leur évaluation comme support de régénération des voies nerveuses lésées du Système Nerveux Central.

Différents dérivés amphiphiles de l'alginate de sodium ont été préparés en fixant chimiquement des chaînes alkyles en C<sub>12</sub> à différents taux sur le squelette polymère par l'intermédiaire, soit de liaisons ester (alginate esters), soit de liaisons amide (alginamides) moins sensibles à l'hydrolyse.

Le comportement en solution des alginamides a été étudié en termes de stabilité dans le temps, de solubilité, de comportement rhéologique, et de taux de gonflement, puis comparé à celui des alginate esters. Les alginamides ont montré des propriétés en solution différentes de celles des alginate esters, en particulier des contraintes critiques faibles, qui sont les conséquences de la formation d'agrégats liée à l'existence d'une réaction secondaire de réticulation chimique lors de la synthèse. Néanmoins, à des concentrations et taux de greffage appropriés, il est possible d'obtenir un réseau polymère tridimensionnel stabilisé par des associations hydrophobes et pouvant servir de pont de régénération pour l'application visée.

L'étude *in vivo* conclut à l'absence de signe de régénération des voies nerveuses chez les animaux lésés sur une durée d'un an. Toutefois, cette étude a permis de valider la stratégie d'implantation d'un gel physique rhéofluidifiant et thixotrope, de définir des méthodes d'analyse des tissus post mortem en présence d'hydrogel, d'examiner la possibilité d'encapsuler un traitement pharmacologique et de définir un cahier des charges élargi de ce biomatériau (pH, stabilité, gonflement ...).

**Mot-clés:** *alginate, hydrogel, Système Nerveux Central, régénération des voies nerveuses lésées*

## Summary

The aim of this work was to synthesise alginate hydrogels, stable in time, and to evaluate their potential use as scaffolds for the damaged nerve regeneration in central nervous system.

Various amphiphilic derivatives of sodium alginate were prepared by covalent attachment of alkyl chains (12 carbons) onto the polysaccharide at different substitution ratio, either *via* ester (alginate ester) or amide (alginamide) linkages, these last ones being more stable toward hydrolysis.

The properties in solution of the alginamide derivatives were studied in terms of solubility, stability as function of time, rheological behaviour and swelling ratio. Results were compared to those obtained with the alginate ester family and highlighted a different behaviour for the alginamide series in semi-dilute regime. In particular, alginamide hydrogels exhibited a low critical strain which has been attributed to the presence of aggregates in the solution. The formation of these aggregates was due to the occurrence of a secondary cross-linking reaction during the synthesis of polymers. Nevertheless, it was possible, by appropriate tuning of the substitution yield and of the solution concentration, to obtain a three-dimensional network stabilized by intermolecular hydrophobic interactions, which has been evaluated as regenerative support for the considered application.

*In vivo* studies demonstrated the absence of nerve regeneration for the tested injured animals after one year. However, these studies allowed us to evaluate both the strategy for the implantation of a physical gel exhibiting a shear-thinning and thixotrope behavior and the possibility to encapsulate a pharmacological treatment. An enlarged project specification has also been defined for this biomaterial (pH, stability, swelling ratio...).

**Keywords:** *alginate, hydrogel, Central Nervous System, regeneration of injured nerves.*