

Glyco-nanostructures formulées *via* auto-assemblage induit par photo-polymérisation RAFT en dispersion aqueuse

Sous la codirection du Pr. Jean-Luc SIX et du Dr. Khalid FERJI, au Laboratoire de Chimie-Physique Macromoléculaire (LCPM – UMR 7375 Université de Lorraine-CNRS), 54000 Nancy.

1. Introduction :

Les nano-objets polymères obtenus par auto-assemblage de copolymères amphiphiles intéressent les chercheurs en nanomédecine qui envisagent de les employer comme systèmes de délivrance de médicaments (SDMs). Les objets de morphologie vésiculaire, nommés polymersomes, sont particulièrement attractifs car leur morphologie compartimentale permet d'encapsuler simultanément des principes actifs hydrophiles et hydrophobes.¹ Les glycopolymères amphiphiles (GPAs), copolymères amphiphiles associant polysaccharide hydrophile et polymère hydrophobe, sont des candidats potentiels pour produire ces SDMs, compte tenu de la biocompatibilité, de la biodégradabilité et de la non-toxicité des polysaccharides. Cependant, les travaux de recherches portant sur l'auto-assemblage des GPAs *via* des stratégies multi-étapes décrivent principalement la formulation de nanostructures aux morphologies simples (micelles sphériques ou nanoparticules cœur/couronne), freinant le développement de ces SDMs.¹

Afin de contourner cette problématique et de formuler des nano-objets à base de GPAs aux morphologies avancées et variées, une méthodologie émergente nommée PISA (auto-assemblage induit par polymérisation) a été employée dans le cadre de ce doctorat pour produire, en une seule étape, une suspension de glyco-nanostructures (GNSs, nano-objets composés de GPAs auto-assemblés). Ce procédé est ici basé sur la polymérisation d'un monomère hydrosoluble (méthacrylate de 2-hydroxypropyle, HPMA), formant un polymère hydrophobe à partir d'une conversion critique, à partir d'un stabilisant hydrosoluble dérivé du dextrane et porteur de multiples groupements agent de transfert (DexCTA). La polymérisation radicalaire contrôlée par transfert de chaîne réversible par addition-fragmentation a été amorcée sous irradiation visible (photo-RAFT) afin de faire croître les greffons hydrophobes PHPMA à partir du DexCTA et ainsi de synthétiser des Dex-g^N-PHPMA_x, où N et X sont respectivement le nombre de greffons et le degré de polymérisation moyen de chaque greffon PHPMA. Au fur et à mesure de l'allongement de ces greffons, les glycopolymères deviennent amphiphiles et s'auto-organisent *in-situ* pour former alors des GNSs (figure 1).

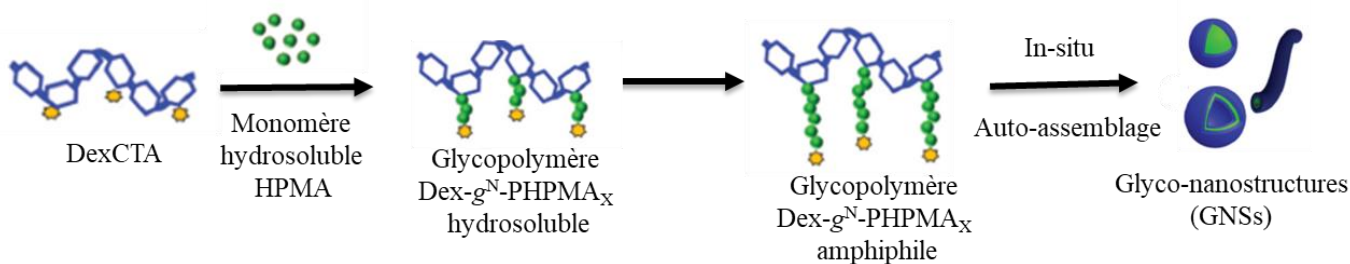


Figure 1 : Représentation schématique de la méthodologie PISA en dispersion aqueuse ; appliquée aux GPAs¹.

2. Synthèse de agents de transfert macromoléculaires (DexCTAs)

La première problématique de ce doctorat concernait la synthèse d'agents de transfert macromoléculaires dérivés du dextrane (DexCTAs) de manière contrôlée et reproductible. En effet, compte tenu des précédents travaux du LCPM, la synthèse des DexCTAs était difficile et non reproductible. Pour lever ce verrou, une stratégie de synthèse multi-étapes a été développée pour faire varier les taux de fonctionnalisation des DexCTAs.²

- La 1^{ère} étape consiste à oxyder partiellement des fonctions hydroxyle du dextrane par le périodate de sodium. L'oxydation induit alors une ouverture partielle des cycles glucopyranosiques et l'apparition de fonctions aldéhyde. Le dérivé obtenu est nommé DexA_x.

- Dans la 2^{ème} étape, les fonctions aldéhyde du DexA_x ont été modifiées par l'éthylène diamine *via* une amination réductrice. Le produit obtenu porte des amines et est nommé DexN_y.
- Enfin, les fonctions amine primaires du DexN_y subissent une amidification par un trithiocarbonate doté d'une fonction acide carboxylique activée. Les macroagents RAFT obtenus sont nommés DexCTA_z.

3. Effet des conditions opératoires sur la morphologie des nano-objets

L'effet de la température et de la méthode d'auto-assemblage des GPAs sur la morphologie des nano-objets produits a été démontré. Le DexCTA₁₂, contenant 12 groupes CTAs par chaîne de dextrane, a été employé pour polymériser le HPMA *via* le procédé PISA en dispersion aqueuse. Dans des conditions typiques ($\overline{Xn}$ de chaque greffon PHPMA égal à 400, concentration en solide égale à 10 %), la photo-RAFT PISA menée à 405 nm et à température ambiante conduit à l'élaboration de Dex-*g*¹²-PHPMA₄₀₀ qui s'organisent *in situ* en nano-objets de morphologie cylindrique à conversion totale.³ Lorsque le même procédé est mené à 60°C, toutes conditions égales par ailleurs, seules des nanosphères sont formulées. La nanoprecipitation des Dex-*g*¹²-PHPMA₄₀₀ (produits par photo-RAFT PISA à température ambiante, lyophilisés puis redissous dans le DMSO) conduit également à l'élaboration de nanosphères.³ Enfin, les méthodes « émulsion/évaporation de solvant » et « réhydratation de film » se sont révélées infructueuses, et seul un précipité blanc de GPAs est obtenu. La suspension des nano-cylindres obtenus par photo-RAFT PISA à température ambiante s'est avérée stable pendant plusieurs mois de stockage à température ambiante. Cependant, lorsque la température de stockage atteint 60°C, une transition irréversible est observée : les nanocylindres évoluent vers des nanosphères.³

4. Diagramme de phase de morphologies

La morphologie des GNs de Dex-*g*¹²-PHPMA_x dépend de la taille des greffons PHPMA (X) et de la concentration du copolymère final. Un diagramme de phase de morphologies a alors été construit, pour la première fois dans le cas des glyco-nanostructures. Ce diagramme (figure 2) regroupe les domaines d'existence de morphologies variées, des sphères aux vésicules.⁴ De façon particulièrement intéressante, des vésicules peuvent être produites dans un large domaine de concentration en solide et de longueur de greffons PHPMA. Dans cette zone de morphologie vésiculaire, l'épaisseur de la membrane des vésicules peut être modulée en variant la taille des greffons PHPMA pour une concentration donnée en solide. Le diamètre moyen des vésicules varie quant à lui avec la concentration en solide, à longueur fixée des greffons PHPMA.⁴

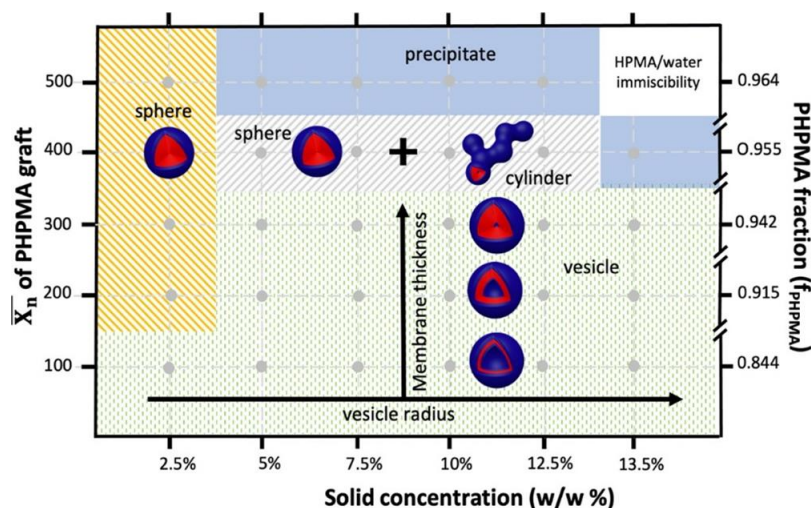


Figure 2: Diagramme de phase des morphologies des glyco-nanostructures à base de Dex-*g*¹²-PHPMA_x, élaborées par photo-RAFT PISA sous irradiation lumineuse (405 nm) à 20°C.⁴

Pour la première fois, deux études cinétiques ont été réalisées durant le procédé PISA pour comprendre l'évolution *in situ* des morphologies de GNSs produites, depuis le milieu aqueux homogène initial jusqu'à la suspension finale à conversion totale, et ainsi le mécanisme de formation des nano-objets vésiculaires (glyco-vésicules, 1^{ère} étude) et des précipités (2^{nde} étude) présents sur le diagramme de phase des morphologies (figure 2).

Une première étude a été menée à une concentration en solide de 7.5% et un $\overline{Xn}$ de chaque greffon PHPMA égal à 100 a été visé à conversion totale. Dès les premiers instants de l'auto-organisation des Dex-*g*-PHPMA amphiphiles produits (3,5 minutes de polymérisation, conversion 36%), des micelles sphériques sont observées (figure 3), lesquelles évoluent

progressivement avec la conversion vers des structures intermédiaires : micelles cylindriques, puis nano-objets de morphologie médusaire (Jellyfish), qui est la morphologie clé dans la transition ultime vers la morphologie vésiculaire finale.⁵

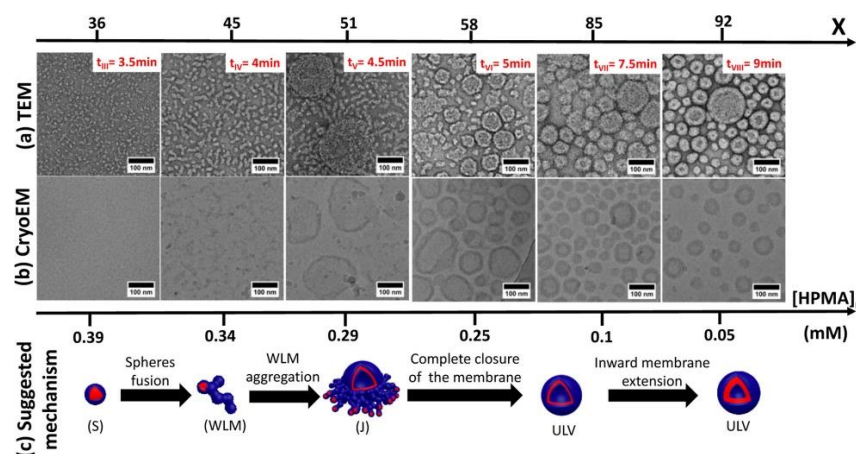


Figure 3 : Evolution des morphologies des glyco-nanostructures produites au cours de procédé photo RAFT PISA du HPMA à partir du DexCTA₁₂ dans lequel une concentration en solide de 7.5 et un Xn de chaque greffon PHMPA égal 100 ont été visées.

a) images TEM

b) images CryoEM

c) mécanisme d'évolution de morphologie proposés.⁵

La seconde étude, toujours menée à une concentration en solide de 7.5%, mais en visant un $\overline{Xn}$ de chaque greffon PHPMA égal à 500 à conversion totale, a révélée quant à elle la formation d'une morphologie intermédiaire dite « vésicule multi-cœurs » (figure 4) dès les premiers instants de l'auto-assemblage des Dex-*g*-PHPMA amphiphiles (5 minutes de polymérisation, conversion 21%). La polymérisation se poursuivant, ces vésicules multi-cœurs fusionnent pour former des nano-objets allongés (11 minutes de polymérisation, conversion 74%). Au-delà de cette conversion, la fusion des nano-objets allongés conduit à un précipité. La formation des vésicules multi-cœurs intermédiaire est expliquée par la séparation de phase locale entre le dextrane et le monomère HPMA résiduel ([HPMA]_r) dans le milieu réactionnel.

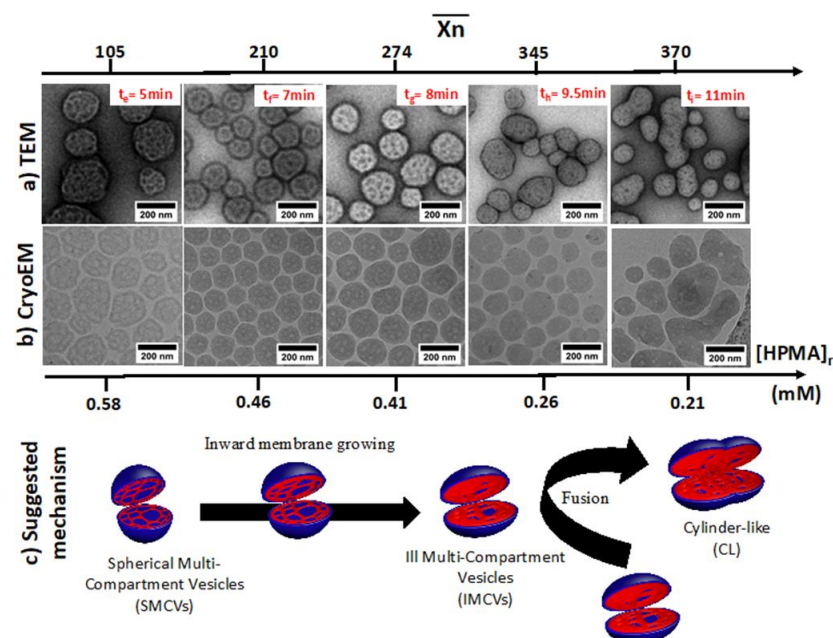


Figure 4 : Evolution des morphologies des glyco-nanostructures produites au cours de procédé photo RAFT PISA du HPMA à partir du DexCTA₁₂ dans lequel une concentration en solide de 7.5 et un Xn de chaque greffon PHMPA égal 500 ont été visées.

a) images TEM

b) images CryoEM

c) mécanisme d'évolution de morphologie proposés.⁵

5. Utilisation potentielle en nanomédecine

Le potentiel des glyco-vésicules produites pour une utilisation dans le domaine de la nanomédecine a été évalué en menant plusieurs études préliminaires. Premièrement, la stabilité de ces vésicules produites dans l'eau pure a été étudiée

en redispersant ces glyco-vésicules dans des environnements hypertoniques (solutions aqueuses concentrées en sel et milieux de culture cellulaires (milieux RPMI et DMEM)). La figure 5 montre l'exemple des glyco-vésicules redispersées dans une solution aqueuse de NaCl. Ces vésicules ont montré une forte stabilité dans ces milieux hypertoniques. Dans un deuxième temps, l'incubation de macrophages pendant 48h en présence de Dex-*g*-PHPMA, qui constituent lesdites glyco-vésicules, n'a révélé aucun effet cytotoxique. Enfin, comme ultime preuve de concept, les glyco-vésicules ont été chargées *in situ* avec de la BSA-FITC, directement pendant le procédé photo-RAFT PISA, montrant la capacité de ce procédé et de ces vésicules à encapsuler des principes actifs.

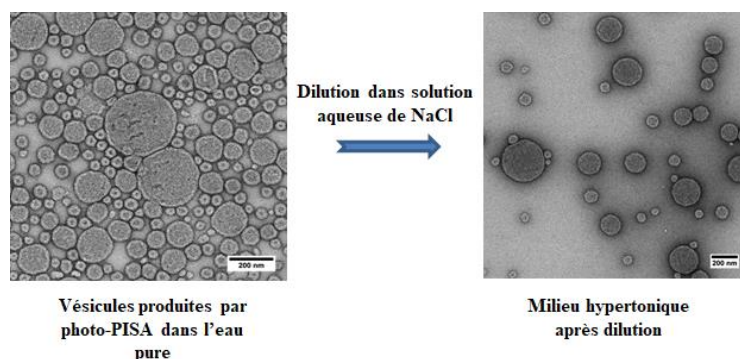


Figure 5 : Stabilité des vésicules dans des milieux hypertoniques.

6. Conclusion

En conclusion et en utilisant un système modèle Dex-*g*-PHPMA, ces travaux de thèse ont démontré le potentiel du procédé PISA en dispersion aqueuse à produire des glyco-nanostructures de morphologies avancées (cylindres, vésicules unilamellaires et vésicules multi-cœurs). Ces travaux constituent le fondement pour de nouvelles perspectives de recherche, à l'interface de l'auto-assemblage des copolymères amphiphiles et de la nanomédecine.

Les résultats obtenus dans le cadre de ce doctorat ont été valorisés à travers plusieurs conférences orales et de 4 publications déjà publiées dans des revues internationales à comité de lecture.

7. Remerciements

Ce doctorat a été financé par l'Agence Nationale de la Recherche, dans le cadre du projet ANR JCJC GlyNanEP (Elaboration de glyco-nanoobjets via un procédé respectueux de l'environnement) porté par Dr. Khalid FERJI.

8. Références

1. Six, J.-L., Ferji, K., Polymerization induced self-assembly: an opportunity toward the self-assembly of polysaccharide-containing copolymers into high-order morphologies. *Polymer Chemistry* 2019, 10(1), 45-53.
2. Ikkene, D., Arteni, A.A., Song, H., Laroui, H., Six, J.-L., Ferji, K., Synthesis of dextran-based chain transfer agent for RAFT-mediated polymerization and glyco-nanoobjects formulation. *Carbohydrate Polymers* 2020, 234, 115943.
3. Ikkene, D., Arteni, A.A., Ouldali, M., Six, J.-L., Ferji, K., Self-assembly of amphiphilic copolymers containing polysaccharide: PISA versus nanoprecipitation, and the temperature effect. *Polymer Chemistry* 2020, 11(29), 4729-4740.
4. Ikkene, D., Arteni, A.A., Ouldali, M., Francius, G., Brûlet, A., Six, J.-L., Ferji, K., Direct Access to Polysaccharide-Based Vesicles with a Tunable Membrane Thickness in a Large Concentration Window via Polymerization-Induced Self-Assembly. *Biomacromolecules* 2021, 22, 3128-3137.
5. Ikkene, D., Arteni, A.A., Boulogne, C., Six, J.-L., Ferji, K., Multicompartment Vesicles: A Key Intermediate Structure in Polymerization-Induced Self-Assembly of Graft Copolymers. *Macromolecules* 2022, 11, 4268-4275.