

## **Faculté de Pharmacie**

Année 2019

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

le 20 décembre 2019

Par ROBIN Baptiste

Né(e) le 27 mai 1994 à Limoges

**Préparation microfluidique de microgels de poly(éthylène glycol)  
bis-silylé en vue de la microencapsulation de protéines  
thérapeutiques**

Thèse dirigée par Pr Marylène VIANA et Dr Corine TOURNE-PETEILH

Examineurs :

Pr Serge BATTU  
Pr Marylène VIANA  
Dr Corine TOURNE-PETEILH  
Dr Betty LAVERDET

Président  
Directrice  
Co-directrice  
Juge





**Faculté de Pharmacie**

Année 2019

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

le 20 décembre 2019

Par ROBIN Baptiste

Né(e) le 27 mai 1994 à Limoges

**Préparation microfluidique de microgels de poly(éthylène glycol)  
bis-silylé en vue de la microencapsulation de protéines  
thérapeutiques**

Thèse dirigée par Pr Marylène VIANA et Dr Corine TOURNE-PETEILH

Examineurs :

Pr Serge BATTU  
Pr Marylène VIANA  
Dr Corine TOURNE-PETEILH  
Dr Betty LAVERDET

Président  
Directrice  
Co-directrice  
Juge



## Liste des enseignants

---

Le 1<sup>er</sup> septembre 2019

### **PROFESSEURS :**

<b>BATTU</b> Serge	CHIMIE ANALYTIQUE
<b>CARDOT</b> Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
<b>DESMOULIERE</b> Alexis	PHYSIOLOGIE
<b>DUROUX</b> Jean-Luc	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
<b>FAGNERE</b> Catherine	CHIMIE THERAPEUTIQUE - CHIMIE ORGANIQUE
<b>LIAGRE</b> Bertrand	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
<b>MAMBU</b> Lengo	PHARMACOGNOSIE
<b>ROUSSEAU</b> Annick	BIOSTATISTIQUE
<b>TROUILLAS</b> Patrick	CHIMIE PHYSIQUE - PHYSIQUE
<b>VIANA</b> Marylène	PHARMACOTECHNIE

### **PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :**

<b>PICARD</b> Nicolas	PHARMACOLOGIE
<b>ROGEZ</b> Sylvie	BACTERIOLOGIE ET VIROLOGIE
<b>SAINT-MARCOUX</b> Franck	TOXICOLOGIE

### **ASSISTANT HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :**

<b>CHAUZEIX</b> Jasmine	HÉMATOLOGIE (du 01.11.2018 au 31.10.2019)
<b>JOST</b> Jérémy	PHARMACIE CLINIQUE (du 01.11.2018 au 31.10.2019)

### **MAITRES DE CONFERENCES :**

<b>BASLY</b> Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
<b>BEAUBRUN-GIRY</b> Karine	PHARMACOTECHNIE

<b>BÉGAUD</b> Gaëlle	CHIMIE ANALYTIQUE ET CONTRÔLE DU MÉDICAMENT
<b>BILLET</b> Fabrice	PHYSIOLOGIE
<b>CALLISTE</b> Claude	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
<b>CLÉDAT</b> Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
<b>COMBY</b> Francis	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
<b>COURTIOUX</b> Bertrand	PHARMACOLOGIE, PARASITOLOGIE
<b>DELEBASSÉE</b> Sylvie	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
<b>DEMIOT</b> Claire-Elise	PHARMACOLOGIE
<b>FABRE</b> Gabin	SCIENCES PHYSICO-CHIMIQUES ET INGÉNIERIE APPLIQUÉE
<b>FROISSARD</b> Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
<b>JAMBUT</b> Anne-Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
<b>LABROUSSE</b> Pascal	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
<b>LAVERDET-POUCH</b> Betty	PHARMACIE GALÉNIQUE
<b>LEGER</b> David	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
<b>MARION-THORE</b> Sandrine	CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE (jusqu'au 31.01.2019)
<b>MARRE-FOURNIER</b> Françoise	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
<b>MERCIER</b> Aurélien	PARASITOLOGIE
<b>MILLOT</b> Marion	PHARMACOGNOSIE
<b>MOREAU</b> Jeanne	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
<b>PASCAUD-MATHIEU</b> Patricia	PHARMACIE GALÉNIQUE – BIOMATÉRIAUX CERAMIQUES
<b>POUGET</b> Christelle	CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE
<b>VIGNOLES</b> Philippe	BIOPHYSIQUE, BIOMATHÉMATIQUES ET INFORMATIQUE

**ATTACHE TEMPORAIRE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE :**

**BOUDOT** Clotilde

MICROBIOLOGIE  
(du 01/09/2018 au 31/08/2020)

**MARCHAND** Guillaume

(du 01/09/2019 au 31/08/2020)

**PROFESSEURS EMERITES :**

**DREYFUSS** Gilles (jusqu'au 31/03/2020)

## Remerciements

---

Cette thèse d'exercice est l'aboutissement de six années d'études, qui firent de moi un Pharmacien. Mais pas seulement... Car à présent qu'il m'est donné l'opportunité d'officier loin de nos vertes contrées, je comprends à quel point je suis un Pharmacien « de Limoges ». La qualité des enseignements dispensés dans cette faculté, la proximité des enseignants, les petites promotions, les nombreux travaux pratiques, ... Tout cela fait la qualité de la formation limougeaude, et je veux remercier l'ensemble des enseignants pour l'héritage pharmaceutique qu'ils nous transmettent. Venir de la faculté de Limoges est pour moi un atout, que je défends chaque jour avec plus d'aplomb.

En particulier, je veux remercier les enseignants membres du jury : Mme Viana, M. Battu et Mme Laverdet.

Mme Viana, il me faut commencer par vous, car il est probable que sans vous je ne serais pas là où j'en suis aujourd'hui (et c'eût été bien dommage !). Si Mme Chulia et M. Brossard furent mes premiers enseignants de galénique, c'est bien vous qui m'avez encouragé à m'y engager ! C'est chez vous que j'ai fait ce court stage d'initiation sur les LDH et la FFF. C'est ensuite sur vos conseils et grâce à votre aide que j'ai pu faire mes premiers pas chez Ethypharm. Puis c'est encore auprès de vous que je suis allé demander conseil pour mon choix de master... Il m'apparaissait ainsi logique que vous soyez ma directrice de thèse. Que je fasse ces derniers pas à la faculté de Limoges à vos côtés. Votre nom sur la première de couverture de cette thèse est une de mes petites fiertés. Merci pour tout.

M. Battu, vous avez été une figure marquante de mon parcours. Vous m'avez en plusieurs occasions poussé à me dépasser, à être plus exigeant envers moi-même. Je garde de vous une certaine forme de rigueur. Merci pour cela, et aussi pour cette place que vous nous aviez gracieusement offert, à Florine et à moi, à votre école d'été de FFF. Ce fut une expérience nouvelle, un premier orteil dans le monde de la recherche dont je me souviendrai longtemps.

Mme Laverdet, bien que je n'aie pas eu l'honneur de vous avoir en tant qu'enseignante, vous avez accepté de faire partie de ce jury. Je désire vous en remercier encore une fois, en espérant que vous apprécierez le travail qu'il m'est donné de vous présenter.

Le quatrième membre de ce jury, je ne l'ai pas oublié. C'est vous Corine. Si vous aviez déjà eu droit à votre petit paragraphe pour le mémoire de M2, je ne vais tout de même pas passer à côté de l'occasion de vous remercier encore ; et permettez-moi, pour une fois, de le faire dans mon style « trop tarabiscoté » comme vous dites, avec mes longues phrases qui n'en finissent jamais. Quatre lignes, quatre virgules et un point-virgule : je me suis dépassé là... Rassurez-vous, j'ai quand même essayé de garder vos conseils sur l'écriture directe et concise. C'est une des nombreuses choses que j'ai apprises à vos côtés. Je suis ravi d'avoir à mon actif une publi et une thèse d'exercice sur ce projet-ci, qui fut le nôtre pendant 6 mois. Il a maintenant bien avancé, grâce à votre engagement et à l'énergie que vous communiquez à toutes les personnes amenées à travailler avec vous. C'est un beau projet, je vous souhaite de l'amener loin. Et j'espère bien garder contact avec vous, parce qu'à côté de tout ce travail, on rigole bien quand même... Je ne désespère pas de vous trouver à Montpellier un de ces jours.

Je voudrais aussi remercier toutes les personnes que j'ai rencontrées sur mon chemin au cours de ces années de pharmacie, et qui furent des sources d'inspiration à un moment ou à un autre :

Catherine Herry, qui me permit de réaliser mon stage à Ethypharm, notamment parce que j'avais la chance de m'appeler « Baptiste » et « Robin » en même temps. Je raconte encore cette histoire de temps en temps, vous m'aviez fait beaucoup rire ! Bruno Crière qui fut un encadrant de stage prévenant, toujours prêt à partager sa solide expérience. Pauline Hérault, ma marraine de formulation, avec qui j'ai partagé de très bons moments. Et Laury Trichard, qui me fit découvrir les plans d'expérience et qui me suggéra, la première, de faire le master de Châtenay. Je écouté tes conseils, Laury, et nul doute que ce fut un bon choix ! Merci à tous pour cette belle aventure rouennaise, qui a laissé en moi des souvenirs inoubliables (et une certaine nostalgie de la cafétéria de Leclerc). Je me suis épanoui à vos côtés, et il y a un peu de vous dans ce que je suis aujourd'hui.

Annette Cubertafond et Marie-Agnès Baudonnet Gaillard, avec qui j'ai réalisé mon stage hospitalo-universitaire, en Stérilisation Centrale. J'arrivais chez vous le premier jour avec une certaine appréhension. J'en suis reparti avec un certain dégoût pour les boîtes de chirurgie orthopédique, mais aussi de très bons souvenirs. Vous m'avez laissé apporter ma petite pierre à l'édifice, et m'avez appris ce que devait être un système d'assurance qualité. « La qualité se fait sur le terrain », c'est comme cela que je résume souvent ce stage.

En lien direct avec ce manuscrit, vient le tour de l'équipe MACS, mon petit foyer montpellierain, le temps de 6 mois. Anne, Marie, Sophie, Christophe, Philippe, Joël, Jean-Marie, merci à vous pour votre gentillesse et votre accueil. J'espère vous revoir tous bien vite ! Sylvie, nous n'en finissons plus de nous croiser depuis que je suis parti. Et c'est toujours un plaisir ! Je veux aussi remercier Ahmad Mehdi, Gilles Subra, Karine Parra, Michel Ramonda, sans oublier Hélène : ce fut un plaisir de travailler avec des scientifiques tels que vous. La recherche, c'est du partage. Vous avez partagé votre savoir et vos compétences avec moi, et j'espère en retour que les résultats et ce que j'en ai fait sont à la hauteur de ce que vous m'avez donné. Merci. N'oublions pas enfin le Labex CheMISyst qui a financé mon stage et sans lequel cette thèse ne serait donc pas ce qu'elle est.

Ces six ans furent l'occasion de rencontrer de belles personnes, dont certaines sont aussi devenues mes amis. Je veux tous les remercier.

La promo d'Industrie comptait deux personnes exceptionnelles, et nous avons formé (et formons toujours, une ou deux fois par an, autour d'un steak tartare, station Corvisart) un triangle infernal. Kélian, Florine, vous êtes et resterez mes deux copains de pharma, avec qui j'ai rédigé de nombreux comptes-rendus de TP, fait un eCTD sur Excel, fait des aiguilles duveteuses de caféine par sublimation-cristallisation... Et tant d'autres choses, qu'il est bon de se remémorer de temps en temps dans un petit resto parisien au ketchup si... Supercalifragilistic.

Le stage à Montpellier fut l'occasion de rencontrer de nouvelles personnes, dont trois restent parmi mes amis chers. Antigoni et Domenico, nos petits repas sont toujours un véritable plaisir, nos discussions d'une richesse inégalée. Et grâce à toi Antigoni, je deviendrai peut-être un jour un clarinettiste de talent ! Il y a toi aussi Sarah. Tu as été une amie précieuse quand j'étais dans le sud, et c'est toujours un grand plaisir de te revoir, à Paris ou à Montpellier ! Souvent autour d'un thé ou d'une bière, pour ne rien gâcher.

Et maintenant que les études de Pharmacie sont terminées, j'ai la chance de travailler entouré de gens extraordinaires, que je tiens eux aussi à remercier. Thomas, Amine, Candice, Fanny, Ghazlène, Zeineb, Céline... Nous travaillons au même endroit, certes. Mais vous appeler collègues ne serait pas faire justice au sentiment de profonde amitié que j'ai pour vous. Chaque jour en votre compagnie rend tout tellement plus facile. Par votre simple présence, le travail devient plaisir. Vous êtes un soutien quotidien, pour la thèse de doctorat comme pour cette thèse d'exercice. J'en garde un peu pour vous, parce qu'il faudra aussi vous remercier dans un an... Là, promis, vous aurez droit à un énorme pavé. Mais je vous aime, c'est promis !

Et évidemment, les copains de Limoges, avec qui j'ai tout fait, ou presque. Maxime, Sarah, Kiêm, Sylvie, Henri, Lucas, Abdoul... On n'est pas souvent tous rassemblés, mais vous voir est toujours une espèce de renaissance. Un retour à l'essentiel. On ne se voit pas tous autant qu'on le voudrait, mais vous êtes tous les jours avec moi, d'une certaine façon. Vous êtes ma famille de cœur, et mon âme de limougeaud s'arrêtera de briller le jour où je vous perdrai. J'ai de la chance de vous avoir trouvé, et au moins autant d'avoir pu vous garder.

Enfin, je vais remercier quelques personnes particulièrement importantes. Les origines, là où tout a commencé...

Papa, Maman. C'est vous, les premiers, qui avez fait de moi ce que je suis. Je suis le fruit de vos gènes, de votre éducation, et de votre amour pour moi. C'est une chance d'avoir pu grandir comme je l'ai fait : heureux. Toujours. Attention, on a le droit d'être heureux et grognon : ça, ça ne compte pas. Vous m'avez toujours encouragé à faire ce dont j'avais envie. Il n'y a jamais eu de limite, jamais de doute. Pour l'instant le résultat est assez réussi je trouve : je fais ce que j'aime, tous les jours, autant professionnellement que personnellement. Et je n'oublie jamais que c'est en partie grâce à vous.

Jean-Marie, tu as une place spéciale. Parce que même si tu n'es pas mon papa, j'ai quand même aussi grandi avec toi. Et ça compte. Tu as toi aussi participé à tout ça, ce que je suis et ce que je deviens. Merci JM !

Florian, Anaïs, Lison. Avec moi en plus, c'est un peu les 4 fantastiques... Mais c'est pas moi la Chose ! Je suis un peu déçu de finir mes études plus tard que Florian, alors que j'ai commencé plus tôt... Mais bon, tu es plus grand que moi, en plus d'être plus barbu, alors on n'est plus à ça près. Au moins, Lison et Anaïs ne m'ont pas dépassé, mon honneur d'aîné est sauf. Je vous aime tous les trois !

Et finalement, Zazou. Zazou sans qui tout cela n'aurait probablement pas eu la même saveur. Tu es un soutien sans faille, de tous les jours, dans toutes les circonstances. Le pouvoir de ton sourire ne cessera jamais de m'étonner. Même dans les moments de doute, même quand rien ne va : tout n'est que lumière quand tu es là, tout ce que tu touches se fait d'or. Cette thèse t'est dédiée, car elle fut écrite pendant ces longues nuits de travail où toi et moi avons tant donné pour que tout le monde soit fier de nous.

## Droits d'auteurs

---

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



## Table des matières

---

Table des illustrations .....	15
Table des tableaux .....	17
Table des équations .....	18
Liste des abréviations .....	19
Liste des grandeurs physico-chimiques et unités utilisées .....	20
Introduction .....	21
Première partie : CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE	
I. Les gels : des systèmes adaptés à l'administration de protéines et peptides .....	25
I.1. Contexte .....	25
I.2. Stabilisation et protection des protéines et peptides .....	25
I.3. Libération contrôlée des protéines et peptides depuis un gel .....	26
I.3.1. Généralités .....	26
I.3.2. Taille de maille du gel et taille du principe actif .....	27
I.3.3. Interactions Polymère-Principe actif .....	28
I.3.4. Autres paramètres influençant la libération .....	29
II. Les microgels : les avantages des gels, dans un système particulaire .....	31
II.1. Réticulation des microgels .....	31
II.1.1. Microgels physiques .....	31
II.1.2. Microgels chimiques .....	32
II.2. Microencapsulation de protéines et peptides .....	32
II.2.1. Incorporation de la substance active à la formulation .....	32
II.2.2. Libération de la substance active .....	33
II.2.2.1. Microgels à libération passive .....	33
II.2.2.2. Microgels à libération stimulus-dépendante .....	34
II.3. Cas particulier des microgels de polymères silylés .....	35
II.3.1. Polymères silylés et biomatériaux .....	36
II.3.2. Chimie sol-gel des alkoxy-silyles .....	36
III. La microfluidique : un procédé simple et modulable .....	39
III.1. Diversité des méthodes de préparation de microgels .....	39
III.2. Le procédé microfluidique .....	39
III.2.1. Généralités .....	39
III.2.2. Paramètres influençant l'émulsification en microfluidique .....	40
III.2.3. Microgels synthétisés par microfluidique .....	41

## Deuxième partie : RESULTATS EXPERIMENTAUX

I. Objectifs .....	45
II. Matériel et Méthodes .....	46
II.1. Matériel .....	46
II.2. Etude du mécanisme de réticulation sur macrogels .....	46
II.2.1. Etude macroscopique : effet du pH et de la concentration en PEG-Si sur la cinétique de réticulation.....	46
II.2.2. Etude spectroscopique : cinétique d'hydrolyse/condensation à $pH_h = 4,9$ par RMN $^1H$ .....	48
II.2.3. Etude spectroscopique : cinétique de condensation à $pH_h = 4,9$ par Diffusion Dynamique de la Lumière (DLS) .....	49
II.2.4. Etude rhéologique .....	49
II.2.4.1 Cinétique de réticulation à $pH_h = 4,9$ .....	49
II.2.4.2 Cinétique de réticulation après neutralisation .....	49
II.3. Synthèse et purification des microgels .....	50
II.3.1. Développement de la formule et du procédé de préparation des microgels blancs .....	50
II.3.1.1 Optimisation de la formule : stabilisation de l'émulsion.....	50
II.3.1.2 Préparation des microgels blancs par procédé microfluidique .....	50
II.3.2. Préparation des microgels chargés en BSA par procédé microfluidique .....	52
II.3.3. Purification des microgels.....	53
II.4. Caractérisation des microgels .....	54
II.4.1. Propriétés morphologiques et granulométriques des microgels .....	54
II.4.2. Propriétés mécaniques des microgels .....	54
II.5. Etude préliminaire de libération des microgels chargés.....	55
II.5.1. Libération de la BSA .....	55
II.5.2. Dosage de la BSA .....	56
III. Résultats .....	57
III.1. Etude du mécanisme de réticulation .....	57
III.1.1. Etude macroscopique : effet du pH et de la concentration en PEG-Si sur la cinétique de réticulation.....	57
III.1.2. Etude spectroscopique : cinétique d'hydrolyse/condensation à $pH_h = 4,9$ par RMN $^1H$ .....	59
III.1.3. Etude spectroscopique : cinétique de condensation à $pH_h = 4,9$ par DLS.....	61
III.1.4. Etude rhéologique de la réticulation.....	62
III.1.4.1 Cinétique de réticulation à $pH_h = 4,9$ .....	62
III.1.4.2 Cinétique de réticulation après neutralisation .....	63
III.2. Préparation et purification des microgels.....	64
III.2.1. Optimisation de la formule et du procédé de préparation de l'émulsion E/H .....	64
III.2.2. Préparation des microgels blancs et chargés en BSA .....	65
III.2.3. Purification des microgels blancs et chargés en BSA .....	66
III.3. Caractérisation des microgels .....	66
III.3.1. Propriétés morphologiques et granulométriques des microgels .....	66
III.3.2. Propriétés mécaniques des microgels .....	67
III.4. Etude préliminaire de libération des microgels chargés.....	68
IV. Discussion .....	70
IV.1. Conditions de réticulation d'une solution de PEG-Si .....	70

IV.1.1. Mécanisme de réticulation de la phase aqueuse à pH = 4,9.....	70
IV.1.2. Réticulation de la phase aqueuse en conditions biocompatibles .....	71
IV.2. Préparation de microgels chargés en protéine modèle par procédé microfluidique...	72
IV.2.1. Optimisation de l'émulsification .....	72
IV.2.2. Préparation de microgels chargés en BSA .....	72
IV.2.3. Purification des microgels .....	73
IV.2.4. Caractéristiques des microgels .....	74
IV.2.5. Libération de la protéine encapsulée.....	75
IV.3. Voies d'administration possibles des microgels .....	76
IV.3.1. Voies parentérales .....	77
IV.3.1.1 Voie intraveineuse .....	77
IV.3.1.2 Autres voies parentérales .....	77
IV.3.2. Voie orale.....	78
IV.3.3. Voies topiques .....	78
Conclusion et Perspectives .....	81
Références bibliographiques .....	82
Annexes .....	97
Serment De Galien.....	103

## Table des illustrations

Figure 1 : Contrôle de la libération du principe actif par la taille de maille .....	27
Figure 2 : Le triméthoxysilyle, exemple de fonction alkoxy-silyle .....	36
Figure 3 : Réaction d'hydrolyse de la fonction alkoxy-silyle .....	37
Figure 4 : Réaction de condensation de deux fonctions silanol (A) ou d'une fonction silanol et d'une fonction alkoxy-silyle (B) .....	37
Figure 5 : Représentation schématique de la pH-dépendance du taux d'hydrolyse (H), de la vitesse de condensation (C), et du taux de redissolution des espèces condensées (D) .....	38
Figure 6 : Géométries les plus rencontrées pour l'émulsification en microfluidique : Géométrie co-axiale (A), Géométrie de « focalisation de flux » (B), Géométrie en T (C) (126) .....	41
Figure 7 : Synthèse du PEG-Si .....	46
Figure 8 : Procédé de réticulation de la solution de PEG-Si utilisé au cours du balayage des conditions opératoires .....	47
Figure 9 : Système microfluidique utilisé pour produire les microgels de PEG-Si blancs, avec en bleu (n°1 et 2) la phase aqueuse et en orange (n°3) la phase huileuse .....	51
Figure 10 : Système microfluidique utilisé pour produire les microgels de PEG-Si chargés en BSA, avec en bleu (n°1, 2 et 3) la phase aqueuse et en orange (n°4) la phase huileuse .....	53
Figure 11 : Séparation de phases observable au cours de l'étape de purification, après centrifugation .....	54
Figure 12 : Diagramme $pH_h$ -[PEG-Si] à $t_h = 1h$ , réalisé en milieu tamponné Citrate/Phosphate à 25°C ○ : Réticulé avant neutralisation, ● : $t_{gel} < 2h$ après neutralisation, ● : $t_{gel} > 2h$ après neutralisation .....	57
Figure 13 : Diagramme $pH_h$ -[PEG-Si] à $t_h = 3h$ , réalisé en milieu tamponné Citrate/Phosphate à 25°C ○ : Réticulé avant neutralisation, ● : $t_{gel} < 2h$ après neutralisation, ● : $t_{gel} > 2h$ après neutralisation .....	58
Figure 14 : Diagramme $pH_h$ -[PEG-Si] à $t_h = 24h$ , réalisé en milieu tamponné Citrate/Phosphate à 25°C ○ : Réticulé avant neutralisation, ● : $t_{gel} < 2h$ après neutralisation, ● : $t_{gel} > 2h$ après neutralisation .....	58
Figure 15 : Exemple de spectre de RMN $^1H$ du PEG-Si ([PEG-Si] = 20% m/v dans tampon Citrate/Phosphate à $pH_h = 4,9$ , $t_h = 15$ min) .....	60
Figure 16 : Suivi cinétique de $R_H$ et $R_C$ en RMN $^1H$ à 25°C, sur 30 h (A) et sur 9 j (B) ([PEG-Si] = 20 % m/v et $pH_h = 4,9$ ) .....	61
Figure 17 : Suivi de la taille des éléments colloïdaux au cours du temps au sein d'une solution de PEG-Si à 25°C ([PEG-Si] = 20 % m/v et $pH_h = 4,9$ ) par diffusion dynamique de la lumière .....	62
Figure 18 : Cinétique de réticulation en rhéologie en oscillation à 25°C ([PEG-Si] = 20% m/v et $pH_h = 4,9$ ) .....	63

Figure 19 : Cinétique de réticulation en rhéologie en oscillation à 25°C ([PEG-Si] = 20 % m/v et pH = 7,5 après 3 h d'hydrolyse à pH <sub>h</sub> = 4,9) .....	63
Figure 20 : Image de microscopie optique (G : x 400) de l'émulsion réalisée en turbine (90 % Phase huileuse : paraffine liquide épaisse à 2 % monooléate de sorbitane ; 10 % Phase aqueuse : Solution à 20 % m/v de PEG <sub>2000</sub> ).....	64
Figure 21 : Images de microscopie optique (G : x 400) de l'émulsion réalisée en microfluidique en fin d'émulsification (à gauche) et 18h après (à droite) (90 % Phase huileuse : paraffine liquide épaisse à 2 % monooléate de sorbitane ; 10 % Phase aqueuse : Solution à 20 % m/v de PEG <sub>2000</sub> ) .....	65
Figure 22 : Image de microscopie optique (G : x 400) de microgels blancs (à gauche) et chargés en BSA (à droite) en suspension dans un tampon Citrate/Phosphate pH = 7,5 après purification.....	65
Figure 23 : Distribution de taille des microgels blancs (points évidés, ligne pointillée) et chargés (points pleins, trait plein), évaluée par analyse d'image de microscopie optique (n = 515 microgels).....	66
Figure 24 : Exemple de courbe de la force appliquée par le levier en fonction de la profondeur de pénétration dans un microgel blanc, obtenues par nano-indentation en AFM lors de l'engagement (en rouge) et du retrait (en vert) .....	68
Figure 25 : Cinétique de libération de la BSA encapsulée dans des microgels, dans un tampon phosphate salin à pH = 7,4 ([KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] = 50 mM et [NaCl] = 140 mM) .....	69
Figure 26 : Schéma du mécanisme moléculaire conduisant à la réticulation du PEG-Si à pH 4,9.....	71

## Table des tableaux

---

Tableau 1 : Composition des trois tampons Citrate/Phosphate (0,05 M/0,1 M) utilisés au cours du plan de balayage .....	48
Tableau 2 : Débits utilisés lors de l'optimisation du rapport des débits entre phase huileuse et phase aqueuse.....	52
Tableau 3 : Paramétrage des pousse-seringues pour la préparation de microgels blancs....	52
Tableau 4 : Paramétrage des pousse-seringues pour la préparation de microgels chargés en BSA.....	53
Tableau 5 : Composition du tampon Citrate/Phosphate (0,05 M/0,1 M) à pH = 7,5.....	54
Tableau 6 : Ensembles de conditions donnant un temps de gel inférieur ou égal à 2h après application du stimulus par changement de pH .....	59
Tableau 7 : Données statistiques sur la distribution de taille des microgels (n = 515 microgels).....	67

## Table des équations

---

Équation 1 : Loi de Stokes-Einstein .....	28
Équation 2 : Coefficient de partage de la molécule encapsulée dans un gel.....	28
Équation 3 : Expressions des nombres capillaires de la phase continue $Ca_c$ et de la phase dispersée $Ca_d$ .....	40
Équation 4 : Fonction puissance modélisant la courbe d'engagement.....	55
Équation 5 : Modèle de Sneddon pour un indenteur conique.....	55
Équation 6 : Expression du taux d'hydrolyse $R_H$ , suivi dans le temps en RMN $^1H$ .....	60
Équation 7 : Expression du taux de condensation $R_C$ , suivi dans le temps en RMN $^1H$ .....	60
Équation 8 : Expression du Span, indice de polydispersité d'une distribution granulométrique .....	67
Équation 9 : Calcul de la taille de maille .....	75
Équation 10 : Relation entre module d'Young et module de cisaillement .....	75

## Liste des abréviations

---

AFM : Microscopie à force atomique  
ASC : Aire sous courbe  
BSA : Albumine de sérum bovin  
DLS : Diffusion dynamique de la lumière  
E/H : Eau-dans-huile  
PBS : Tampon phosphate salin  
PEEK : Poly(étheréthercétone)  
PEG : Poly(éthylène glycol)  
PEG-Si : Poly(éthylène glycol) bis-silylé  
PVA : Alcool polyvinylique  
RMN <sup>1</sup>H : Résonance magnétique nucléaire du proton  
UV : Ultraviolet

## Liste des grandeurs physico-chimiques et unités utilisées

---

[PEG-Si] : Concentration en poly(éthylène glycol) bis-silylé (% m/V)

% m/m : Pourcentage masse/masse

% m/v : Pourcentage masse/volume

% v/v : Pourcentage volume/volume

$\alpha$  : Demi-angle de la pointe du levier d'AFM ( $^{\circ}$ )

$\gamma$  : Tension interfaciale ( $\text{N.m}^{-1}$ )

$\eta$  : Viscosité dynamique ( $\text{Pa.s}$ )

$\nu$  : Coefficient de Poisson (SU)

Ca : Nombre capillaire (SU)

E : Module d'indentation (Pa)

G' : Module élastique (Pa)

G'' : Module visqueux (Pa)

HLB : Balance Hydrophile/Lipophile

M : Masse molaire ( $\text{g.mol}^{-1}$ )

pH<sub>h</sub> : pH d'hydrolyse accélérée

Q : Débit ( $\text{m}^3.\text{s}^{-1}$ )

S : Section interne du canal de microfluidique ( $\text{m}^2$ )

SU : Sans unité

t<sub>gel</sub> : Temps de gel (h)

t<sub>h</sub> : Temps d'hydrolyse accélérée (h)

## Introduction

---

L'avancée des biotechnologies a permis le développement d'un grand nombre de peptides et de protéines d'intérêt thérapeutique. Leurs domaines d'application sont larges, comme par exemple, le traitement de cancers, de maladies infectieuses, de maladies cardiovasculaires, du diabète, ou plus récemment l'ingénierie tissulaire. Leur intérêt majeur réside dans leur spécificité d'action et leur faible seuil thérapeutique, qui limitent les effets secondaires. Malheureusement, ces molécules biologiques sont difficiles à administrer, car leur relative fragilité est à l'origine de demi-vies très courtes. Des stratégies de microencapsulation ont donc été développées pour améliorer la stabilité, et permettre l'administration et la libération contrôlée des peptides et des protéines thérapeutiques d'intérêt.

Les microgels sont particulièrement adaptés à ce domaine d'application, du fait de la grande quantité d'eau qu'ils contiennent. Une des pistes proposées par l'équipe « Matériaux Avancés pour la Catalyse et la Santé », en collaboration avec l'équipe « Chimie Moléculaire et Organisation du Solide » de l'ICGM<sup>1</sup> et l'équipe « Acides aminés, Hétérocycles, Peptides et Protéines » de l'IBMM<sup>2</sup>, est la production de microgels à base de polymères silylés. La silylation peut se faire sur des polymères de diverses natures (synthétiques, polysaccharidiques, protéiques), dont un certain nombre sont biocompatibles. Les chaînes polymériques ainsi silylés peuvent alors réticuler entre elles, de façon covalente, pour donner un réseau tridimensionnel constituant la structure du gel. Si la chimie sol-gel du silicium a été décrite il y a plusieurs dizaines d'années, elle représente aujourd'hui une piste prometteuse du fait de son mécanisme de réticulation. Cette dernière peut en effet s'opérer dans des conditions de pH et de température douces. Ces conditions permettent ainsi d'encapsuler des molécules biologiques fragiles sans les dénaturer.

D'autre part, la microfluidique s'impose peu à peu comme un procédé d'intérêt majeur dans la synthèse de microparticules. Elle permet notamment l'obtention de particules de granulométrie homogène, et des taux d'encapsulation ajustables à l'échelle micromolaire. Ce procédé se développe très rapidement, porté par sa relative sobriété énergétique et sa grande adaptabilité.

A ce jour, l'utilisation de polymères silylés pour l'encapsulation de protéines thérapeutiques n'a pas encore fait l'objet d'une preuve de concept, si l'on exclut notre propre contribution issue des travaux présentés dans ce manuscrit (1). Dans ce contexte, une courte revue bibliographique sera présentée dans un premier temps : elle portera sur les microgels, leur intérêt dans l'encapsulation de protéines thérapeutiques, et leur production en microfluidique. La deuxième partie sera l'occasion d'exposer les résultats de la mise au point, par un procédé microfluidique, des microgels de poly(éthylène glycol) bis-silylé (PEG-Si) encapsulant une protéine modèle. L'étude se décline en trois grandes étapes :

- La compréhension et la maîtrise des mécanismes de réticulation du PEG-Si en conditions douces, respectueuses des protéines à encapsuler,
- La préparation de microgels de PEG-Si assistée par microfluidique,
- L'encapsulation d'albumine de sérum bovin (BSA), une protéine modèle, en vue de sa libération prolongée.

---

<sup>1</sup> Institut Charles Gerhardt Montpellier

<sup>2</sup> Institut des Biomolécules Max Mousseron



**Première Partie :**  
**CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE**



# I. Les gels : des systèmes adaptés à l'administration de protéines et peptides

---

## I.1. Contexte

Après la production de la première insuline recombinante dans les années 80, les protéines et les peptides thérapeutiques ont longtemps représenté un domaine prometteur des sciences pharmaceutiques (2). Ils s'imposent enfin aujourd'hui comme des traitements de choix, notamment dans certaines pathologies chroniques. Le large éventail de protéines et peptides thérapeutiques maintenant disponibles sur le marché comprend des hormones et facteurs de croissances, des cytokines, des anticoagulants et facteurs de la coagulation, des enzymes, des protéines de fusion, des toxines (notamment dans les vaccins), et de nombreux anticorps (3–6).

Ainsi, en 2017, la Food and Drug Administration, autorisait la commercialisation de 380 spécialités avec une protéine pour actif, et 60 autres contenant des peptides (7,8). Ces molécules présentent des avantages majeurs par rapport aux molécules actives classiques, ce qui explique l'augmentation rapide de leur étude et de leur utilisation (3,6,8). En effet, les protéines et peptides ont très souvent une grande spécificité vis-à-vis de leur cible ce qui limite les effets indésirables. Notons aussi que l'utilisation de ces médicaments se voit parfois approuvée plus vite que pour les petites molécules classiques. C'est notamment le cas des traitements de substitution, qui remplacent une protéine normalement produite par l'organisme à l'état physiologique. Ce paramètre entre naturellement en ligne de compte dans la stratégie de développement des entreprises pharmaceutiques.

## I.2. Stabilisation et protection des protéines et peptides

Les protéines et peptides thérapeutiques souffrent d'inconvénients qui freinent encore une utilisation massive (8,9). Leur forte instabilité physique, chimique et enzymatique, qui leur doit d'être classée sous l'appellation de « molécules fragiles », reste l'inconvénient le plus difficile à surmonter. La sensibilité à la dégradation et/ou à la dénaturation explique leur demi-vie souvent très courte *in vivo*, et leur élimination rapide par l'organisme. Cette fragilité, couplée à un faible passage à travers les barrières biologiques, limitent bien souvent les voies d'administration aux seules injections (locales ou systémiques).

Ainsi, l'augmentation de la demi-vie des protéines et peptides constitue un défi dont se sont emparés tous les acteurs du développement de médicaments. Cela passe en premier lieu par une modification de la structure même de la protéine. On peut modifier la structure primaire d'une protéine, en substituant certains acides aminés composant les sites clivables (8). Il est aussi possible de protéger la molécule en modifiant sa structure secondaire, par l'insertion de ponts lactames, entre autres (10). L'augmentation de la demi-vie de ces molécules peut par ailleurs passer par une augmentation de leur liaison à l'albumine dans le sang. Par exemple, l'acylation d'un agoniste du GLP-1 a donné lieu à la mise sur le marché d'un traitement contre le diabète (11). Enfin, la PEGylation est une stratégie couramment utilisée pour augmenter la masse molaire des molécules d'intérêt, et donc en diminuer la clairance rénale. Ce procédé a notamment été utilisé pour augmenter la demi-vie de plusieurs types d'interférons aujourd'hui sur le marché (12,13).

Cependant, la modification de leur structure n'est pas la seule manière de protéger les protéines et peptides thérapeutiques de la dégradation. La formulation du médicament apporte

elle aussi une réponse efficace à cette problématique (4,14,15). Les protéines et peptides thérapeutiques peuvent en effet être incorporés à un grand nombre de systèmes de délivrance possibles, de taille et de nature très différentes (16,17). Cependant, elles obéissent toutes au même principe : l'encapsulation de la molécule fragile d'intérêt dans une structure qui la protège et l'immobilise, jusqu'à sa libération. Ainsi, on trouve des protéines ou des peptides encapsulés dans des émulsions (18,19), des nano- ou microsphères polymériques (20,21), des nano- ou microcapsules (20,22), des nanoparticules lipidiques solides (23), des liposomes (24), et des hydrogels. Ces derniers, semblent particulièrement adaptés à l'encapsulation de protéines et de peptides, pour de multiples raisons.

Selon Rogovina *et al.*, un gel est un solide ou un semi-solide contenant au moins 2 composants. Le premier d'entre eux est un polymère formant un réseau tridimensionnel grâce à des liaisons covalentes (gels chimiques) ou non covalentes (gels physiques). Ce réseau polymérique est dissout dans un deuxième composant, liquide, présent en quantité suffisante pour assurer les propriétés élastiques du gel (25). Lorsque le solvant majoritaire est l'eau, on parle d'hydrogel. Les protéines et les peptides étant de façon générale des molécules très hydrophiles, cette forte teneur en eau confère aux gels la capacité à encapsuler ces actifs biologiques à l'état dissout. Une fois encapsulés, peptides et protéines sont plus ou moins isolés de l'environnement extérieur par le réseau polymérique. En effet, ce dernier constitue une barrière pouvant empêcher ou retarder la pénétration d'enzymes qui pourraient catalyser la dégradation des protéines (26). Les molécules fragiles encapsulées, ainsi protégées de l'action de ces enzymes, voient leur demi-vie sensiblement augmenter. Cette protection a cours jusqu'à la libération de l'actif, qu'il convient de contrôler.

### **I.3. Libération contrôlée des protéines et peptides depuis un gel**

#### **I.3.1. Généralités**

Les modalités de libération d'une substance active doivent être pensées en fonction de ses propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques, mais aussi de la pathologie à traiter. Dans le cas des peptides et protéines, la libération prolongée est le profil le plus souvent recherché. En effet, lorsqu'un principe actif à la demi-vie faible fait l'objet d'une libération conventionnelle, le maintien de doses thérapeutiques nécessite des administrations répétées. Or cela nuit au confort et à l'observance du patient. La libération prolongée du principe actif pallie cet inconvénient, en apportant continuellement de la substance active à la cible sur une durée relativement longue, comparée à une libération conventionnelle.

Si la libération prolongée est souvent souhaitée, d'autres cinétiques de mise à disposition peuvent aussi être recherchées. Par exemple, une libération retardée peut être envisagée pour des principes actifs dont on ne désire la libération qu'après accumulation au sein de l'organe cible. Une libération stimulus-dépendante (4) est intéressante, dans ce cadre-là. Autre exemple : la fabrication d'un pancréas artificiel nécessite le développement d'un système de libération pulsatile de l'insuline. Dans ce cas encore, chaque libération répond à un stimulus, en l'occurrence un pic glycémique (27).

La libération d'une substance active est notamment fonction de son coefficient de diffusion  $D$ . De très nombreux modèles mathématiques permettent de prévoir ce coefficient au sein du gel considéré (28,29). Ces modèles sont issus de théories plus ou moins sophistiquées, dont aucune n'est assez globale pour être appliquée à tous les types de libération. En effet, chaque théorie se base sur des approximations et des postulats visant à simplifier plus ou moins le

système étudié, ce qui en limite la portée. Chacun choisit donc le modèle qui lui convient, en fonction de la nature de son système galénique et de la précision qu'il veut conférer au résultat. Le présent document n'a pas pour ambition de citer tous les modèles existant à ce jour. Cependant, une étude approfondie de ces derniers nous permet d'isoler un certain nombre de paramètres influençant le coefficient de diffusion du principe actif au sein d'un gel, et donc sa libération.

### I.3.2. Taille de maille du gel et taille du principe actif

Un gel est un réseau tridimensionnel de polymères, dissous dans un solvant. Entre les chaînes polymériques composant ce réseau, il y a des espaces nommés « mailles ». Ces dernières permettent notamment la circulation du solvant au sein du réseau, ainsi que le déplacement des éventuelles substances actives encapsulées dans le gel. La taille de la maille est donc l'un des principaux paramètres influençant la libération des molécules actives (26). Trois cas sont possibles, comme le montre la Figure 1.

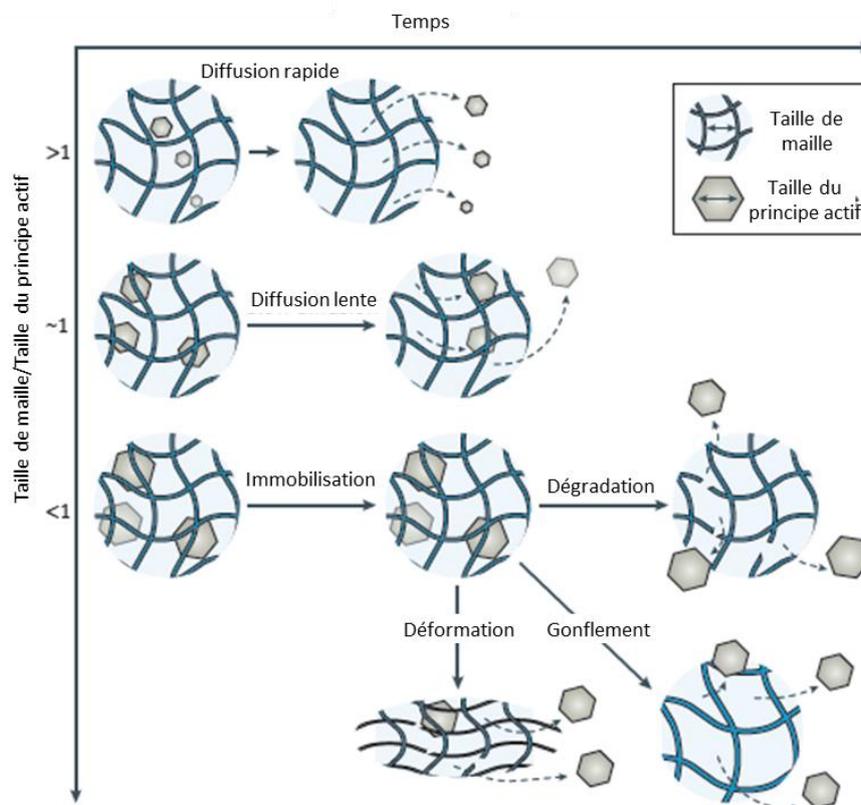


Figure 1 : Contrôle de la libération du principe actif par la taille de maille (26)

Tout d'abord, la taille de maille du gel peut être supérieure au rayon hydrodynamique de la substance encapsulée ( $r_{\text{maille}}/r_{\text{PA}} > 1$ ). Alors, cette dernière peut se déplacer relativement aisément dans le gel. Sa vitesse n'est limitée que par son coefficient de diffusion  $D$ , donné par la loi de Stokes-Einstein montrée en Équation 1 (30). Ces gels permettent une libération plutôt rapide du principe actif, de l'ordre de quelques heures à une journée.

$$D = \frac{k_b \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r_{PA}}$$

Où : D : Coefficient de diffusion (m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>)

k<sub>b</sub> : Constante de Boltzmann (kg.m<sup>2</sup>.s<sup>-2</sup>.K<sup>-1</sup>)

T : Température (K)

η : Viscosité dynamique (kg.s.m<sup>-1</sup>.s<sup>-2</sup>)

r<sub>PA</sub> : Rayon hydrodynamique de la molécule active (m)

Équation 1 : Loi de Stokes-Einstein

Lorsque le rayon hydrodynamique du principe actif est du même ordre de grandeur que la maille ( $r_{\text{maille}}/r_{\text{PA}} = 1$ ), la diffusion est freinée par l'encombrement stérique. En effet, la molécule active subit des forces de frottement qui la ralentissent. De plus, étant donné la disparité des tailles de maille au sein du gel, la molécule risque de rencontrer des mailles trop petites pour elle : le contournement de ces obstacles allonge la distance parcourue au sein du gel. On a donc un double mécanisme conduisant à la prolongation du temps de libération.

Enfin, il arrive que le réseau polymérique soit si dense que la taille de maille soit inférieure au diamètre hydrodynamique de la molécule active ( $r_{\text{maille}}/r_{\text{PA}} < 1$ ). Cette dernière est alors totalement immobilisée au sein du gel : sa libération est conditionnée par l'ouverture de la maille, qu'elle soit passive ou provoquée par l'application d'un stimulus extérieur. L'ouverture passive est bien souvent due à la dégradation lente du gel, par l'hydrolyse chimique du gel (31) ou par sa dégradation enzymatique (32,33). L'ouverture de maille contrôlée par un stimulus, quant à elle, peut se traduire par la dégradation, le gonflement ou la déformation du gel. Ces phénomènes peuvent être induits par l'application de différents stimuli, comme des variations du pH, de la température, de la concentration en glucose, etc (34). La protéine encapsulée est alors libérée sous certaines conditions environnementales seulement.

### I.3.3. Interactions Polymère-Principe actif

Lorsqu'il n'est pas possible de produire un gel avec une maille suffisamment petite pour retenir le principe actif, d'autres méthodes sont possibles pour moduler sa libération. Ainsi, on peut contrôler le coefficient de partage K en mettant à profit les interactions entre le polymère et l'espèce diffusante (35). Ce coefficient, dont la formule est présentée en Équation 2, est le rapport entre les concentrations en actif à l'intérieur et à l'extérieur du gel. Le coefficient de partage n'affecte pas directement la diffusion de l'actif au sein du gel, mais plutôt sa diffusion vers l'extérieur (36).

$$K = \frac{C_{\text{interne}}}{C_{\text{externe}}}$$

Où : C<sub>interne</sub> : Concentration de l'actif au sein du gel (mol/L)

C<sub>externe</sub> : Concentration de l'actif dans le milieu extérieur (mol/L)

Équation 2 : Coefficient de partage de la molécule encapsulée dans un gel

La plus forte des interactions possibles entre polymère et substance active est sans conteste la liaison covalente. Cette dernière permet l'immobilisation totale de la molécule d'intérêt au

sein du gel. Notons que certaines liaisons covalentes proposées, comme la liaison amide, sont extrêmement stables dans le temps ; tellement stables qu'elles ne permettent en fait aucune libération de la substance active (37). Ce type de liaison covalente n'est donc pas pertinent dans le cadre d'une libération prolongée de la substance. En revanche, d'autres liaisons covalentes dites « clivables » peuvent être mises à profit. C'est le cas par exemple des liaisons esters (26) ou des liaisons peptidiques (38). Ces liaisons permettent une libération de l'actif qui peut alors diffuser au sein de la matrice polymérique vers le compartiment extérieur. Le clivage de la liaison peut se faire par hydrolyse spontanée, lentement et en continu, comme pour la liaison ester. Pour les liaisons peptidiques, la libération de la protéine ne se fera en revanche que si le gel est dans un milieu riche en protéase, et que ces dernières parviennent à diffuser au sein de la matrice polymère. Il convient donc dans ce cas de prêter attention à la taille de maille du réseau polymérique, qui peut affecter l'accessibilité des liaisons à cliver par les protéases.

En dehors des liaisons covalentes, il est possible d'employer des liaisons faibles pour retenir l'actif dans le gel. Dans le cas de polymères chargés (aussi appelés « polyélectrolytes »), on peut imaginer utiliser les forces électrostatiques pour encapsuler une substance de charge opposée. Ainsi, on trouve mention d'encapsulation de substances positives retenues dans un film de sulfate de chondroïtine, un glycosaminoglycane de charge négative présent dans nos cartilages (39). De la même façon, le chitosane peut être utilisé pour retenir des molécules négatives grâce à ses charges positives. Les molécules ainsi stabilisées peuvent être libérées de façon prolongée, par la dégradation progressive du gel, ou bien en étant désorbées par des contre-ions venant du milieu de libération.

Enfin, on peut citer un cas particulier d'interactions exploitables pour moduler le coefficient de partage : les associations hydrophobes. Les gels, du fait de leur forte teneur en eau, représentent une forme assez peu propice à l'encapsulation de molécules hydrophobes. Cependant, l'utilisation de cyclodextrines liées aux polymères permet non seulement l'encapsulation, mais aussi la libération contrôlée de molécules hydrophobes (40). Les cyclodextrines sont des oligosaccharides de glucose formant un cycle. La particularité de ces structures est l'hydrophobie caractérisant la face interne de l'anneau, alors que la face extérieure est hydrophile. Les cyclodextrines peuvent donc aider à la solubilisation de molécules actives hydrophobes en les accueillant en leur cœur, tout en restant elles-mêmes solubles dans un gel aqueux (41). La libération de l'actif est alors contrôlée par (i) son coefficient de partage entre sa forme liée aux cyclodextrines et sa forme libre (seule forme susceptible de diffuser dans le milieu de libération), et (ii) son coefficient de partage entre la forme libre dans le gel et celle en dehors du gel.

Ainsi, les interactions entre le gel et la substance active offrent une opportunité supplémentaire pour contrôler la libération de l'actif, en plus de la taille de maille du réseau polymérique. Cependant, d'autres paramètres sont à considérer, car leur influence n'est pas négligeable.

#### **I.3.4. Autres paramètres influençant la libération**

D'autres paramètres peuvent avoir une influence significative sur la libération de la substance diffusante. C'est notamment le cas de la flexibilité des chaînes polymériques. En effet, il a été démontré que pour deux réseaux polymériques de natures différentes mais de taille de maille similaire, les réseaux les plus flexibles libéraient leur contenu plus rapidement (42).

Enfin, la taille et la forme du gel sont des paramètres capitaux à prendre en compte dans l'analyse de la libération d'un actif. En effet, pour un actif donné, le temps de diffusion dépend

logiquement de la longueur du gel à traverser pour atteindre le milieu externe. Ainsi, un gel de grande taille permettra plus aisément une libération prolongée qu'un gel de taille micrométrique (36). Ces derniers ont cependant de nombreux autres avantages, tout à fait exploitables dans l'optique d'une encapsulation de protéines et de peptides thérapeutiques.

## II. Les microgels : les avantages des gels, dans un système particulaire

---

Nombre des caractéristiques des gels font de cette forme pharmaceutique une plateforme adaptée à la délivrance de protéines et de peptides. Et si les gels macroscopiques sont les plus courants, il convient d'aborder le cas des microgels. Ces derniers se définissent comme des gels particuliers dont la taille est comprise entre 0,1 et 100  $\mu\text{m}$  (43). D'un point de vue pharmacotechnique, le caractère particulaire de ces microgels permet d'obtenir des taux de réticulation importants sans nuire à l'injectabilité du produit. En effet, un hydrogel macroscopique très réticulé est impossible à injecter du fait de sa viscosité élevée, alors qu'une suspension de microgels très réticulés peut conserver une viscosité proche de celle de l'eau (44). Sur le plan biopharmaceutique, les microgels présentent aussi quelques avantages. Certains auteurs imaginent en effet un médicament contenant plusieurs populations différentes de microgels, autorisant plusieurs modalités de libération en une seule formulation (45). Ce type de formulation à libération complexe est bien plus difficile à réaliser avec des hydrogels macroscopiques. Aussi, les microgels peuvent voir leur surface fonctionnalisée, favorisant ainsi leur adressage au tissu cible et éventuellement leur internalisation dans des cellules (46). L'actif est alors libéré au sein même des cellules, améliorant potentiellement l'efficacité de certains actifs. Tous ces avantages, dus au caractère particulaire et à la petite taille des microgels, s'ajoutent ainsi aux avantages conférés par les gels de façon plus générale, à savoir leur forte concentration en eau et la grande adaptabilité de leurs caractéristiques physico-chimiques. Cette adaptabilité tient notamment à la diversité des matériaux à disposition, dont on trouve quelques exemples dans la littérature.

### II.1. Réticulation des microgels

#### II.1.1. Microgels physiques

Lorsque la réticulation entre les molécules consiste en des interactions non covalentes, on parle de gels physiques. Ces interactions de faible énergie peuvent être de natures très variées : ponts hydrogènes, interactions électrostatiques, interactions de Van der Waals, formation de régions cristallines. Ces gels sont en général biodégradables, ce qui n'est pas toujours le cas des gels chimiques (47). Ils présentent en revanche de faibles propriétés mécaniques.

Il existe une grande diversité de microgels physiques, dont ne seront ici donnés que quelques exemples. Les gels ioniques (parfois appelés « polyplexes ») représentent une grande partie de ces microgels physiques. La plupart d'entre eux sont d'origine naturelle et biocompatibles. On peut citer les gels d'alginate (48–52) de pectine (50,53) ou de gomme gellane (54). Ces trois polymères sont des polyanions, réticulables par apport d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ . Le chitosane, polycationique pour sa part, est un autre exemple. Il est souvent complexé à un anion ou à un polyanion, comme le tripolyphosphate (55–58). Le chitosane présente par ailleurs des propriétés mucoadhésives dues à sa charge positive, ce qui explique le grand intérêt porté à ce polymère.

Bien qu'ils soient rares, il existe en outre d'autres types de microgels physiques, qui ne sont pas basés sur la complexation d'ions. Par exemple, lorsqu'une solution d'alcool polyvinylique (PVA) est soumise à une succession de cycles de congélation/décongélation, elle forme un gel physique (59). Ce phénomène est applicable en émulsion E/H pour donner des microgels

(60). Il s'explique par la formation de régions cristallines au sein de la solution de PVA. Cette cristallisation est d'autant plus importante que le temps et le nombre des cycles sont élevés (61).

### **II.1.2. Microgels chimiques**

La réticulation des gels chimiques est basée sur la formation de liaisons covalentes. Ces gels sont ainsi plus résistants à la dégradation, ce qui en fait des candidats de choix pour contrôler la libération d'actifs.

Le PVA est un exemple de polymère intéressant, car il peut donner des microgels physiques comme décrit précédemment, mais aussi des microgels chimiques, selon le procédé utilisé. On peut ainsi le faire réticuler de façon covalente par réaction avec un aldéhyde ou bien par exposition à un faisceau électronique (61). Avec d'autres polymères, il est aussi possible de synthétiser des microgels chimiques par formation de liaisons thiolènes, en mettant à profit l'addition de Michael (62). Une autre option est la réticulation de l'acide hyaluronique par l'acide adipique dihydrazide (63).

Cependant, malgré l'existence de ces alternatives intéressantes, la large majorité des hydrogels chimiques sont réticulés par réaction entre dérivés acryliques (64). Classiquement, le polymère d'intérêt est fonctionnalisé par un groupement acrylate. La réticulation chimique est alors induite entre résidus acrylates, par apport de radicaux libres. Les polymères ainsi fonctionnalisés pour synthétiser des microgels peuvent être de natures très variées. On trouve par exemple des PEG (65–70), des gélatines (71,72), ou encore des acides polylactiques (73). L'un des polymères les plus utilisés pour synthétiser des microgels chimiques est le poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM) (65,68,74,75). Ce dernier présente l'intérêt d'être thermosensible : il est en effet hydrophile en-dessous de sa température de transition (autour de 30°C) ; et hydrophobe au-dessus de cette même température. De tels microgels sont donc tout indiqués pour une libération d'actif induite par un stimulus thermique.

## **II.2. Microencapsulation de protéines et peptides**

Les divers matériaux disponibles pour préparer des microgels sont autant de plateformes d'encapsulation de protéines et de peptides thérapeutiques. En effet, de plus en plus de preuves de concept sont publiées, démontrant que les microgels sont bien des formes adaptées à l'encapsulation et à la délivrance de protéines et de peptides. Cependant, à chaque matériau correspondent des contraintes de préparation et des caractéristiques physicochimiques particulières. Ces paramètres conditionnent notamment les modalités d'incorporation des protéines et peptides à la formule, ainsi que les conditions de leur libération.

### **II.2.1. Incorporation de la substance active à la formulation**

Les substances biologiques actives sont par nature fragiles, comme décrit dans les parties précédentes. La méthode d'incorporation de ces molécules au reste de la formule doit donc être pensée pour ne pas entraîner leur dégradation (76). La première méthode, la plus facile à mettre en œuvre, est de dissoudre la molécule active dans la solution aqueuse contenant les polymères avant réticulation. En réticulant, les microgels vont ainsi piéger les protéines dissoutes, garantissant une efficacité d'encapsulation importante. Cependant, les réactions de réticulation se déroulent parfois dans des conditions trop agressives pour les protéines à encapsuler. Le risque est alors de dénaturer ces molécules fragiles. Dans ce cas, il est

possible de recourir à une deuxième méthode, plus respectueuse de l'intégrité de l'actif. Cette méthode consiste à réticuler préalablement des microgels blancs, pour ensuite les laisser gonfler dans une solution de protéine. Cette dernière diffuse alors passivement vers l'intérieur des microgels. Cependant, cette méthode présente une efficacité limitée, notamment pour les grosses molécules, dont la pénétration peut être empêchée si la taille de maille du gel est trop faible. De plus, certains microgels présentant des taux de réticulation très hauts peuvent ne pas présenter de propriétés de gonflement importantes. Ainsi, puisqu'aucune des deux méthodes n'est idéale, il revient au formulateur de choisir la plus adaptée en fonction du système étudié.

## **II.2.2. Libération de la substance active**

Une fois la protéine d'intérêt encapsulée dans les microgels, ces derniers vont permettre le transport de l'actif vers le tissu cible et l'y libérer. Selon la pathologie traitée, le tissu ciblé, et le matériau choisi, plusieurs modalités de libération de l'actif sont possibles.

### **II.2.2.1. Microgels à libération passive**

Une première grande catégorie de microgels rassemble les systèmes libérant leurs actifs de manière passive. En effet, par leur simple présence en milieu aqueux, ces systèmes vont laisser diffuser les molécules encapsulées vers le compartiment extérieur. Cette diffusion peut être facilitée par le gonflement ou la dégradation progressive du réseau polymérique.

A noter que la plupart des systèmes à libération passive développés jusqu'à présent le sont en amont de toute considération thérapeutique. En effet, si l'emploi futur comme système de délivrance de médicament est souvent mentionné, aucun contexte pathologique n'est cité. Cela explique que les protéines utilisées dans ces études sont souvent la BSA ou le lysozyme. Ces protéines, souvent considérées comme des protéines « modèles », n'ont pas d'intérêt thérapeutique. Elles ont cependant l'avantage d'être peu onéreuses, et de présenter des masses molaires et des points isoélectriques différents. En effet, la BSA a une masse molaire de 66 kDa (77) pour un point isoélectrique d'environ 5 (78) : elle est donc chargée négativement à pH = 7 (qui est souvent le pH des milieux de libération). Le lysozyme quant à lui est une enzyme de masse molaire de 15 kDa (79), avec un point isoélectrique de 11 (80) : il est donc sous sa forme cationique dans un milieu de libération à pH = 7. Ces deux protéines ont ainsi des caractéristiques assez différentes pour permettre de modéliser des situations d'encapsulation diverses.

Parmi les microgels à libération passive décrits dans la littérature, on trouve une majorité de microgels chimiques. Les polymères les constituant, de natures très variées, sont parfois terminés par des groupements acryliques permettant la réticulation covalente entre les chaînes. Parmi ces microgels, on trouve des microgels de PEG (81,82), de pullulane (81), de dextrane (83), et de poly(acide acrylique) (84). Mais d'autres types de réticulations covalentes sont représentées. Certains microgels sont constitués de chaînes d'amidon oxydé, permettant une réticulation par réaction avec du triméthylphosphate de sodium (85). D'autres encore sont composés d'acide hyaluronique couplé à de la tyramine : c'est la réaction entre deux tyramines qui permet la réticulation chimique (86).

Il existe aussi quelques microgels physiques permettant la libération passive de protéines ou de peptides. Le chitosane a ainsi été utilisé pour encapsuler des toxines à visée vaccinale. La réticulation est réalisée classiquement, par ajout de polyphosphate (56). Certaines études décrivent aussi des gels d'alginate réticulés par des ions  $Ca^{2+}$ . Par exemple, une étude décrit

la délivrance de facteurs angiogéniques à proximité de greffes d'organes, grâce à ces gels d'alginate (87).

Notons tout de même que ces deux derniers exemples, s'ils sont présentés comme des microgels libérant passivement leur protéine, sont en réalité probablement des microgels à libération pH-dépendante. En effet, les études de libération présentées sont réalisées à pH = 7. Or, d'autres études montrent que des microgels de chitosane ou d'alginate ne libèrent leur protéine qu'à pH = 7, et beaucoup moins aux autres valeurs de pH (88–90). Les deux systèmes présentés pourraient ainsi être mis à profit pour libérer leurs actifs de façon pH-dépendante. Car c'est bien souvent comme cela que sont conçues les formes pharmaceutiques innovantes : avec l'objectif de délivrer l'actif qu'elles encapsulent seulement dans des conditions particulières, caractéristiques du site cible. Dans ce contexte, les formes à libération stimulus-dépendante tirent naturellement leur épingle du jeu.

### **II.2.2.2. Microgels à libération stimulus-dépendante**

Certains microgels sont développés pour libérer leur contenu seulement quand certaines conditions environnementales sont réunies : ce sont des formes stimulus-dépendantes (4). Le stimulus déclenchant la libération de l'actif étant spécifique du site cible, il convient d'abord de déterminer et de comprendre la pathologie à traiter. Ainsi, ces microgels sont souvent conçus dès le départ de l'étude pour répondre à un stimulus donné, dans un contexte pathologique bien défini.

C'est ainsi qu'ont été développés plusieurs microgels encapsulant de l'insuline, en vue du traitement du diabète de type I. Certains systèmes, relativement basiques, permettent une libération température-dépendante de la protéine (91). Ces microgels chimiques, faits de poly(N-isopropylacrylamide), se contractent sous l'effet de températures supérieures à 30°C, générant un flux sortant d'insuline. La protéine est ainsi libérée seulement après administration des microgels dans l'organisme. D'autres systèmes réagissent quant à eux aux variations de pH, ce qui leur permet de protéger l'insuline après une administration orale (88). Ces microgels physiques, constitués de chitosane et de tripolyphosphate, ne libèrent l'insuline qu'une fois un pH de 7,4 établi. En effet, à ce pH, le chitosane se déprotone et entraîne la désagrégation des microgels. La libération de l'insuline est ainsi programmée pour ne pas s'effectuer lors de la traversée des compartiments acides du tube digestif, mais seulement après l'absorption intestinale des microgels (le pH du milieu intercellulaire étant de 7,4). Enfin, d'autres systèmes de délivrance de l'insuline, particulièrement sophistiqués, permettent la libération de la protéine en fonction de la quantité de glucose présente alentour. C'est le cas de certains microgels chimiques de méthacrylate de concanavaleine A, réticulée de façon covalente par du méthacrylate de dextrane (92). Au sein de ces microgels chargés en insuline, des interactions s'opèrent entre la concanavaleine A et les glucoses du dextran, formant un réseau polymérique aux mailles très petites, ce qui immobilise l'insuline. En présence de glucose libre dans le milieu environnant (au cours d'un pic glycémique par exemple), ce dernier entre en compétition avec le dextrane pour occuper les sites de liaison à la concanavaleine A. Ce faisant, le glucose élargit la maille du réseau, rendant possible la libération de l'insuline. Un dernier système plus complexe encore, est constitué de chitosane réticulé physiquement. Ces microgels embarquent non seulement l'insuline à libérer, mais aussi une enzyme, la glucose oxydase (93). En présence de glucose, ce dernier est oxydé par l'enzyme, ce qui donne lieu à une libération de protons H<sup>+</sup> et une acidification du milieu. Le chitosane, riche en groupement -NH<sub>2</sub>, va se protoner (-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) et se charger positivement. La répulsion électrostatique nouvellement

établie au sein du gel entraîne son gonflement et l'ouverture de ses mailles, ce qui permet la diffusion de l'insuline vers l'extérieur.

Si l'insuline est un exemple emblématique de l'utilisation de protéines thérapeutiques, elle n'est pas la seule à faire l'objet d'une libération stimulus-dépendante. Par exemple, la  $\beta$ -galactosidase a été encapsulée dans des microgels physiques d'alginate, pour le traitement des intolérances au lactose (89). Présentant de nombreux acides carboxyliques, les alginates sont donc très sensibles au pH. Et lorsque les microgels arrivent au duodénum, le pH (environ 7) est supérieur au  $pK_a$  (d'une valeur de 3,5) des alginates, forçant l'ionisation de ses groupements carboxyles. Une répulsion électrostatique s'installe au sein des microgels, qui gonflent et libèrent la  $\beta$ -galactosidase qui peut alors jouer son rôle dans la digestion du lactose. Toujours parmi les formes pH-dépendantes, mais sur un principe légèrement différent, une équipe propose des microgels chimiques de polyacrylamides réticulés par des molécules dégradables en milieu acide. Ces microgels, dont l'objectif est d'encapsuler des antigènes à visée vaccinale, seront ainsi rapidement dégradés une fois dans les lysosomes des cellules immunitaires présentatrices d'antigènes (94).

Lorsque le compartiment ciblé est le cytoplasme des cellules, il est possible de mettre à profit un autre paramètre : sa forte concentration en glutathion. Cette molécule est un réducteur puissant qui peut notamment cliver des ponts disulfures. Ainsi, on trouve des microgels chimiques de polylysine réticulés par une molécule contenant un pont disulfure. Ces systèmes, qui ont permis d'encapsuler différentes protéines modèles, libèrent ces protéines en présence de glutathion (95). Des microgels chimiques de dérivés acryliques de PEG ont conduit à des résultats similaires (96), permettant de garder les microgels intacts jusqu'à leur pénétration dans le cytoplasme des cellules cibles.

Enfin, il faut noter l'existence de microgels à libération protéase-dépendante. Un exemple est celui de microgels chimiques de gélatine, encapsulant des facteurs ostéogènes. Injectés à proximité d'un os en ostéolyse, ces systèmes sont dégradés par les collagénases responsables de la dégradation de l'os. Ils peuvent ainsi libérer les facteurs ostéogènes qui permettent la régénération osseuse (45). Sur un principe totalement différent, une équipe a fonctionnalisé des microgels chimiques de PEG-acrylamide en y greffant des peptides sous forme zwitterionique (le microgel est ainsi globalement neutre). Sous l'action de protéases, ces peptides sont clivés, et des résidus restants, chargés, entraînent un gonflement du microgels par répulsion électrostatique. Les protéines encapsulées peuvent alors diffuser vers l'extérieur (97).

### **II.3. Cas particulier des microgels de polymères silylés**

On a vu l'extrême adaptabilité des microgels, dont les caractéristiques peuvent notamment être modulées par la nature de la matrice polymérique. Il se dégage cependant une majorité d'études portant sur des microgels chimiques, dont les polymères sont réticulés par réaction entre des résidus acryliques. Ce type de réticulation présente certes l'avantage d'être très rapide et facile à réaliser (par exposition aux UV par exemple). Cependant, ce type de réticulation passe par la génération de radicaux libres. Or, ces radicaux peuvent dégrader le matériel biologique à encapsuler (98,99), ce qui ne permet pas toujours une encapsulation simple des protéines, qui doivent alors être incorporées *a posteriori*. Cette méthode d'incorporation est contraignante et peu efficace, ce qui doit pousser la communauté scientifique à proposer d'autres processus de réticulation, plus respectueux de la molécule à encapsuler. Dans ce contexte, des alternatives aux dérivés acryliques apparaissent, comme

la réticulation par des liaisons thiolènes. Cette dernière est probablement une des solutions les plus adaptables à ce jour, car applicable à différents types de polymères. Mais une autre alternative se dessine, basée sur la chimie sol-gel du silicium.

### II.3.1. Polymères silylés et biomatériaux

Récemment, une nouvelle famille d'hydrogels a été développée, basée sur le principe bien décrit de la chimie sol-gel du silicium. Elle repose sur la fonctionnalisation de polymères avec des résidus alkoxy-silyles  $-\text{Si}(\text{OR})_3$ , qui permettent une réticulation entre chaînes polymériques par formation de liaisons covalentes de type siloxane Si-O-Si. Ces polymères silylés peuvent par exemple entrer dans la composition de matrices de culture cellulaire 3D (100–105), utilisables pour des essais *in vitro* ou pour synthétiser des organes artificiels (ingénierie tissulaire).

Ainsi, de l'(hydroxypropyl)méthylcellulose silylée, biocompatible et injectable, a été utilisée pour ce type d'applications biomédicales (105). Elle a même été utilisée pour préparer des microgels destinés à de la co-encapsulation de principes actifs (106). A noter que sa réticulation est possible en quelques minutes, dans des conditions physiologiques de température et de pH, et sans addition de catalyseur de type fluorure de sodium, couramment utilisé pour ce type de réaction. La silylation est aussi possible sur l'hydroxyéthylcellulose (107), un autre polysaccharide.

Il est aussi possible de fonctionnaliser des peptides par silylation (108). Cela a par exemple été réalisé sur des peptides antibactériens (109), ou encore sur un dérivé du collagène (102).

De façon analogue, des polymères synthétiques peuvent être utilisés pour la préparation d'hydrogels. C'est le cas du PEG (101). Sa réticulation s'effectue en 15 minutes, après mise en solution à pH 7,4 et à 37°C. Cependant, une concentration de fluorure de sodium supérieure au seuil toxique a été nécessaire pour obtenir un temps aussi court. En effet, le principal inconvénient de ce type de réticulation reste le temps de gel long en conditions douces, sans catalyseur. Il est souvent trop loin des temps de gel des dérivés acryliques (en général quelques secondes) et des thiolènes (20 à 90 minutes (62)). Cependant, plusieurs paramètres sont à notre portée pour améliorer ces temps de réticulation encore trop importants.

### II.3.2. Chimie sol-gel des alkoxy-silyles

Les données citées précédemment sous-entendent que le pH, la température ou l'utilisation de catalyseurs sont des paramètres clés pour moduler les conditions de réticulation des hydrogels silylés. Ces paramètres affectent en effet la réactivité de la fonction alkoxy-silyle.

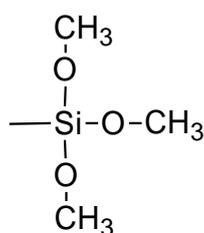


Figure 2 : Le triméthoxysilyle, exemple de fonction alkoxy-silyle

Cette dernière comporte des chaînes alkoxydes, liées à un atome de silicium. La Figure 2 en est un exemple. Les fonctions alkoxydes sont très utilisées en chimie sol-gel, car elles permettent de réaliser une polymérisation en milieu aqueux (100,110). En effet, dès sa mise en solution, la fonction alkoxyde subit une hydrolyse, dont le principe général est donné Figure 3. L'alkoxyde, considéré comme une forme protégée, libère un alcool et devient un silanol, plus réactif.

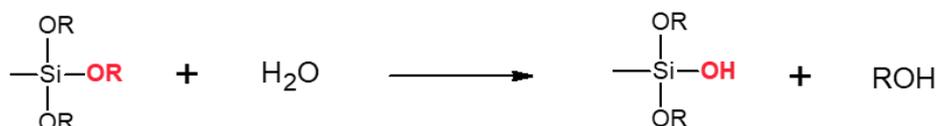


Figure 3 : Réaction d'hydrolyse de la fonction alkoxyde

La molécule hydrolysée peut alors participer à une réaction de condensation avec une autre molécule silylée, hydrolysée ou non (Figure 4). Cette réaction a pour résultat la formation d'une liaison siloxane.

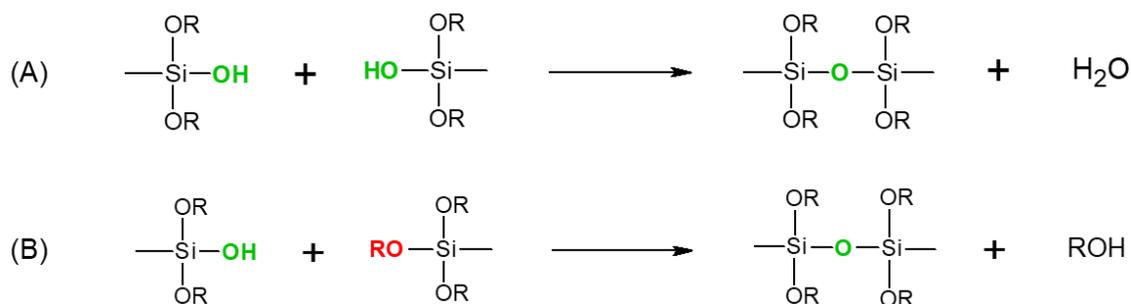


Figure 4 : Réaction de condensation de deux fonctions silanol (A) ou d'une fonction silanol et d'une fonction alkoxyde (B)

Hydrolyse et condensation ont lieu en même temps au sein de l'échantillon, comme l'illustre la Figure 5. Cependant, ces réactions se déroulent bien souvent à des vitesses différentes. Le paramètre principal influençant ces vitesses relatives est le pH du milieu. Schématiquement :

- A pH inférieur à 4 et supérieur à 9, l'hydrolyse est favorisée par rapport à la condensation,
- Aux pH situés entre 4 et 9, la condensation est favorisée par rapport à l'hydrolyse.
- A noter qu'à pH neutre, l'hydrolyse est quasi-nulle, alors que la condensation est maximale.

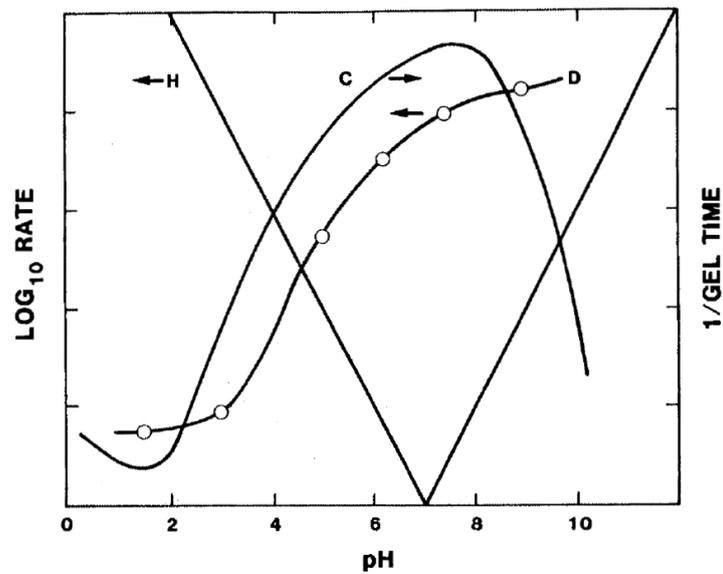


Figure 5 : Représentation schématique de la pH-dépendance du taux d'hydrolyse (H), de la vitesse de condensation (C), et du taux de redissolution des espèces condensées (D) (110)

Ainsi, si des polymères fonctionnalisés par des résidus alcoxysilyles tendent naturellement à former des gels une fois mis en solution, on note que la cinétique de réticulation dépend du pH. Et ce n'est pas le seul paramètre influent : certaines publications mettent par exemple en évidence les effets de la température sur la vitesse de réticulation (105,107). On aperçoit ainsi les différents paramètres à optimiser pour accélérer la réticulation des polymères silylés sans utiliser de catalyseur fluoré. On peut donc envisager un nouveau mécanisme de réticulation de microgels chimiques, plus respectueux du matériel biologique encapsulé.

## III. La microfluidique : un procédé simple et modulable

---

### III.1. Diversité des méthodes de préparation de microgels

L'encapsulation de protéines et/ou de petites molécules dans des microgels a, comme on l'a vu dans la partie II.2.2, fait l'objet de nombreuses publications. Si le matériau est un paramètre très important, le procédé de formulation des microgels ne doit cependant pas être négligé. Les méthodes sont très diverses, et il convient d'en faire l'état des lieux, pour pouvoir choisir le procédé le plus pertinent. Nous excluons volontairement les méthodes de polymérisation à partir de monomères, pour nous focaliser sur les méthodes mettant en jeu des polymères préformés.

De façon générale, la réticulation s'effectue au sein d'une phase aqueuse dispersée dans une phase continue huileuse (111). L'émulsion E/H peut être générée par différents procédés, comme l'émulsification en cuve avec turbine (63), l'homogénéisation haute pression (111) ou l'émulsification par extrusion à travers une membrane (112). Les techniques de microfluidique sont plus récentes et possèdent des avantages que nous détaillerons dans la section suivante. La réticulation est ensuite induite au sein des gouttelettes d'eau, appelées microréacteurs, *via* un stimulus. Ce dernier peut être une modification de la température (113), une exposition aux UV (68), ou un apport d'ions (54,114).

Un procédé analogue à l'émulsification permet de produire des nanogels, par réticulation de polymères au sein de micelles inverses (115,116). La phase huileuse est chargée en tensioactifs lipophiles, donnant une solution micellaire huileuse. Dans cette dernière est incorporée lentement la phase aqueuse contenant le polymère. Cette phase aqueuse se répartit dans les micelles, les faisant gonfler, ce qui donne une microémulsion. La réticulation génère alors des gels de la taille des micelles, donc nanométriques.

Certaines équipes utilisent aussi le principe de « gélification ionique » sans passer par un système dispersé. On peut citer l'exemple d'une solution d'alginate injectée par la buse d'un atomiseur dans un bain d'ions calcium agité (48). Les gouttelettes réticulent au contact du calcium, donnant des microgels. La technique de gélification ionique peut aussi être appliquée à une solution de chitosane, au contact d'une solution de polyanion (du tripolyphosphate, par exemple). Cette réaction a été très utilisée après la publication des travaux de Bodmeier *et al.* en 1989 (117).

Tous les procédés décrits jusqu'à présent sont de type « *bottom-up* ». Cependant, il existe aussi des procédés dits « *top-down* », qui consistent à générer des objets macroscopiques, puis à les transformer en microgels (procédés descendants). Certains chercheurs synthétisent des macrogels, qu'ils divisent ensuite en microgels par extrusion contre un tamis (118,119). D'autres utilisent la technique de photolithographie (69), où la solution de polymère est étalée sur une surface, pressée par un poinçon gravé à la forme du microgel désiré, puis réticulée par exposition aux UV. Sur le même principe, il est possible de couler la solution de polymère dans des micromoules avant exposition aux UV (120).

### III.2. Le procédé microfluidique

#### III.2.1. Généralités

Si les procédés d'obtention de microgels sont très nombreux, le procédé microfluidique se détache nettement du fait de ses nombreux avantages. Les techniques de microfluidique

permettent de réaliser des opérations de mélanges liquide-liquide et/ou d'émulsification au sein de canaux dont le diamètre interne est compris entre 50 et 500  $\mu\text{m}$ . Une émulsification assistée par microfluidique peut ainsi faire partie intégrante d'un procédé de synthèse de microparticules. Elle présente de nombreux avantages, comme son faible coût énergétique et l'économie en matières premières qu'elle permet de réaliser. Sa modularité et son automatisation complète laissent notamment la possibilité d'une production en continu. Enfin, elle permet un contrôle fin de la morphologie (forme, taille, distribution) et de la composition chimique de la phase dispersée (121,122) : deux critères importants dans le contexte de la préparation d'un système galénique.

Les circuits de microfluidique peuvent se présenter sous la forme d'un assemblage de capillaires et de jonctions, reliés à des injecteurs. Ces systèmes ont l'avantage d'être aisément modulables. En effet, ils sont faciles à monter et à démonter, ce qui permet le changement aisé des capillaires et des jonctions, les rendant très utiles dans les phases préliminaires d'optimisation de la géométrie du circuit.

Les circuits sur puces sont quant à eux obtenus par lithographie, souvent sur du polydiméthylsiloxane. Ils permettent la conception de circuits sophistiqués permettant par exemple la réalisation en ligne de la co-encapsulation de molécules d'intérêts, de cellules vivantes, de nanoparticules, ou encore la formation d'émulsions multiples et de microparticules compartimentées (123–125). Ces circuits présentent aussi l'avantage de limiter la variabilité inter-lots des émulsions produites.

Cette technologie ouvre des possibilités dans de multiples domaines, dont la micro-encapsulation. Elle demande néanmoins des phases de mise au point et d'optimisation importantes.

### III.2.2. Paramètres influençant l'émulsification en microfluidique

La génération d'une émulsion en microfluidique est régie par de nombreux paramètres, qui sont souvent étudiés grâce au nombre capillaire  $Ca$  (122,126–128). Ce dernier est un nombre adimensionnel, dont l'expression est donnée en Équation 3. Il peut être calculé pour la phase dispersée ( $Ca_d$ ) et pour la phase continue ( $Ca_c$ ).

$$Ca_c = \frac{Q_c \cdot \eta_c}{S \cdot \gamma} \quad \text{et} \quad Ca_d = \frac{Q_d \cdot \eta_d}{S \cdot \gamma}$$

Où :  $Ca_{c,d}$  : Nombre capillaire (SU)  
 $Q_{c,d}$  : Débit ( $\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ )  
 $\eta_{c,d}$  : Viscosité dynamique (Pa.s)  
 $\gamma$  : Tension interfaciale ( $\text{N} \cdot \text{m}^{-1}$ )  
 $S$  : Section interne du canal ( $\text{m}^2$ )

Équation 3 : Expressions des nombres capillaires de la phase continue  $Ca_c$  et de la phase dispersée  $Ca_d$

Lorsque la phase dispersée rencontre la phase huileuse, elle subit l'influence des forces capillaires, représentées par la tension interfaciale. L'interface a alors tendance à se courber, pour former des gouttelettes. Mais à ce phénomène s'opposent la viscosité et l'inertie de la

phase dispersée, qui favorisent quant à elles plutôt la formation d'un jet. Ces trois forces composent le nombre capillaire de chaque phase, qui possède une valeur prédictive. Il permet de savoir si le système va générer des gouttelettes (*dripping regime*), ou bien un jet (*jetting regime*) au sein de la phase continue. Cependant, les valeurs de  $Ca_c$  et de  $Ca_d$  marquant la transition entre la formation de gouttelettes et la formation d'un jet varient d'un système à l'autre. Cela rend donc ces prédictions relatives. Certains auteurs avancent toutefois que cette transition correspond à  $Ca_c \approx Ca_d \approx 1$  (126). Quoiqu'il en soit, tout facteur modifiant la vitesse de déplacement, la viscosité ou la tension interfaciale modifie les phénomènes au point de rencontre entre les deux phases.

La qualité de l'émulsification, ainsi que les caractéristiques de l'émulsion, varient aussi selon la géométrie du point de rencontre. Trois géométries peuvent être utilisées, comme l'illustre la Figure 6. De façon générale, la géométrie de type co-axiale permet en particulier la formation d'émulsions multiples ou de microcapsules, bien que ce type d'objets puisse aussi être généré avec les autres géométries. Les géométries dites de « focalisation de flux » (*flow-focusing*) et « en T » permettent quant à elles un plus grand contrôle de la taille des gouttelettes.

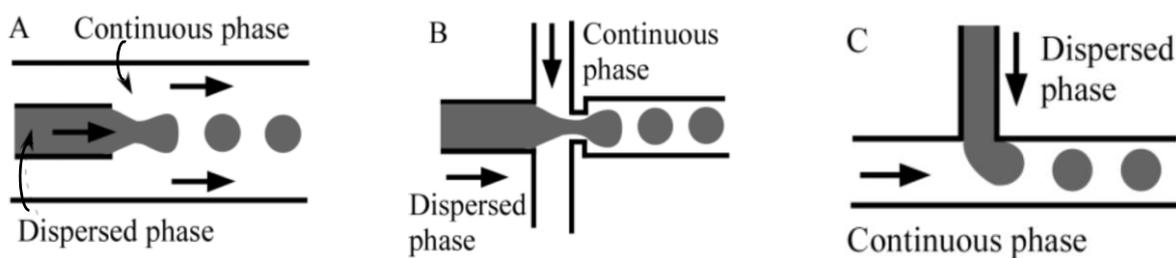


Figure 6 : Géométries les plus rencontrées pour l'émulsification en microfluidique : Géométrie co-axiale (A), Géométrie de « focalisation de flux » (B), Géométrie en T (C) (126)

### III.2.3. Microgels synthétisés par microfluidique

Ces dernières années, la synthèse de microgels assistée par microfluidique tend à se développer. Certaines équipes choisissent de générer des microgels physiques (49–51,53,54,113,129–131), d'autres des microgels chimiques (62,71,74,123,124,132–135). Parmi ces derniers, il convient de noter que le PEG est souvent considéré comme le polymère de choix (62,70,123,124,130,131,133–135), du fait notamment de sa biocompatibilité connue de longue date (136). Ces PEG sont modifiés pour permettre la réticulation, qui se fait la plupart du temps par réaction entre résidus acryliques ou par addition de Michael (liaisons thiolènes).



**Deuxième partie :**  
**RESULTATS EXPERIMENTAUX**



## I. Objectifs

---

Il ressort de la revue bibliographique que de nombreux microgels sont développés dans le but d'encapsuler des protéines thérapeutiques. Leur préparation, parfois assistée par microfluidique, passe cependant trop souvent par l'utilisation de polymères fonctionnalisés par des acrylates. La réticulation de ces derniers passant par la génération de radicaux libres, il est souhaitable de proposer des alternatives plus respectueuses des protéines à encapsuler. C'est dans ce contexte qu'intervient le travail présenté ici, portant sur des microgels de PEG bis-silylés. Le développement d'une telle technologie devait cependant, pour être pertinent, répondre au cahier des charges suivant :

- Le procédé sol-gel doit se faire :
  - Dans des conditions opératoires douces (température ambiante et pH neutre), afin de permettre l'encapsulation de matériel biologique,
  - De façon contrôlée, par application d'un stimulus,
  - Rapidement, en quelques heures tout au plus, mais sans catalyseur toxique, pour une administration sans risque pour le patient.
- Les microgels doivent :
  - Présenter une homogénéité de forme et de taille,
  - Permettre une libération prolongée des protéines et/ou des peptides encapsulés.

Le développement de ces microgels a donc été réalisé selon une approche rationnelle, qui comprenait quatre axes principaux :

- Des études sur macrogel, visant à comprendre et maîtriser les mécanismes de réticulation du PEG-Si en conditions douces,
- La préparation en microfluidique de microgels blancs ou chargés en protéine modèle :
  - Génération d'une émulsion E/H stable,
  - Induction de la réticulation dans les microréacteurs selon les conditions définies lors des études sur macrogel,
- La caractérisation morphologique et mécanique des microgels obtenus,
- L'étude de la libération de la protéine modèle encapsulée.

## II. Matériel et Méthodes

### II.1. Matériel

Le polymère était un PEG de masse molaire  $2000 \text{ g.mol}^{-1}$ , silylé à ses 2 extrémités (PEG-Si,  $M = 2496 \text{ g.mol}^{-1}$ ), fourni sous forme solide. La synthèse de ce PEG-Si est illustrée en Figure 7. Brièvement, elle consiste en la réaction entre les hydroxydes terminaux du PEG et le 3-isocyanatopropyltriéthoxysilane. La réaction a été réalisée dans du tétrahydrofurane chauffé à reflux pendant 48h, en présence de triéthylamine (100). Le PEG-Si ainsi synthétisé était purifié, et conservé à l'état solide, sous atmosphère inerte à  $-20^\circ\text{C}$  pour éviter une hydrolyse/condensation non contrôlée.

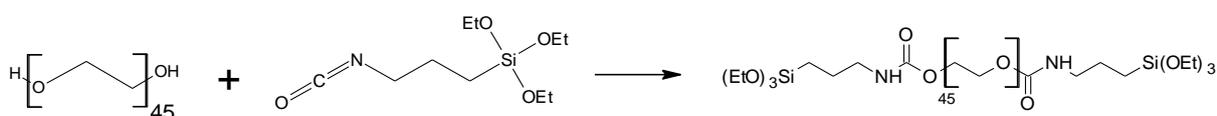


Figure 7 : Synthèse du PEG-Si (100)

L'acide citrique ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ ,  $M = 192 \text{ g.mol}^{-1}$ ), l'hydrogénophosphate de sodium ( $\text{NaHPO}_4$ ,  $M = 142 \text{ g.mol}^{-1}$ ), le phosphate de monopotassium ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $M = 142 \text{ g.mol}^{-1}$ ), l'acide chlorhydrique 37 % ( $\text{HCl}$ ,  $M = 36 \text{ g.mol}^{-1}$ ), et l'hydroxyde de sodium ( $\text{NaOH}$ ,  $M = 40 \text{ g.mol}^{-1}$ ) ont été fournis par Sigma-Aldrich. La paraffine liquide épaisse CODEX ( $\eta_{20^\circ\text{C}} = 110\text{-}230 \text{ mPa.s}$ ) a été fournie par Comptoir Français Interchimie. Le monooléate de sorbitane (Span 80,  $\text{HLB} = 4,3$ ), a été fourni par Croda, le polyglyceryl-3 diisostéarate (Plurol diisostéarate,  $\text{HLB} = 8,5$ ) par Gattefossé et le PEG-12 diméthicone (CSS-7301,  $\text{HLB} = 13$ ) par Nusil. Enfin, l'éther diéthylique était fourni par Panreac.

Pour le système microfluidique, les seringues Plastipack Luer-Lock de 1, 3 et 50 mL étaient fournies par Becton-Dickinson. La société Upchurch Scientific (IDEX Corporation) a fourni quant à elle les capillaires en polyétheréthercétone (PEEK) de diamètre interne  $500 \mu\text{m}$ , les noix, les férules, et les jonctions en PEEK de différentes formes. Parmi ces dernières, on compte deux jonctions en Y (chacune de volume interne =  $1,7 \mu\text{L}$ ), une jonction en croix (volume interne =  $3,8 \mu\text{L}$ ), ainsi qu'une jonction « collectrice » à 9 ports (volume interne =  $139 \mu\text{L}$ ). La mise en mouvement des fluides et le contrôle de leurs débits respectifs était gérés par deux pousse-seringues Pump 33 (Harvard Apparatus) équipés chacun de deux voies indépendantes.

Pour le dosage de la BSA, le kit micro BCA était fourni par Thermo Fisher Scientific.

### II.2. Etude du mécanisme de réticulation sur macrogels

#### II.2.1. Etude macroscopique : effet du pH et de la concentration en PEG-Si sur la cinétique de réticulation

Sur la base des données de la littérature notamment présentées en Figure 5 (110), l'hypothèse fut faite qu'un procédé de réticulation en deux étapes permettrait d'optimiser le temps de gel. Dans un premier temps dit « d'hydrolyse accélérée », une solution de PEG-Si à pH acide permettrait l'hydrolyse rapide des alcoxysilanes. La neutralisation de la solution

initierait ensuite la deuxième étape : à pH neutre, on favoriserait plutôt les réactions de condensation. Ce pH neutre constituerait de plus un environnement favorable à l'incorporation de protéines et de peptides thérapeutiques. L'étude macroscopique a alors été conçue autour de cette hypothèse, qui fut vérifiée ultérieurement.

Chaque macrogel, d'un volume d'1 mL, était réalisé en tube Eppendorf de 1,5 mL fermé, à 25°C. Le milieu aqueux était tamponné : en effet, le pH étant supposé être un facteur déterminant dans la cinétique de réticulation, il convenait d'assurer sa stabilité dans le temps. Le procédé se déroulait en deux étapes, comme le montre la Figure 8 :

- Le PEG-Si était mis en solution dans 1 mL de tampon à un pH acide donné, préparé selon les proportions décrites dans le Tableau 1. Cette solution tampon, que l'on appellera « tampon Citrate/Phosphate (0,05 M/0,1 M) », contient en fait deux systèmes tampons nous permettant de stabiliser le pH sur une large gamme (de 1 à 8). La solution de PEG-Si était ensuite agitée toutes les demi-heures par retournement, et ce pendant un temps d'hydrolyse accélérée  $t_h$ .
- A l'issue du temps  $t_h$ , la solution était neutralisée à pH = 7,5 par ajout d'une solution d'hydroxyde de sodium 4 M. Cette forte concentration a été choisie pour limiter les effets de dilution qui pourraient affecter la concentration en PEG-Si.

Les échantillons étaient alors retournés toutes les demi-heures, afin de les homogénéiser et de contrôler l'état d'avancement de la réticulation. Le temps de gel  $t_{gel}$  est le temps écoulé entre la neutralisation de l'échantillon et son passage de l'état liquide à l'état solide. Il était apprécié macroscopiquement, en considérant l'échantillon comme réticulé lorsqu'il ne s'écoulait plus lors d'un retournement de 5 secondes.

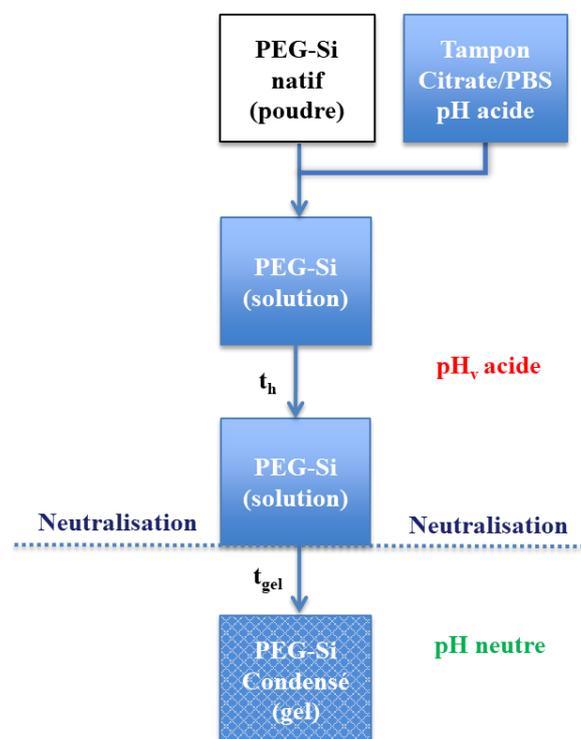


Figure 8 : Procédé de réticulation de la solution de PEG-Si utilisé au cours du balayage des conditions opératoires

Un balayage de trois variables opératoires a été réalisé afin de trouver rapidement les conditions permettant une réticulation rapide. Les trois variables de l'expérience étaient :

- La concentration en PEG-Si ([PEG-Si]), variable à trois niveaux (10, 20 et 30 % m/V),
- Le pH initial de la solution de PEG-Si, nommé pH d'hydrolyse accélérée ( $pH_h$ ), variable à trois niveaux (1, 3, et 4,9),
- Le temps d'hydrolyse accélérée ( $t_h$ ), variable à trois niveaux (1, 3 et 24 h), défini comme le temps entre la mise en solution à  $pH_h$  et la neutralisation.

Dans ces conditions, le plan de balayage comportait 27 essais. A noter que la quantité de soude 4M à ajouter à la solution de PEG-Si pour la neutraliser après le temps d'hydrolyse accélérée  $t_h$  dépendait du  $pH_h$  de cette dernière. Les volumes de soude ajoutés pour atteindre un pH de 7,5 étaient de :

- 35  $\mu$ L si  $pH_h = 4,9$ ,
- 55  $\mu$ L si  $pH_h = 3$ ,
- 108  $\mu$ L si  $pH_h = 1$ .

Tableau 1 : Composition des trois tampons Citrate/Phosphate (0,05 M/0,1 M) utilisés au cours du plan de balayage

Solutions composant le tampon	Proportions utilisées pour la réalisation des 3 tampons (% v/v)		
	Tampon Citrate/ Phosphate pH = 1	Tampon Citrate/Phosphate pH = 3	Tampon Citrate/Phosphate pH = 4,9
Acide citrique 0,1 M	47,71	49,36	50
Hydrogénophosphate de sodium 0,2 M	47,71	49,36	50
Acide chlorhydrique 5 M	4,58	1,28	0

## II.2.2. Etude spectroscopique : cinétique d'hydrolyse/condensation à $pH_h = 4,9$ par RMN $^1H$

A l'issue de l'étude macroscopique, les conditions de préparation de la solution de PEG-Si ont été fixées à une concentration [PEG-Si] de 20 % m/V dans 1 mL de tampon Citrate/Phosphate  $pH_h = 4,9$ . Ce choix sera détaillé ultérieurement. Pour comprendre les phénomènes moléculaires se déroulant à ce pH, une étude en RMN  $^1H$  a été réalisée. Elle avait vocation à recueillir des informations sur les cinétiques d'hydrolyse et de condensation des espèces dissoutes.

Une solution de PEG-Si à 20 % m/V a été préparée dans 1 mL de tampon Citrate/Phosphate à  $pH_h = 4,9$ . Notons qu'au sein de ce tampon, 20 % v/v de l'eau ont été remplacés par de l'eau deutérée. La solution de PEG-Si a été rapidement transférée dans un tube de RMN, et l'analyse a été lancée à 25°C sur un spectromètre Avance III - 500MHz (Bruker). Les mesures ont été réalisées à intervalles réguliers sur 24h (40 mesures), puis une fois à 6 et 9 jours. Le spectre acquis était large de 4 ppm, centré sur un déplacement chimique à 2 ppm. La séquence d'impulsion était de type « zg30 », et le délai de relaxation fixé à 1,5 s. Seize scans

ont été effectués pour chaque mesure. L'acquisition a été pilotée sur le logiciel Topspin 3.5 pl6 (Bruker).

Le traitement des spectres a été effectué sur le logiciel DMfit (137). Sur chaque spectre, les aires sous courbes (ASC) des massifs à 1,12 et 1,07 ppm ont été mesurées, ainsi que la largeur à mi-hauteur  $\omega$  (en hertz) du massif à 1,49 ppm.

### **II.2.3. Etude spectroscopique : cinétique de condensation à $\text{pH}_h = 4,9$ par Diffusion Dynamique de la Lumière (DLS)**

Pour corréler les données d'hydrolyse et de condensation recueillies en RMN avec les observations macroscopiques de réticulation, une étude en DLS a été réalisée. Elle devait nous permettre de connaître la cinétique d'agrégation des polymères, due à la condensation.

Une solution de PEG-Si à 20 % m/V dans le tampon Citrate/Phosphate à  $\text{pH}_h = 4,9$  a été placée dans une cuve en polystyrène, puis introduite dans un analyseur de granulométrie NanoZS Zetasizer (Malvern Instrument). L'évolution de la taille des éléments colloïdaux a été suivie à 25 °C sur 24 h, à raison d'une mesure toutes les 12 minutes. L'angle de détection était de 173°C, et l'atténuateur fixé en position 7. Le corrélogramme a été comparé au modèle dit « de distribution » (méthode des moindres carrés), et la méthode de calcul sélectionnée était la méthode pour « Usages généraux ». Le paramètre choisi comme témoin de l'évolution de la taille des éléments mesurés était le diamètre moyen en intensité de la population la plus représentée.

### **II.2.4. Etude rhéologique**

Des données cinétiques précises ayant été recueillies au cours des études en RMN et en DLS, une détermination rhéologique du temps de gel a ensuite été réalisée, pour affiner la mesure et étudier l'effet d'une potentielle optimisation du procédé.

Deux études de temps de gel ont été réalisées sur un rhéomètre AR 2000 (TA Instruments) en mode oscillation, équipé d'une géométrie plan-plan en inox de 2 cm de diamètre. Toutes les données rhéologiques ont été acquises grâce au logiciel AR Instrument Control (TA Instruments), puis traitées sur TA Data Analysis (TA Instruments).

#### **II.2.4.1 Cinétique de réticulation à $\text{pH}_h = 4,9$**

Une première mesure a ainsi été réalisée sur un échantillon similaire à ceux étudiés en RMN et en DLS, pour corréler des résultats obtenus à l'échelle moléculaire et nanométrique à un comportement rhéologique précis.

Ainsi, une solution de PEG-Si à 20 % m/V de volume 1 mL dans le tampon Citrate/Phosphate à  $\text{pH}_h = 4,9$  a été préparée. Une fraction aliquote de cette solution a été déposée au centre du plan Peltier de l'appareil. Une mesure sur 26h des modules élastique  $G'$  et visqueux  $G''$  en fonction du temps a alors été réalisée à 25°C. L'entrefer a été fixé à 300  $\mu\text{m}$ , la fréquence d'oscillation à 1 Hz, et l'amplitude à 10%. L'intervalle entre chaque mesure était de 3 minutes. Pour limiter l'évaporation d'eau au sein de l'échantillon, une couche de paraffine liquide a été déposée autour de l'échantillon et un piège à solvant a été installé.

#### **II.2.4.2 Cinétique de réticulation après neutralisation**

Une fois bien connus les phénomènes ayant cours pendant la phase d'hydrolyse accélérée à pH acide, une optimisation du temps de gel a été réalisée. Basée sur l'hypothèse de départ

décrite en partie II.2.1, elle consiste en la neutralisation de la solution, après un certain temps  $t_h$  passé à pH acide.

Une solution de PEG-Si à 20 % m/V dans 1 mL de tampon Citrate/Phosphate à  $pH_h = 4,9$  a été réalisée. Cette solution a été laissée sous agitation modérée pendant un temps d'hydrolyse accélérée  $t_h = 3h$ . Elle a alors été neutralisée à  $pH = 7,5$  par ajout de 35  $\mu\text{L}$  de NaOH 4 M. Une fraction de cette solution a ensuite été déposée au centre du plan Peltier, et une mesure de  $G'$  et  $G''$  en fonction du temps a été à nouveau réalisée, dans les mêmes conditions que précédemment. Le piège à solvant n'a cependant pas été installé, car l'étude n'était réalisée que sur 2h20 : la paraffine liquide suffisait à limiter l'évaporation. L'intervalle entre chaque mesure était d'une minute.

A noter que pour ces 2 études, la taille de l'entrefer a fait l'objet d'une optimisation, pour obtenir des valeurs de  $G'$  entre 1000 et 10 000 Pa. Une recherche du domaine linéaire a aussi été systématiquement réalisée sur l'état final du gel (état auquel le gel est le plus susceptible d'être déformé de façon irréversible). Les fréquence et amplitude d'oscillation choisies pour réaliser la mesure ont ainsi été validées *a posteriori*.

## II.3. Synthèse et purification des microgels

### II.3.1. Développement de la formule et du procédé de préparation des microgels blancs

#### II.3.1.1 Optimisation de la formule : stabilisation de l'émulsion

Les conditions de réticulation de la phase aqueuse étant maintenant optimisées, restait à choisir la phase huileuse adaptée à la stabilisation d'émulsions E/H. La phase huileuse était majoritairement composée de paraffine liquide épaisse. Cette huile a en effet déjà été utilisée pour générer des microgels de PEG en microfluidique (62,124). L'optimisation de l'émulsification a porté sur le tensioactif à intégrer à cette huile pour stabiliser l'émulsion E/H. Quatre formules ont été testées, dont trois avec des tensioactifs couvrant une large gamme de HLB :

1. Paraffine liquide épaisse,
2. Paraffine liquide épaisse à 2 % m/m de PEG-12 diméthicone (HLB = 13),
3. Paraffine liquide épaisse à 2 % m/m de monooléate de sorbitane (HLB = 4,3),
4. Paraffine liquide épaisse à 8 % m/m de polyglycéryl-3 diisostéarate (HLB = 8,5).

Ainsi, quatre émulsions ont été réalisées par ajout progressif d'1 mL de solution de PEG non silylé ( $M = 2000$  g/mol) de concentration 20 % m/V dans 9 mL de phase huileuse. Les émulsions ont été réalisés dans des piluliers en verre, par agitation à l'aide d'une turbine à pales inclinées de 2 cm de diamètre, pendant 10 minutes à 600 rpm. A l'issue de l'émulsification, la stabilité de chaque émulsion sur 18 h a été évaluée à l'œil nu et au microscope optique.

#### II.3.1.2 Préparation des microgels blancs par procédé microfluidique

La préparation des microgels a été réalisée à 25°C, au sein d'un système microfluidique en PEEK dont le montage est décrit en Figure 9. Son volume interne total était de 266  $\mu\text{L}$  environ. La phase aqueuse (en bleu sur la figure) était divisée en deux voies comprenant :

- Une solution de PEG-Si à 20 % m/V dans du tampon Citrate/Phosphate à  $pH_h = 4,9$ , vieillie 3h avant le début de la préparation de microgels, et contenue dans une seringue de 3 mL,

- Une solution de NaOH 4M contenue dans une seringue de 1 mL.

La solution de PEG-Si était ainsi neutralisée par la solution de NaOH au niveau d'une jonction en Y, pour initier sa réticulation. La phase aqueuse en cours de réticulation était ensuite cisailée par la phase huileuse (en orange sur la figure) au sein d'une jonction en croix dite de « focalisation de flux », générant une émulsion E/H. La phase huileuse, contenue dans une seringue de 50 mL, était composée de paraffine liquide épaisse à 2 % m/m de monooléate de sorbitane. L'émulsion était alors recueillie dans des tubes en polypropylène et laissée sous agitation pendant 24h, sur une roue verticale, dans l'objectif de limiter la sédimentation et la coalescence des gouttelettes au cours de leur réticulation.

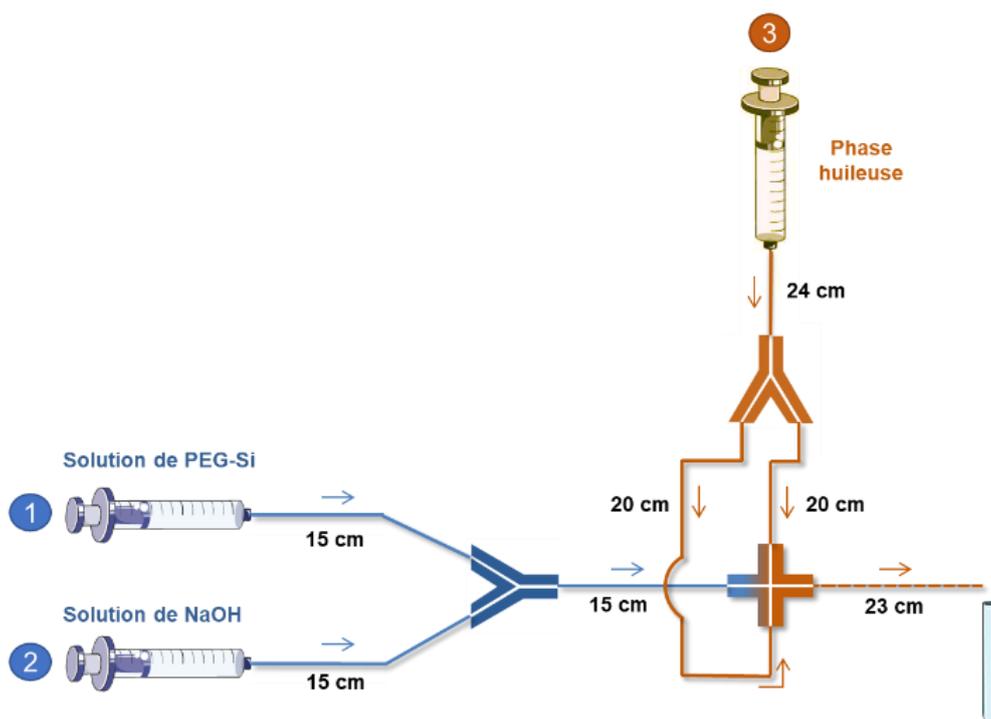


Figure 9 : Système microfluidique utilisé pour produire les microgels de PEG-Si blancs, avec en bleu (n°1 et 2) la phase aqueuse et en orange (n°3) la phase huileuse

Il y a un lien de proportionnalité entre les volumes utilisés lors d'un procédé en *bulk* et les débits utilisés lors d'un procédé microfluidique. Ainsi, le rapport de débits « PEG-Si:NaOH » a été fixé à 94,79:5,21 d'après les volumes de l'étude de réticulation macroscopique décrite dans la partie II.2. Quant au rapport entre le débit de cette phase aqueuse (PEG-Si et NaOH pris ensemble) et le débit de la phase huileuse, qui détermine en partie la formation de gouttes ou d'un jet, il a fait l'objet d'une optimisation réalisée avec du PEG non silylé ( $M = 2000 \text{ g/mol}$ ). Trois rapports « phase huileuse:phase aqueuse » ont été testés : 99:1, 95:5, et 90:10. Les débits utilisés sont résumés dans le Tableau 2. Les émulsions ont été récupérées dans des tubes en sortie du système, et leur stabilité a été contrôlée au cours du temps, à l'œil nu et au microscope optique.

Tableau 2 : Débits utilisés lors de l'optimisation du rapport des débits entre phase huileuse et phase aqueuse

Phases composant l'émulsion		Débits utilisés pour la réalisation de chaque émulsion (mL/h)		
		Ratio 99:1	Ratio 95:5	Ratio 90:10
Phase aqueuse	Solution de PEG	0,2727	1,4209	3,0000
	Solution de NaOH	0,0150	0,0781	0,1650
Phase huileuse	Paraffine + Tensioactif	28,485	28,485	28,485

Une fois cette optimisation réalisée, un lot de microgels a été préparé dans le même système, avec des débits fixés selon les données du Tableau 3.

Tableau 3 : Paramétrage des pousse-seringues pour la préparation de microgels blancs

Phases composant l'émulsion	Diamètre de seringue (mm)	Débit (mL/h)
Solution de PEG-Si	8,6600	3,0000
Solution de NaOH	4,7800	0,1650
Phase huileuse	26,700	28,485

### II.3.2. Préparation des microgels chargés en BSA par procédé microfluidique

Les microgels chargés ont été produits à 25°C, au sein d'un système microfluidique dont le montage est décrit par la Figure 10. Son volume interne total était de 332 µL. La phase aqueuse (en bleu sur la figure) était divisée en trois voies comprenant :

- Une solution de PEG-Si à 20 % m/V dans du tampon Citrate/Phosphate à pH<sub>h</sub> = 4,9, hydrolysée durant 3h et contenue dans une seringue de 3 mL,
- Une solution de NaOH 4M contenue dans une seringue de 1 mL,
- Une solution de BSA à 0,12 mg/mL dans l'eau ultrapure, contenue dans une seringue de 1 mL.

La solution de PEG-Si était, comme pour les microgels blancs, neutralisée par la solution de NaOH au niveau d'une jonction en Y. Une fois sa réticulation lancée, cette phase aqueuse se mélangeait à une solution de BSA au sein d'une jonction « collectrice ». L'angle imposé au flux au sein de cette jonction devait favoriser l'homogénéisation de la phase aqueuse. L'émulsification avait alors lieu dans la jonction en croix qui suit, avec le cisaillement par une phase huileuse identique à celle utilisée pour les microgels blancs (paraffine liquide épaisse à 2 % m/m de monooléate de sorbitane). L'émulsion était alors recueillie dans des tubes en polypropylène et laissée sous agitation pendant 24h, sur une roue verticale. La réticulation pouvait alors se poursuivre au sein des gouttelettes d'eau contenant la BSA, jusqu'à obtention de microgels chargés en protéine.

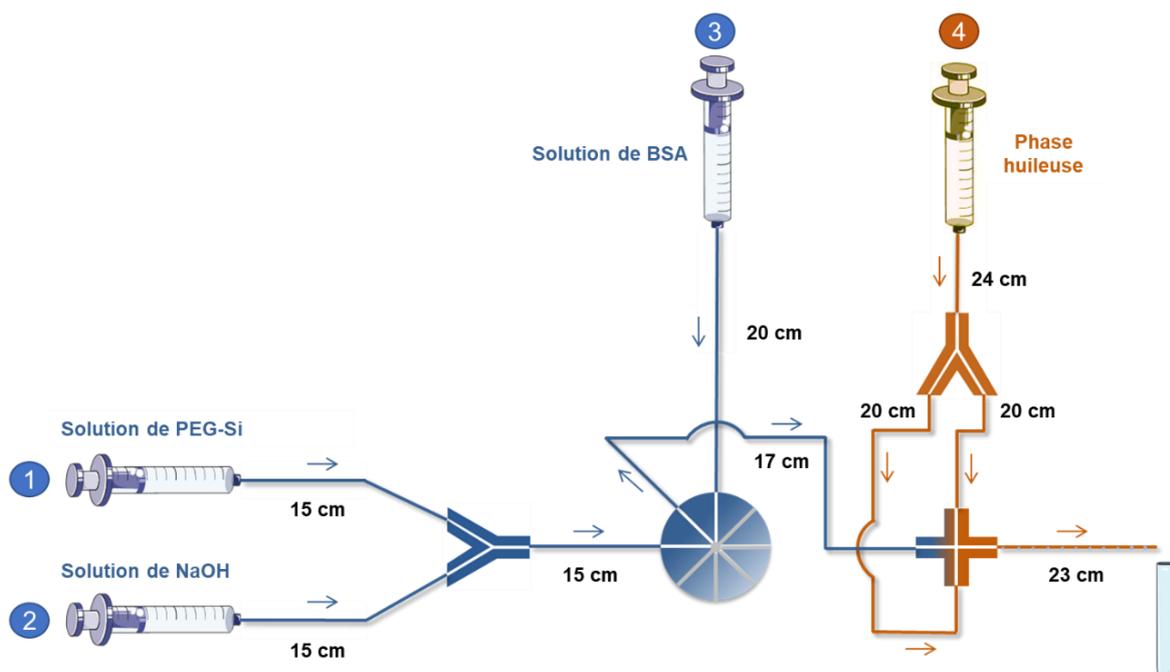


Figure 10 : Système microfluidique utilisé pour produire les microgels de PEG-Si chargés en BSA, avec en bleu (n°1, 2 et 3) la phase aqueuse et en orange (n°4) la phase huileuse

Les débits de chaque phase sont décrits dans le Tableau 4. Les débits des phases déjà utilisés pour les microgels blancs sont restés inchangés. Le débit de la solution de BSA a été calculé pour obtenir un taux de charge théorique de 1 mg de BSA pour 100 mg de PEG-Si.

Tableau 4 : Paramétrage des pousse-seringues pour la préparation de microgels chargés en BSA

Phases composant l'émulsion	Diamètre de seringue (mm)	Débit (mL/h)
Solution de PEG-Si	8,6600	3,0000
Solution de NaOH	4,7800	0,1650
Solution de BSA	4,7800	0,051
Phase huileuse	26,700	28,485

### II.3.3. Purification des microgels

Après 24h de maturation sous agitation, les microgels étaient purifiés par extraction liquide-liquide. La suspension huileuse à purifier était transvasée dans un tube en polypropylène, de même que du tampon Citrate/Phosphate à pH = 7,5 (préparé selon le Tableau 5), et de l'éther éthylique (miscible avec la paraffine). Le rapport volumique entre les trois liquides était de 1:1:1. Le tube était alors agité au vortex, pour mettre toutes les phases en contact, puis centrifugé 1 minute à 4 000 rpm. Deux phases liquides se formaient alors, comme décrit dans la Figure 11 : le tampon en bas du tube, l'huile et l'éther en haut. Les microgels, hydrophiles, formaient un culot au fond du tube, en contact avec le tampon. Huile et éther étaient alors retirés à la micropipette.

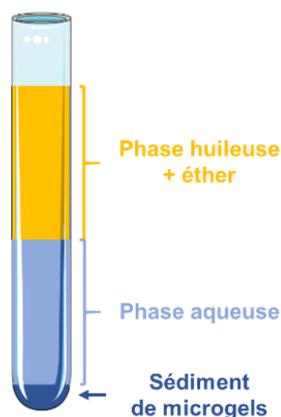


Figure 11 : Séparation de phases observable au cours de l'étape de purification, après centrifugation

Les microgels du culot ont alors été redispersés dans la phase aqueuse par retournements. L'éther résiduel était retiré de cette suspension aqueuse en tirant à une pression inférieure à 100 mbar pendant 30 minutes en évaporateur rotatif, à température ambiante. La suspension de microgels était alors diluée au 1/10<sup>e</sup> dans du tampon Citrate/Phosphate à pH = 7,5, et conservée à 4°C après ajout d'une solution d'azide de sodium à 0,02%, qui joue le rôle de conservateur (10 µL de conservateur pour 5 mL de suspension).

Tableau 5 : Composition du tampon Citrate/Phosphate (0,05 M/0,1 M) à pH = 7,5

Solutions composant le tampon	Proportions utilisées pour la réalisation du tampon Citrate/Phosphate pH = 7,5 (% v/v)
Acide citrique 0,1 M	48,31
Hydrogénophosphate de sodium 0,2 M	48,31
Hydroxyde de sodium 4 M	3,38

## II.4. Caractérisation des microgels

### II.4.1. Propriétés morphologiques et granulométriques des microgels

Une goutte de la suspension aqueuse de microgels a été observée, entre lame et lamelle, au microscope optique EVOS FL (ThermoFischer Scientific). Des clichés ont été pris au grossissement x400 (oculaire x10, objectif x40). Une évaluation de la distribution en taille des particules a ensuite été réalisée par analyse d'image grâce au logiciel ImageJ (National Institutes of Health) (138), un échantillon de plus de 515 microgels distribués sur deux clichés. Le diamètre d'intérêt mesuré pour chaque élément était le diamètre de Féret maximal. Les données statistiques ont ensuite été générées sur Excel (Microsoft Corporation).

### II.4.2. Propriétés mécaniques des microgels

L'étude des propriétés mécaniques des microgels a été réalisée par microscopie à force atomique (AFM), par la méthode de nano-indentation (65,71,72). Le microscope Dimension 3100 (Brucker), piloté par un Nanoscope IIIA Quadrex a été utilisé en mode « Contact ». Un levier PPP-ContPt-50 (NanoSensors) a été installé sur l'appareil. La méthode de Sader (139)

appliquée au levier en pression sur une lame de verre, a donné une constante d'élasticité  $k_0$ , assimilable à la capacité de déformation du levier, d'une valeur de 0,346 N/m.

Une goutte de suspension aqueuse de microgels (blancs ou chargés en BSA) a ensuite été déposée sur une lame de verre. L'excès de tampon a été retiré par capillarité à l'aide de papier filtre. Il est important de retirer les microgels n'adhérant pas au support, car cela garantit ensuite la qualité des mesures. Ces derniers ont donc été éliminés par aspersion de 500 $\mu$ L de tampon Citrate/Phosphate à pH = 7,5 sur la lame, qui a ensuite été séchée à nouveau. La lame a alors été disposée dans l'appareil, sous le levier. Du tampon Citrate/Phosphate à pH = 7,5 a été placé entre l'échantillon et le levier pour réaliser la mesure en milieu aqueux.

La mesure de la force appliquée en fonction de la profondeur d'indentation a été réalisée 5 fois sur la même particule pour les microgels blancs, 3 fois pour les microgels chargés. Les données ont été acquises grâce au logiciel Nanoscope Analysis (Bruker). Les courbes obtenues ont ensuite été traitées sur le logiciel AtomicJ (140). Brièvement, la courbe d'engagement Force  $F = f$  (Profondeur d'indentation  $\delta$ ) a été modélisée par une fonction puissance (Équation 4), dont on a extrait le coefficient  $P_1$ , représentant la charge de pénétration. Ce dernier a été entré dans le modèle de Sneddon (adapté à une indentation de forme conique), dont l'expression est donnée en Équation 5. De ce modèle, on a alors extrait le module d'indentation  $E$ , en Pa. La valeur du coefficient de Poisson était fixée arbitrairement à 0,5 (72,141,142), valeur caractéristique des matériaux incompressibles. Ce choix se justifie par le fait que les microgels sont majoritairement constitués d'eau. L'angle  $\alpha$  était quant à lui de 35°.

$$F = P_1 \cdot \delta^2 + P_2$$

Où :  $F$  : Force (N)

$\delta$  : Profondeur de pénétration (m)

Équation 4 : Fonction puissance modélisant la courbe d'engagement

$$P_1 = \frac{2}{\pi} \cdot \frac{E}{(1-\nu)^2} \cdot \tan \alpha$$

Où :  $E$  : Module d'indentation (Pa)

$\nu$  : Coefficient de Poisson (SU)

$\alpha$  : demi-angle de la pointe du levier (°)

Équation 5 : Modèle de Sneddon pour un indenteur conique (143)

## II.5. Etude préliminaire de libération des microgels chargés

### II.5.1. Libération de la BSA

Une étude de libération de la BSA encapsulée a été réalisée sur 3 échantillons de microgels issus du même lot, dans un milieu de libération tamponné à pH = 7,4. Ce tampon est une solution de 40 mL de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM et de NaCl 140 mM, à laquelle on ajoute 0,39 mL de NaOH 4 M pour ajuster le pH à 7,4.

La suspension de microgels issue de la préparation décrite en II.3.2 a été purifiée comme décrit en II.3.3. La seule différence avec le protocole précédemment décrit est le milieu dans

lequel nous avons resuspendu nos microgels : nous avons en effet remplacé le tampon Citrate/Phosphate par le tampon phosphate salin décrit ci-avant, dans lequel l'étude de libération a été réalisée. Après l'agitation au vortex présentée dans le procédé de purification, les microgels sont entrés en contact avec le tampon de libération : c'est le temps  $t_0$  de la cinétique de libération. Une centrifugation à 4000 rpm pendant 1 min a permis la séparation des phases : l'huile et l'éther ont pu être retirés à la pipette. Dans le surnageant aqueux, 3 fractions aliquotées ont été prélevées, afin de doser la BSA libérée au cours de la phase de purification ( $t = 5$  min). Le culot de microgels a alors été resuspendu dans le milieu aqueux restant, pour évaporation de l'éther résiduel à l'évaporateur rotatif. Puis les 4 mL de suspension de microgels purifiés ont été répartis dans 3 tubes en polypropylène, et dilués avec du PBS pour obtenir 3 fois 5 mL de suspension. Cette dilution a permis le respect des conditions Sink : dans le cas où 100 % de la BSA encapsulée serait libérée, la concentration serait toujours inférieure au dixième de la concentration d'une solution saturée en BSA (144). Les suspensions ont alors été placées sur une roue pour libération de la BSA sous agitation continue, dans un incubateur à 37°C.

A intervalles réguliers, les 3 tubes étaient centrifugés à 4000 rpm pendant 1 minute pour permettre le dépôt des microgels et le prélèvement de 200  $\mu$ L de surnageant par tube. Du milieu tamponné frais (200  $\mu$ L) était ajouté à chaque tube avant resuspension des culots, afin de conserver un volume de 5 mL. Puis les tubes étaient replacés sur la roue. Ce cycle centrifugation-prélèvement-resuspension a été répété 12 fois sur 24 h.

### **II.5.2. Dosage de la BSA**

Le dosage de la BSA a été réalisé grâce à un kit micro BCA. Deux gammes étalons ont été réalisées, avec des concentrations en BSA allant de 0 à 200  $\mu$ g/mL. Solutions étalons et échantillons ont alors été répartis dans une plaque 96 puits, à hauteur de 150  $\mu$ L de solution par puits. Le réactif de travail a ensuite été ajouté, à hauteur de 150  $\mu$ L par puits. Le contenu de chaque puits a alors été homogénéisé à la micropipette, avant incubation à 37°C pendant 2h. La densité optique de chaque solution a alors été lue grâce à un lecteur UV pour microplaques, à une longueur d'onde de 562 nm.

### III. Résultats

#### III.1. Etude du mécanisme de réticulation

L'influence du pH et du temps d'hydrolyse accélérée, ainsi que de la concentration en PEG-Si sur la cinétique de réticulation a été étudiée.

##### III.1.1. Etude macroscopique : effet du pH et de la concentration en PEG-Si sur la cinétique de réticulation

Les résultats du balayage des conditions de réticulation sont présentés sous la forme de trois diagrammes binaires  $\text{pH}_h$ -[PEG-Si], chaque diagramme correspondant à un temps d'hydrolyse accélérée  $t_h$  donné. La Figure 12 représente le comportement des solutions de PEG-Si qu'on laisse évoluer pendant  $t_h = 1$  h. Ce diagramme nous montre que trois des échantillons (en blanc) ont totalement réticulé au cours de l'heure d'hydrolyse accélérée à pH acide, ce qui les rendait impossible à neutraliser. La gélification se déroulant entièrement à pH acide, les conditions sont incompatibles avec l'encapsulation de protéines. Les autres solutions, encore à l'état liquide après 1 heure d'hydrolyse accélérée, ont pu être neutralisées. Deux de ces essais (en rouge) ont donné un temps de gel après neutralisation relativement court, c'est-à-dire inférieur ou égal à 2 heures :

- Le couple  $\text{pH}_h = 3$  et  $[\text{PEG-Si}] = 20\% \text{ m/v}$ ,
- Le couple  $\text{pH}_h = 4,9$  et  $[\text{PEG-Si}] = 30\% \text{ m/v}$ .

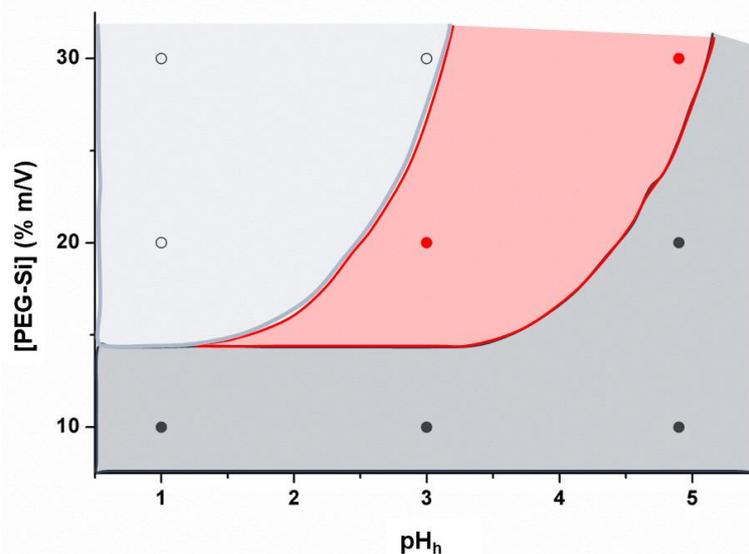


Figure 12 : Diagramme  $\text{pH}_h$ -[PEG-Si] à  $t_h = 1$  h, réalisé en milieu tamponné Citrate/Phosphate à  $25^\circ\text{C}$   
○ : Réticulé avant neutralisation, ● :  $t_{\text{gel}} < 2$  h après neutralisation, ● :  $t_{\text{gel}} > 2$  h après neutralisation

La Figure 13 présente le comportement des solutions de PEG-Si pour un temps d'hydrolyse accélérée  $t_h = 3$  h. Quatre échantillons, en blanc, ont réticulé lors de l'hydrolyse accélérée : cette zone s'est légèrement étendue par rapport au diagramme binaire à  $t_h = 1$  h. Les autres ont pu être neutralisés après 3 heures. Deux de ces solutions neutralisées ont réticulé dans les 2 heures suivant ce changement de pH :

- Le couple  $\text{pH}_h = 4,9$  et  $[\text{PEG-Si}] = 20\% \text{ m/v}$ ,
- Le couple  $\text{pH}_h = 4,9$  et  $[\text{PEG-Si}] = 30\% \text{ m/v}$ .

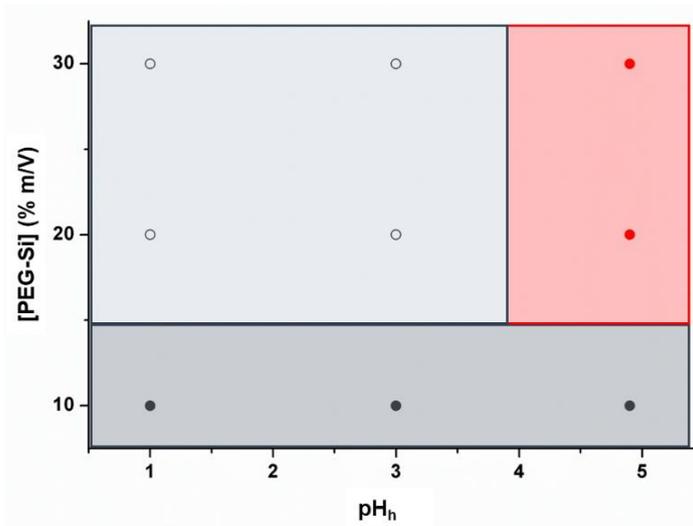


Figure 13 : Diagramme  $\text{pH}_h$ - $[\text{PEG-Si}]$  à  $t_h = 3\text{h}$ , réalisé en milieu tamponné Citrate/Phosphate à  $25^\circ\text{C}$   
 ○ : Réticulé avant neutralisation, ● :  $t_{\text{gel}} > 2\text{h}$  après neutralisation, ● :  $t_{\text{gel}} < 2\text{h}$  après neutralisation

Enfin, la Figure 14 présente le comportement des solutions de PEG-Si avec  $t_h = 24\text{ h}$ . Six solutions ont réticulé avant la fin des 24 heures d'hydrolyse accélérée à pH acide, soit deux de plus que sur le diagramme à  $t_h = 3\text{h}$ . Les trois restantes ont pu être neutralisées à l'issue de l'hydrolyse. Seul un échantillon présente un  $t_{\text{gel}}$  inférieur à 2 heures après cette neutralisation : il s'agit de l'essai à  $\text{pH}_h = 4,9$  et  $[\text{PEG-Si}] = 20\%$ . Notons cependant que la neutralisation homogène de cet échantillon a été difficile du fait de la viscosité importante de la solution après 24 heures d'hydrolyse accélérée.

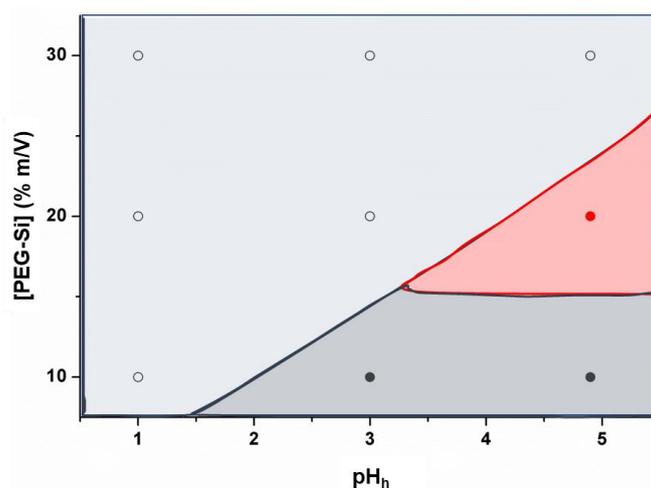


Figure 14 : Diagramme  $\text{pH}_h$ - $[\text{PEG-Si}]$  à  $t_h = 24\text{h}$ , réalisé en milieu tamponné Citrate/Phosphate à  $25^\circ\text{C}$   
 ○ : Réticulé avant neutralisation, ● :  $t_{\text{gel}} < 2\text{h}$  après neutralisation, ● :  $t_{\text{gel}} > 2\text{h}$  après neutralisation

Le balayage des conditions de réticulation a ainsi permis de faire plusieurs observations. Tout d'abord, les solutions à [PEG-Si] = 10 % m/v présentent des temps de gélification très longs et des viscosités faibles. Cela s'explique par la faible abondance d'espèces dans le solvant, dont la probabilité d'interaction est faible. Ensuite, parmi les solutions à 20 et 30 % m/v, il fut possible d'isoler quatre ensembles de conditions d'hydrolyse permettant une réticulation en moins de 2 h après induction par un stimulus de changement de pH. Ces conditions sont résumées dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Ensembles de conditions donnant un temps de gel inférieur ou égal à 2h après application du stimulus par changement de pH

Essai n°	[PEG-Si] (% m/V)	pH <sub>h</sub>	t <sub>h</sub> (h)
1	20	3	1
2	20	4,9	3
3	30	4,9	1
4	30	4,9	3

Les essais 3 et 4 à [PEG-Si] = 30 % m/v ont été écartés car la viscosité de ces solutions était très importante, même avant neutralisation. Une viscosité trop importante est en effet potentiellement incompatible avec le procédé de microfluidique, car elle risquerait d'empêcher l'écoulement de la phase aqueuse.

L'essai 1 n'est quant à lui pas retenu car le temps de gel après neutralisation, bien qu'inférieur à 2h, varie de façon importante lors de la répétition de l'essai ( $t_{\text{gel}} = 21 \pm 12$  min, soit un coefficient de variation de 57 sur trois essais). Cette variabilité peut s'expliquer par le fait que les vitesses théoriques d'hydrolyse et de condensation sont équivalentes, à pH = 3 (110). Le système était à un point critique et a pu donc alternativement favoriser l'une ou l'autre des réactions, induisant une variabilité importante du temps de gel.

L'essai 2, à [PEG-Si] = 20 % m/v et hydrolysé à pH<sub>h</sub> = 4,9 a donc été retenu. Cet ensemble de conditions a été choisi pour les études physico-chimiques nous permettant d'élucider le mécanisme de réticulation.

### III.1.2. Etude spectroscopique : cinétique d'hydrolyse/condensation à pH<sub>h</sub> = 4,9 par RMN <sup>1</sup>H

Suivant les conditions sélectionnées au cours de l'étude macroscopique, une étude en RMN <sup>1</sup>H a été réalisée pour suivre le mécanisme de réticulation au niveau moléculaire. L'ensemble des spectres obtenus est présenté en Annexe 1. Les massifs suivis sont montrés sur un exemple de spectre, en Figure 15. Le massif à 1,12 ppm correspond aux hydrogènes de la fonction éthoxysilyle (Si-O-CH<sub>2</sub>-**CH<sub>3</sub>**), lorsqu'elle est liée au silicium (avant hydrolyse). Le massif à 1,07 ppm correspond au même hydrogène, mais lorsque l'éthanol est sous forme libre (HO-CH<sub>2</sub>-**CH<sub>3</sub>**), après hydrolyse (100).

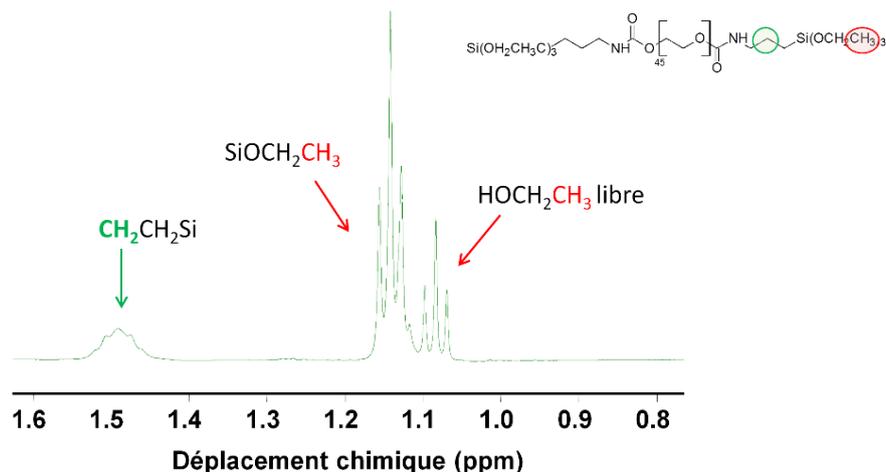


Figure 15 : Exemple de spectre de RMN  $^1\text{H}$  du PEG-Si  
 ([PEG-Si] = 20% m/v dans tampon Citrate/Phosphate à  $\text{pH}_h = 4,9$ ,  $t_h = 15$  min)

Les aires sous courbes de ces deux signaux donnent une information sur le taux d'hydrolyse  $R_H$ , dont l'expression est donnée en Équation 6.

$$R_H(\%) = \frac{ASC_{1,07 \text{ ppm}}}{ASC_{1,07 \text{ ppm}} + ASC_{1,12 \text{ ppm}}} \times 100$$

Équation 6 : Expression du taux d'hydrolyse  $R_H$ , suivi dans le temps en RMN  $^1\text{H}$

Le troisième signal suivi est le massif à 1,49 ppm, correspondant aux hydrogènes du  $\text{CH}_2$  en  $\beta$  par rapport au silicium (**CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Si**) (100). L'élargissement de ce signal a été suivi au cours du temps. En effet, un élargissement du massif témoigne d'une perte de mobilité (145,146) de cet hydrogène. Le rapport  $R_C$ , décrit en Équation 7, est donc un témoin de la condensation. A noter que le premier spectre a été généré à  $t_{\text{initial}} = 15$  min, et que le dernier a été généré à  $t_{\text{final}} = 9$  j. Les largeurs à ces temps sont respectivement considérées comme étant les largeurs minimale et maximale, de façon arbitraire (car la condensation continue peut-être après 9 jours).

$$R_C(\%) = \frac{\omega_{1,49 \text{ ppm}}(t) - \omega_{1,49 \text{ ppm}}(t_{\text{initial}})}{\omega_{1,49 \text{ ppm}}(t_{\text{final}}) - \omega_{1,49 \text{ ppm}}(t_{\text{initial}})} \times 100$$

Équation 7 : Expression du taux de condensation  $R_C$ , suivi dans le temps en RMN  $^1\text{H}$

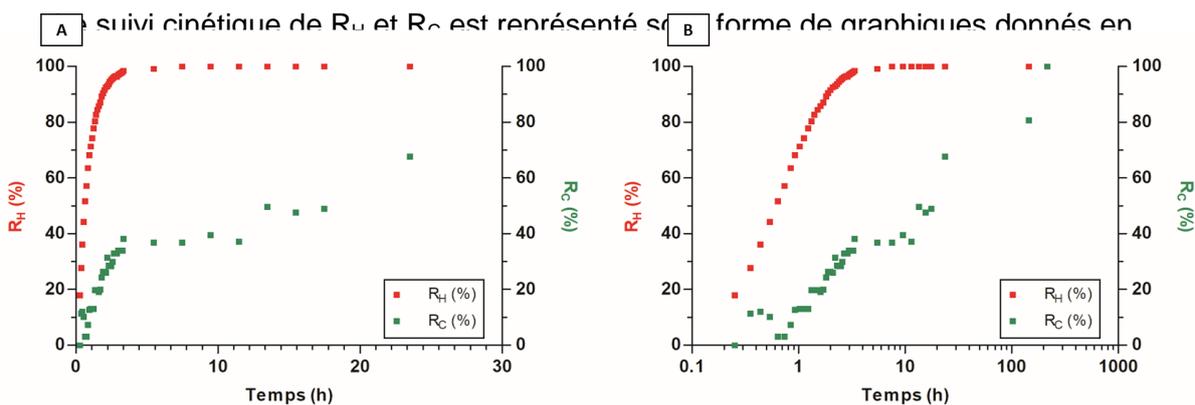


Figure 16A. Le taux d'hydrolyse  $R_H$  a augmenté sur les 3 premières heures, pour finir à un plateau à 100 % s'installant à partir de  $t = 3$  h. L'hydrolyse était alors totale.

En ce qui concerne le taux de condensation  $R_C$ , on a observé une évolution analogue :  $R_C$  a augmenté pendant les trois premières heures, puis s'est stabilisé à un plateau, entre 3 et 13 h. Ce dernier était cependant à une valeur d'ordonnée d'environ 35 % : la réaction n'était donc pas terminée. A  $t = 13$  h,  $R_C$  a augmenté à nouveau de façon progressive, jusqu'à  $t = 9$  j (fin de l'expérience). Le suivi cinétique total, sur 9 jours, est présenté en Figure 16B.

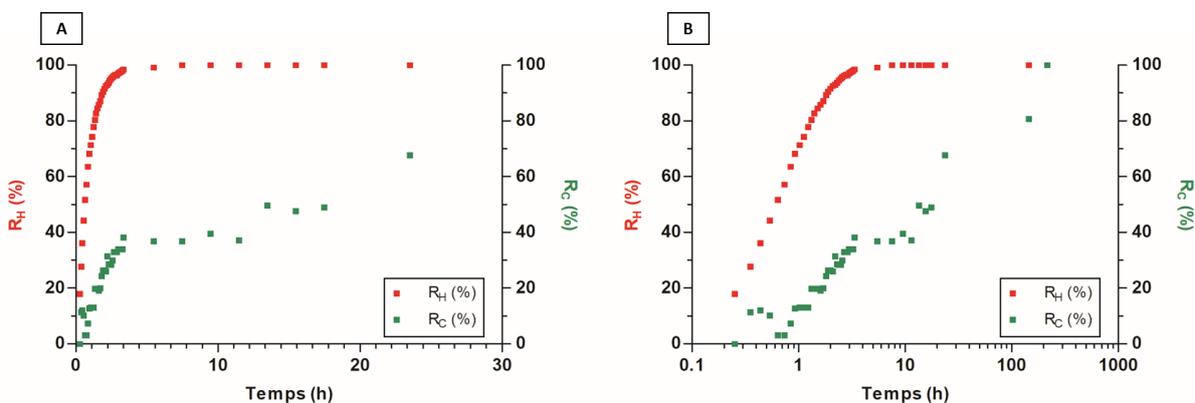


Figure 16 : Suivi cinétique de  $R_H$  et  $R_C$  en RMN  $^1H$  à  $25^\circ C$ , sur 30 h (A) et sur 9 j (B) ([PEG-Si] = 20 % m/v et  $pH_h = 4,9$ )

### III.1.3. Etude spectroscopique : cinétique de condensation à $pH_h = 4,9$ par DLS

Les corrélogrammes, résultats bruts de cette étude cinétique en DLS, sont présentés en Annexe 2. Les résultats issus des calculs et modélisations décrits en II.2.3 sont quant à eux présentés en Figure 17. Les points présentés respectaient les conditions de validité de la méthode des moindres carrés. En effet, l'indice de polydispersité était compris entre 0,08 et 0,7, quand le « %InRange » était entre 95 et 98 %. Cependant, ces résultats restent semi-quantitatifs. Ils montrent tout d'abord que des éléments colloïdaux se forment, et que leur taille augmente au cours du temps. Cette augmentation de taille subit une inflexion nette après 5

heures de réaction. Après 8 h, les objets mesurés atteignent des valeurs de l'ordre du micromètre, dépassant les capacités de mesure de l'appareil.

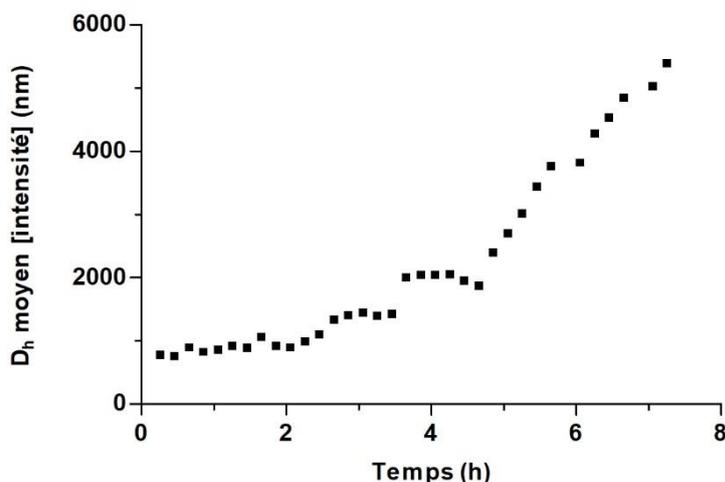


Figure 17 : Suivi de la taille des éléments colloïdaux au cours du temps au sein d'une solution de PEG-Si à 25°C ([PEG-Si] = 20 % m/v et  $pH_h = 4,9$ ) par diffusion dynamique de la lumière

### III.1.4. Etude rhéologique de la réticulation

#### III.1.4.1 Cinétique de réticulation à $pH_h = 4,9$

L'étude rhéologique a ensuite permis la détermination précise du temps auquel s'effectue la transition sol-gel de la solution [PEG-Si] = 20 % m/v à  $pH_h = 4,9$  étudiée en RMN  $^1H$  et en DLS. La courbe en résultant est jugée fiable. En effet, le balayage en amplitude, en Annexe 3, a montré qu'une valeur d'amplitude de 10 % était pertinente, car elle appartenait encore au domaine linéaire. En d'autres termes, elle n'était pas assez importante pour modifier le matériau de façon irréversible : les variations de  $G'$  et  $G''$  observées pendant la cinétique étaient donc uniquement dues à la réticulation du gel, pas aux conditions de la mesure.

La cinétique de réticulation d'une solution de [PEG-Si] = 20 % m/v à  $pH_h = 4,9$  est montrée en Figure 18. On note que les modules élastiques  $G'$  et visqueux  $G''$  n'ont pas ou très peu évolué dans les treize premières heures, avec  $G''$  supérieur à  $G'$ . Le système était à l'état liquide. En revanche, après  $t = 13$  h, les courbes se sont infléchies.  $G'$  est devenu supérieur à  $G''$  après 14 h, ce qui signifie que la composante élastique est devenue prépondérante : le système était alors passé à l'état gel, réticulé par réaction de condensation. Le temps de gel dans ces conditions était donc précisément de 14 h.

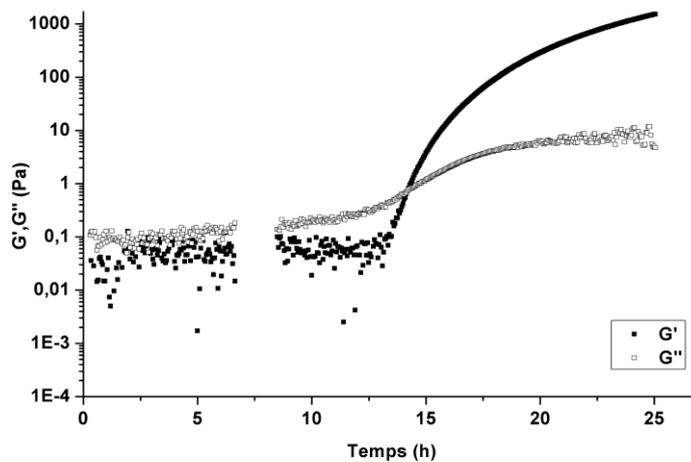


Figure 18 : Cinétique de réticulation en rhéologie en oscillation à 25°C  
 ([PEG-Si] = 20% m/v et  $pH_h = 4,9$ )

### III.1.4.2 Cinétique de réticulation après neutralisation

Cette deuxième étude rhéologique devait permettre de vérifier notre hypothèse de départ, selon laquelle un procédé de réticulation en deux étapes (une première étape d'hydrolyse accélérée à pH acide, puis une étape favorisant la condensation à pH neutre) permettrait d'accélérer la réticulation. Une solution de [PEG-Si] = 20 % m/v a donc été conservée pendant 3 h à  $pH_h = 4,9$ , avant d'être neutralisée à  $pH = 7,5$ . Les résultats, issus des mesures suivant la neutralisation, sont fiables car le balayage en amplitude montré en Annexe 4 indique que l'amplitude de 10 % choisie pour l'expérience était bien dans le domaine linéaire.

La Figure 19 montre que, durant 1h50, les deux courbes présentaient une pente positive mais très faible, avec  $G''$  supérieur à  $G'$ . Après ce délai, les courbes se sont infléchies, jusqu'à ce que  $G'$  dépasse  $G''$  à  $t = 2h05$ . On a donc un temps de gel approchant les 2h suivant la neutralisation.

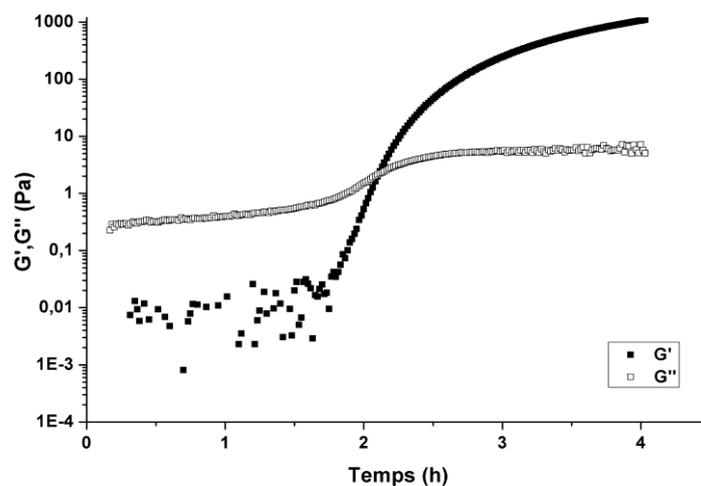


Figure 19 : Cinétique de réticulation en rhéologie en oscillation à 25°C  
 ([PEG-Si] = 20 % m/v et  $pH = 7,5$  après 3 h d'hydrolyse à  $pH_h = 4,9$ )

## III.2. Préparation et purification des microgels

L'objectif des résultats qui suivent était de montrer la possibilité de transposer la réticulation optimisée en conditions macroscopiques à une production assistée par microfluidique. Ce procédé repose dans un premier temps sur la formation d'une émulsion stable E/H, pour ensuite réaliser la réticulation au sein des gouttelettes.

### III.2.1. Optimisation de la formule et du procédé de préparation de l'émulsion E/H

La préparation de microgels en microfluidique devait passer par une étape de dispersion d'une solution de PEG-Si dans une phase huileuse non miscible. Si l'étude des mécanismes de réticulation des macrogels a permis d'établir la formule de notre phase aqueuse, la composition de la phase huileuse continue n'a jusque-là pas été évoquée. Ainsi, avant la synthèse de microgels, une courte phase d'optimisation a permis de fixer la formule de la phase huileuse.

Tout d'abord, il convenait de choisir la composition de la phase huileuse donnant l'émulsion la plus stable. Pour simplifier l'expérience, ces tests ont été réalisés en turbine, et non en microfluidique. Parmi les quatre formules proposées, la formule composée de paraffine liquide épaisse à 2 % m/m de monooléate de sorbitane est la seule qui n'ait pas déphasé après 20 minutes. C'est pourquoi c'est la formule qui a été retenue pour la synthèse de microgels. On notait cependant, grâce au cliché présenté en Figure 20, une certaine polydispersité apparente des gouttelettes de phase aqueuse (non quantifiée).

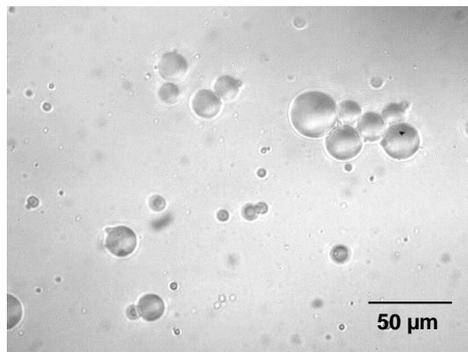


Figure 20 : Image de microscopie optique (G : x 400) de l'émulsion réalisée en turbine  
(90 % Phase huileuse : paraffine liquide épaisse à 2 % monooléate de sorbitane ;  
10 % Phase aqueuse : Solution à 20 % m/v de PEG<sub>2000</sub>)

La phase huileuse choisie a alors été utilisée pour générer une émulsion E/H en microfluidique. Le rapport entre débit de phase aqueuse et débit de phase huileuse a ensuite été optimisé : parmi les trois rapports testés, le rapport H/E retenu était le rapport 90/10, car il a permis l'obtention de l'émulsion la plus stable en microfluidique. En effet, la taille des globules récoltés en sortie de système semblait évoluer dans le temps, mais relativement peu, comme le montrent les clichés pris à 18h d'intervalle montrés en Figure 21 (évolution non quantifiée). Les gouttelettes ont sédimenté, mais ce phénomène est resté réversible même après 45h de stockage à 25°C.

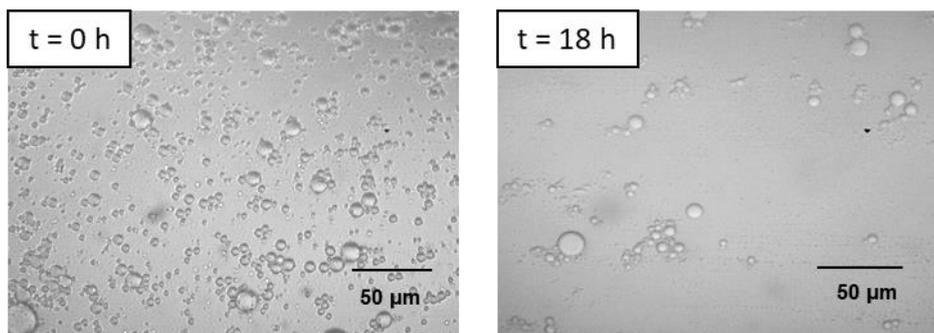


Figure 21 : Images de microscopie optique (G : x 400) de l'émulsion réalisée en microfluidique en fin d'émulsification (à gauche) et 18h après (à droite)  
 (90 % Phase huileuse : paraffine liquide épaisse à 2 % monooléate de sorbitane ;  
 10 % Phase aqueuse : Solution à 20 % m/v de PEG<sub>2000</sub>)

### III.2.2. Préparation des microgels blancs et chargés en BSA

Le système optimisé précédemment a permis de produire des microgels blancs (c'est-à-dire dénués d'actifs encapsulés) à partir d'une solution de PEG-Si. L'émulsification, observable à l'œil nu à travers les capillaires transparents, produisait un liquide de couleur blanche caractéristique des émulsions.

Cependant, l'ajout d'une voie pour l'incorporation de la BSA a suffi à perturber le système. En effet, une certaine instabilité a été observée dans le capillaire en aval de l'émulsification : le liquide était parfois blanc, parfois translucide. En d'autres termes, le système oscillait probablement entre *dripping regime* et *jetting regime*. Cet essai préliminaire a cependant donné des microgels.

En présence ou non de BSA, la réticulation du PEG-Si a induit le passage des gouttelettes liquides à l'état gel. Les microgels ainsi formés sont montrés sur des clichés de microscopie optique, présentés en Figure 22.

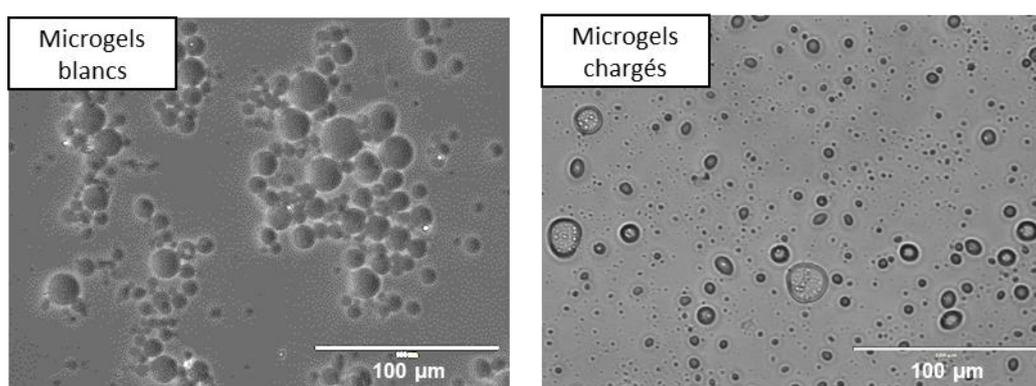


Figure 22 : Image de microscopie optique (G : x 400) de microgels blancs (à gauche) et chargés en BSA (à droite) en suspension dans un tampon Citrate/Phosphate pH = 7,5 après purification

### III.2.3. Purification des microgels blancs et chargés en BSA

La purification a été effectuée par l'extraction liquide-liquide de l'huile par l'éther. Elle a permis de retirer une grande partie de l'huile, et n'a pas entraîné la perte de microgels. En effet, une observation microscopique des surnageants huileux de purification n'a montré aucun microgel dans le mélange huile/éther. Notons toutefois que des traces d'huiles ont été retrouvées dans la suspension aqueuse purifiée, au cours d'une séance de microscopie électronique environnementale à balayage non décrite dans le présent document.

### III.3. Caractérisation des microgels

Une fois purifiés, les microgels ont été caractérisés du point de vue morphologique et mécanique.

#### III.3.1. Propriétés morphologiques et granulométriques des microgels

Les clichés, dont deux exemples sont à observer en Figure 22, montraient des microgels blancs de forme sphérique, quand les microgels chargés en BSA apparaissent sphériques à légèrement oblongues. Les analyses granulométriques des microgels réalisées sur ces images ont donné les distributions montrées en Figure 23. Les données statistiques extraites de ces distributions sont quant à elles résumées dans le Tableau 7.

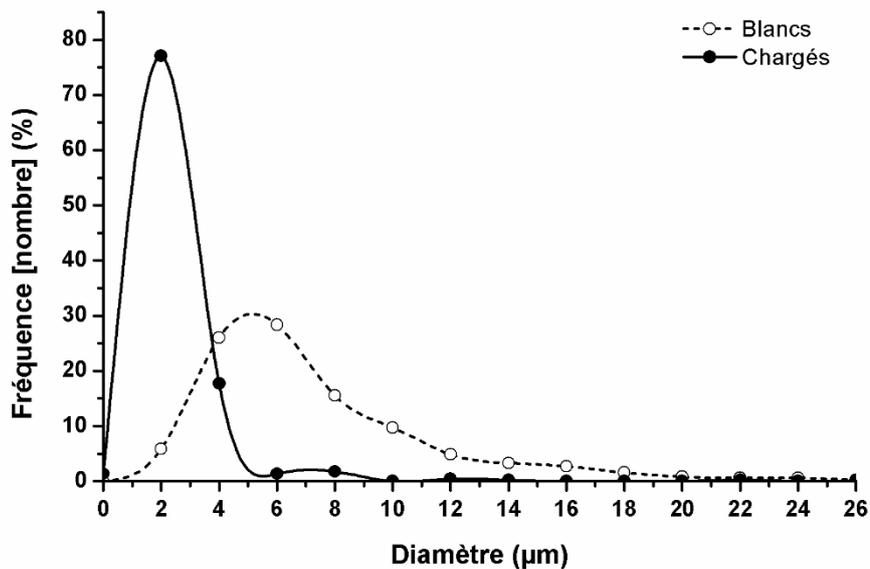


Figure 23 : Distribution de taille des microgels blancs (points évidés, ligne pointillée) et chargés (points pleins, trait plein), évaluée par analyse d'image de microscopie optique (n = 515 microgels)

Les microgels blancs présentent une distribution polymodale avec 3 pics mal résolus : un pic à 5 µm, un pic à 10 µm, et un pic à 15 µm. La distribution globale est par conséquent plutôt polydispense, comme en témoigne le Span. Cet indice est calculé selon l'Équation 8 : il permet de décrire la largeur d'une distribution granulométrique donnée. Un consensus s'est établi autour de la valeur de 2, qui sépare les distributions monodisperses (Span < 2) des distributions polydispenses (Span > 2). Cette valeur seuil n'a cependant rien d'absolu et peut

être discutée au cas par cas. Les microgels blancs, avec un Span relativement haut (bien que légèrement inférieur à 2), présentent ainsi une distribution jugée polydispense.

Les microgels chargés en BSA se distribuent aussi en plusieurs pics. Cependant ils sont très majoritairement contenus dans le premier pic : on a donc une population tendant vers la monomodalité. Ce pic est d'ailleurs assez étroit, ce qui traduit une certaine monodispersité, avec un Span de 1.

$$Span = \frac{d_{90} - d_{10}}{d_{50}}$$

Où :  $d_{90}$  : Neuvième décile de la distribution ( $\mu\text{m}$ )  
 $d_{10}$  : Premier décile de la distribution ( $\mu\text{m}$ )  
 $d_{50}$  : Médiane de la distribution ( $\mu\text{m}$ )

Équation 8 : Expression du Span, indice de polydispersité d'une distribution granulométrique

Tableau 7 : Données statistiques sur la distribution de taille des microgels (n = 515 microgels)

	Microgels blancs	Microgels chargés en BSA
<b>Moyenne (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	7 ± 4	3 ± 2
<b>Médiane (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	6	2
<b>Minimum (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	1	1
<b>Maximum (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	25	22
<b>1<sup>er</sup> décile <math>d_{10}</math> (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	4	2
<b>9<sup>e</sup> décile <math>d_{90}</math> (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	13	4
<b>Span</b>	1,5	1

### III.3.2. Propriétés mécaniques des microgels

Après avoir comparé les microgels blancs et chargés en BSA sur le plan morphologique et granulométrique, leurs propriétés mécaniques ont été étudiées. Ces résultats ont notamment pour objectif de vérifier que la réticulation chimique a bien eu lieu. Pour cela, un procédé de nano-indentation par AFM a été appliqué à nos microgels. Un exemple de courbe de la force appliquée en fonction de la profondeur d'indentation est donné en Figure 24.

Tout d'abord, pour chacun des 8 essais réalisés, la courbe de retrait se superposait à la courbe d'engagement, ce qui témoigne de l'absence de plasticité des microgels testés, qui n'ont donc subi qu'une déformation élastique. Le même constat a été fait pour les microgels blancs et pour ceux chargés en BSA. La réticulation était donc probablement très poussée au sein des microgels, et l'incorporation de la BSA n'a eu aucun impact négatif sur cette réticulation.

Ensuite, le traitement par modélisation des courbes obtenues a donné un module d'indentation moyen pour le microgel blanc de 200 ± 56 kPa, contre 167 ± 13 kPa pour les microgels chargés. La différence semble ici non significative, au vu des écarts-types présentés.

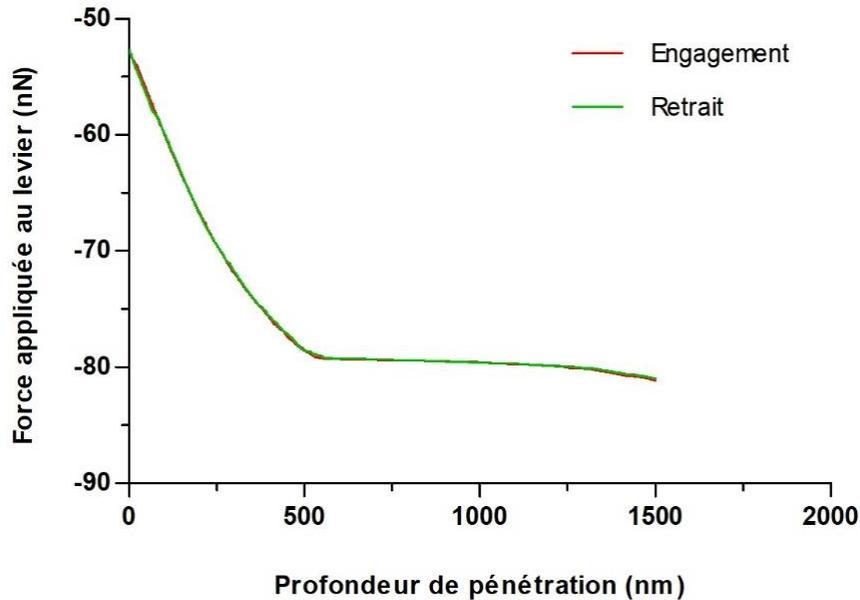


Figure 24 : Exemple de courbe de la force appliquée par le levier en fonction de la profondeur de pénétration dans un microgel blanc, obtenues par nano-indentation en AFM lors de l'engagement (en rouge) et du retrait (en vert)

#### III.4. Etude préliminaire de libération des microgels chargés

Le dosage de la BSA libérée au cours du temps sur une période de 24h a permis d'établir une cinétique de libération, présentée en Figure 25. La quantité de BSA libérée est présentée en pourcentage par rapport à la masse de BSA incorporée à la formulation, cette dernière étant de 260  $\mu\text{g}$ . On fait donc l'hypothèse que la totalité de la BSA incorporée se trouvait dans les microgels au début de l'étude de libération. On a observé une libération extrêmement rapide de la BSA au cours de la première heure. En effet, 57 % de la quantité totale de BSA a été libérée dans les 5 minutes nécessaires à la purification des microgels, avant même le début de l'étude de libération. Au bout d'une heure dans le PBS, 67 % de la BSA a été relarguée. Ensuite, la concentration en BSA augmente beaucoup plus lentement, pour atteindre un taux de libération de 80 % en 24h.

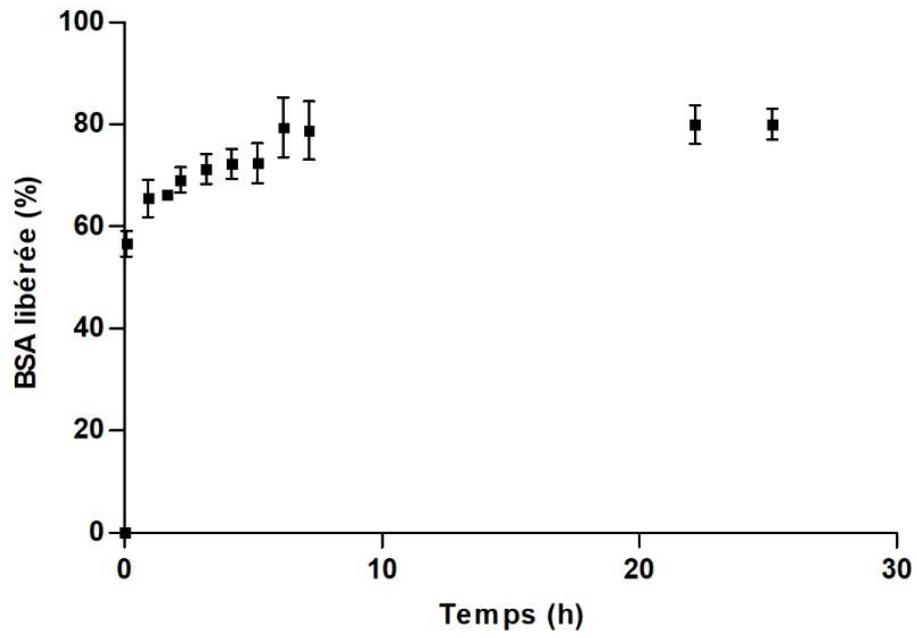


Figure 25 : Cinétique de libération de la BSA encapsulée dans des microgels, dans un tampon phosphate salin à pH = 7,4 ( $[\text{KH}_2\text{PO}_4] = 50 \text{ mM}$  et  $[\text{NaCl}] = 140 \text{ mM}$ )

## IV. Discussion

---

Les résultats exposés ci-avant doivent à présent nous permettre de vérifier point par point le respect du cahier des charges. Pour rappel, nous cherchons à opérer une réticulation (i) en conditions douces, (ii) rapide, (iii) et contrôlable par un stimulus, dans le but d'obtenir des microgels (iv) de forme et de taille homogènes (v) en vue d'une libération prolongée de protéines encapsulées. Cependant, nous ne nous arrêterons pas à la simple vérification du cahier des charges. Une discussion sur les aspects d'optimisation physicochimique, de procédé, ainsi que sur les applications pharmaceutiques éventuelles des microgels sera développée.

### IV.1. Conditions de réticulation d'une solution de PEG-Si

#### IV.1.1. Mécanisme de réticulation de la phase aqueuse à pH = 4,9

La RMN du proton a montré une hydrolyse progressive des molécules de PEG-Si à pH = 4,9, aboutissant à un état d'hydrolyse totale au bout de 3 h. La cinétique de condensation était dans un premier temps similaire à la cinétique d'hydrolyse, avec une augmentation du taux de condensation  $R_c$  sur les 3 premières heures. Puis elle s'est stabilisée à une valeur de 35 %, loin de l'état de condensation maximal. Notons qu'à ce pH de 4,9, l'hydrolyse est plus lente que la condensation (110). Elle est donc le facteur limitant, et chacune des molécules de PEG-Si hydrolysées a été immédiatement recrutée pour la condensation. Cela explique que la cinétique de condensation ait suivi celle d'hydrolyse. Après 3 h, le taux de condensation était donc à l'équilibre car l'hydrolyse ne l'alimentait plus.

Si ce premier régime de condensation de 3 h s'est bien traduit par une croissance progressive de petits éléments colloïdaux (détectés en DLS), il n'a cependant été accompagné d'aucun changement des propriétés rhéologiques. En effet, sur la Figure 18, on note que  $G'$  et  $G''$  n'ont que très peu augmenté sur les trois premières heures. Les éléments colloïdaux étaient donc trop petits pour avoir une quelconque influence sur la viscoélasticité de la solution de PEG-Si. Cette tendance s'est prolongée entre 3 et 13 h : les propriétés rhéologiques n'ont presque pas évolué alors même que des éléments de plus en plus gros se formaient dans la solution. A noter que l'augmentation de taille des éléments détectés s'est faite à taux de condensation  $R_c$  constant, toujours à 35 %.

A partir de  $t = 13$  h, le taux de condensation a augmenté à nouveau. En parallèle,  $G'$  et  $G''$  ont augmenté eux aussi drastiquement. La simultanéité des phénomènes moléculaire et rhéologique est observable en Annexe 5. Ce deuxième régime de condensation s'est donc accompagné d'une évolution des propriétés rhéologiques de la solution, tendant vers un gel solide. Cette réticulation de l'ensemble de l'échantillon était effective à  $t = 14$  h, temps auquel le module élastique  $G'$  dépasse le module visqueux  $G''$ .

A partir de ces résultats, une hypothèse sur les mécanismes moléculaires conduisant à la transition sol-gel est proposée et résumée en Figure 26. Elle s'appuie sur les principes généraux de la chimie sol-gel des précurseurs alcoxysilanes (110,147).

L'hydrolyse a fourni progressivement de nouvelles espèces pour le premier régime de condensation. Au cours de ce dernier, des liaisons Si-O-Si s'établissaient localement, formant de petits agrégats de quelques molécules de PEG-Si à partir des espèces hydrolysées. La

solution est alors devenue une suspension colloïdale, où la phase dispersée était de taille si faible que les forces gravitationnelles n’y avaient pas cours. Ce colloïde étant de type « solide dans liquide », on parle de « sol ». Les agrégats, bien que présents, n’étaient cependant pas assez gros pour modifier significativement le comportement rhéologique du sol. Venait alors une phase d’équilibre du taux de condensation, au cours de laquelle les agrégats ont tout de même vu leur taille augmenter par un phénomène analogue au mûrissement d’Ostwald, bien que non régi par la loi de Laplace : les petits agrégats se sont redissous, au profit d’une recondensation sur les agrégats plus gros. Le taux de condensation  $R_C$  stable indique qu’il y avait autant de d’espèces redissoutes que d’espèces recondensées, conduisant à un équilibre dynamique. Ce mûrissement a eu lieu jusqu’à ce que les agrégats soient assez gros pour s’enchevêtrer les uns dans les autres : le deuxième régime de condensation a alors commencé, correspondant à la condensation des agrégats entre eux. Lorsque la structure s’étend dans tout le liquide, on ne parle plus de « sol » mais de « gel » : l’échantillon était alors solide. Cela n’empêche cependant pas la condensation de se poursuivre au sein même du réseau.

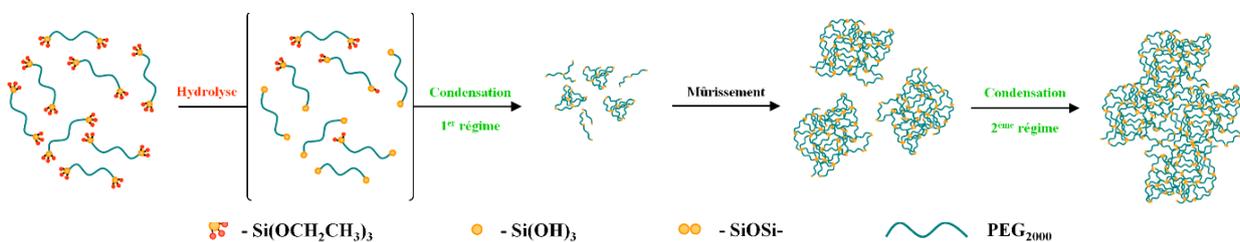


Figure 26 : Schéma du mécanisme moléculaire conduisant à la réticulation du PEG-Si à pH 4,9

#### IV.1.2. Réticulation de la phase aqueuse en conditions biocompatibles

L’étude macroscopique de l’influence des paramètres de pH et de temps d’hydrolyse accélérée nous ont permis de sélectionner un ensemble de conditions favorables à une réticulation rapide. En laissant la solution de PEG-Si à pH = 4,9, on a pu obtenir un gel solide en quelques heures. Néanmoins, sur la base des données de la littérature (110), on avait fait l’hypothèse qu’un procédé de réticulation en deux étapes à pH différents permettrait de réduire le temps de gel. Selon cette hypothèse, à pH acide, la réticulation serait sous contrôle cinétique, et une accélération de cette réticulation serait possible par une simple neutralisation. Ce pH neutre constitue de plus un environnement favorable à l’incorporation de protéines et de peptides thérapeutiques, sensible aux dégradations chimiques à pH acide.

L’étude rhéologique nous a permis de valider cette hypothèse. En effet, une solution de [PEG-Si] = 20 % m/v a réticulé en 14 heures lorsqu’elle était laissée à pH = 4,9. Or, si elle était neutralisée après 3 heures d’hydrolyse accélérée (à l’issue desquelles l’hydrolyse est totale selon les résultats de RMN), le temps de gel après neutralisation était ainsi réduit à 2 heures.

Ainsi, les conditions de réticulation choisies ont permis le respect des trois premiers points du cahier des charges : la neutralisation (i) a servi de stimulus de réticulation, (ii) a permis d’obtenir un temps de gel court, et (iii) rendait possible l’ajout de matériel biologique fragile à encapsuler.

## IV.2. Préparation de microgels chargés en protéine modèle par procédé microfluidique

Si concernant les conditions de réticulation, les contraintes étaient alors respectées, il restait à faire la preuve que cette réticulation douce pouvait être mise à profit pour produire des microgels chargés en BSA par un procédé microfluidique.

### IV.2.1. Optimisation de l'émulsification

La phase aqueuse a été optimisée auparavant pour répondre aux contraintes concernant la cinétique de réticulation. Sa composition ne sera donc pas discutée dans cette partie. En revanche, la nature de la phase huileuse a fait l'objet d'une optimisation, conduisant à choisir la paraffine liquide épaisse à 2 % m/m de monooléate de sorbitane. Cette phase huileuse, testée au cours d'une émulsification en turbine, fut la seule des quatre proposées donnant une émulsion E/H stable sur quelques heures. Notons qu'on la trouve déjà dans d'autres études sur la préparation de microgels en microfluidique (124).

Si l'émulsification a fonctionné en turbine, il a ensuite fallu adapter la formulation au procédé microfluidique. En cela, l'optimisation des débits de chaque phase a été capitale. Un débit global de 30 mL/h a été supposé suffisamment lent pour permettre la formation de gouttelettes : on sait en effet que le *dripping regime* est favorisé par des débits lents (148). Ce débit était cependant assez rapide pour éviter au PEG-Si de réticuler complètement à l'intérieur des capillaires, et donc de boucher le système. Le ratio huile:eau satisfaisant le mieux le cahier des charges était de 90:10, car la taille des gouttelettes générées restait relativement stable dans le temps.

Ainsi, la formule et les paramètres de procédé étaient optimisés pour permettre la formation d'une émulsion E/H en microfluidique. Cette émulsification réussie est à mettre au crédit de nombres capillaires inférieurs à 1, et donc en faveur d'un *dripping regime*. En effet, le nombre capillaire de la phase aqueuse était de  $1,3 \cdot 10^{-3}$ , en fixant la viscosité dynamique  $\eta_{25^\circ\text{C}} = 4,161$  mPa.s (149), quand le nombre capillaire de la phase huileuse est estimé à 0,49, considérant la viscosité dynamique moyenne de la paraffine  $\eta_{20^\circ\text{C}} = 170$  mPa.s. A noter que pour ces calculs, nous avons fixé la tension interfaciale entre les deux phases en présence de monooléate de sorbitane à  $\gamma_{25^\circ\text{C}} = 14$  mN.m<sup>-1</sup>, valeur trouvée dans la littérature (150). Le choix de cette valeur sous-entend que le tensioactif était déjà adsorbé à l'interface lors de la formation des gouttes. Or, ce n'est le cas que si le temps d'adsorption du tensioactif est inférieur au temps microfluidique nécessaire à la formation d'une goutte (148,151). Ce scénario n'est donc pas forcément le plus réaliste. C'est cependant le plus défavorable à la formation des gouttes (avec une tension interfaciale au plus bas), et pourtant, même dans ce cas-là, les nombres capillaires restent inférieurs à 1. Ainsi, que le tensioactif soit déjà à l'interface ou pas, le système est logiquement en *dripping regime*, d'où la formation aisée de gouttes.

Ajoutons enfin que l'émulsion générée est restée relativement stable, assez longtemps pour que la réticulation s'opère dans les microréacteurs avant une séparation de phase entre l'huile et la solution de PEG-Si. Des microgels de PEG-Si ont ainsi bien pu être produits en microfluidique.

### IV.2.2. Préparation de microgels chargés en BSA

Une fois l'obtention de microgels blancs optimisés, le procédé a dû être adapté à l'encapsulation de la BSA. Si la génération de microgels chargés en BSA fut possible, le procédé reste encore à améliorer. En effet, une alternance entre ce qui semble être des

phases de *dripping regime* et d'autres phases de *jetting regime* a été observée pendant l'émulsification. En fait, les microgels produits résultent d'essais préliminaires : une voie pour incorporer la BSA dans la phase aqueuse a simplement été ajoutée au système microfluidique utilisé avant pour préparer des microgels blancs. Cependant, cet ajout a visiblement suffi à faire augmenter l'un des nombres capillaires vers 1, amenant le système dans des conditions limites entre *dripping* et *jetting regime* (1 étant valeur charnière entre les deux régimes (126)).

Trois causes peuvent être invoquées pour expliquer cette évolution. La première est l'adsorption de la protéine à l'interface eau-huile lors de la rencontre entre les deux phases. La tension interfaciale s'en serait vue diminuée, augmentant alors le nombre capillaire. Cependant, quoique cette adsorption soit certaine et relativement rapide (152–154), aucune publication n'indique si elle peut avoir lieu dans des temps inférieurs au délai de formation d'une goutte. Cette adsorption pourrait donc très bien se faire en aval de la jonction en croix, et ne pas être la cause du *jetting regime* observé. Une deuxième explication semblant plus probable serait que la phase aqueuse aurait une viscosité plus importante dans ce système, en comparaison au système microfluidique sans protéine. En effet, dans le système pour microgels blancs, l'émulsification était réalisée juste après la neutralisation de la solution de PEG-Si, ce qui laissait 34 secondes au PEG-Si pour réticuler au sein du montage. Dans le système pour encapsulation de BSA, on ajoute l'étape d'incorporation de la BSA entre la neutralisation et l'émulsification : la solution est donc émulsifiée 228 secondes après neutralisation. Cette différence de temps pourrait suffire à entraîner une augmentation de viscosité de la phase aqueuse, qui auraient eu plus de temps pour réticuler. Or, une viscosité plus élevée augmente le nombre capillaire, favorisant un déplacement vers le *jetting regime*. Enfin, la dernière explication plausible serait un encrassement de la jonction en croix, par de la protéine ou du PEG-Si réticulé. La présence de résidus aurait en effet pu modifier la géométrie au sein de la jonction, perturbant les flux et donc l'émulsification.

Quelles que soient les raisons de l'instabilité du *dripping regime*, il n'en reste pas moins que des microgels ont été obtenus. Ces derniers sont probablement issus des phases de *dripping regime*. Cependant, il reste possible que ces microgels aient été produits au cours des phases de *jetting regime*, grâce à une instabilité de Rayleigh-Plateau. En effet, tout jet de fluide fini par se rompre lorsqu'il subit une déformation de longueur d'onde supérieure à  $\pi$  fois son diamètre. On pourrait donc très bien imaginer avoir obtenu des gouttes (et donc des microgels) à la suite d'une rupture du jet lors des épisodes intermittents de *jetting* (155).

### IV.2.3. Purification des microgels

Une fois les microgels préparés, la phase huileuse continue a dû être retirée. En effet, l'objectif à long terme étant l'injection d'une suspension de microgels aux patients, il nous fallait éliminer l'huile et le tensioactif, et resuspendre les microgels dans un milieu aqueux.

L'extraction de l'huile par l'éther diéthylique a été efficace : elle n'a entraîné aucune perte de microgels, et a permis d'extraire la majeure partie de l'huile. Il reste tout de même une faible quantité d'huile dans la suspension aqueuse. Un deuxième cycle d'extraction aurait pu permettre de retirer cette dernière fraction d'huile retrouvée dans la suspension.

A noter aussi qu'une fraction de l'éther s'est mélangée à la suspension aqueuse de microgels, nécessitant une phase d'évaporation de l'éther résiduel. La toxicité de l'éther est faible : c'est un solvant de classe 3 selon ICH (156). Son usage est donc limité à 5000 ppm maximum par jour sans nécessité de justifier sa présence dans la formule. Néanmoins, des solutions existent pour se passer de tels solvants ; elles doivent donc être étudiées avec attention. Une solution

pourrait par exemple être de ne plus utiliser d'huile, en préparant les microgels au sein d'une émulsion « eau-dans-l'eau » (157,158). Il n'y aurait ainsi plus besoin d'éther, ce qui est toujours préférable tant du point de vue du patient que de celui du fabricant.

#### IV.2.4. Caractéristiques des microgels

Les microgels, qu'ils soient blancs ou chargés, étaient parmi les plus petits produits en microfluidique. Leur taille reste cependant du même ordre de grandeur que celle des microgels couramment trouvés dans la littérature (49–51,54,62,71,74,113,123,124,129,133–135). On trouve tout de même mention de gels de taille nanométrique produits en microfluidique (159), mais leur procédé d'obtention ne passe pas par une étape d'émulsification. En effet, les auteurs décrivent un système microfluidique dont la géométrie et les paramètres n'a pas pour but de générer des gouttes mais un jet (160). Deux polymères de charges opposées, chacun dans une phase, entrent en contact tout au long de ce jet, et s'auto-assemblent pour donner des nanogels. Ce système n'est donc pas comparable à nos microgels.

La distribution granulométrique des microgels blancs comme de ceux chargés en protéine, si elle n'est pas vraiment considérée comme polydispense (la valeur de Span est inférieure à 2), reste cependant trop large comparée aux distributions très étroites espérées en microfluidique (162). Cela peut s'expliquer par une coalescence des gouttes avant leur réticulation complète. En effet, les gouttelettes issues d'un procédé microfluidique ont souvent une distribution très monodisperse, après leur formation. Cependant, si les gouttes se rencontrent avant que le tensioactif ne sature l'interface, elles peuvent coalescer, donnant des populations plutôt polydispenses (163). Deux solutions peuvent être proposées pour réduire la distribution de taille des microgels tout en conservant le système développé au cours de ce travail. Il est possible soit d'augmenter la concentration en tensioactif (pour accélérer l'adsorption à l'interface), soit allonger la tubulure de sortie d'émulsification (pour augmenter le temps pendant lequel les gouttelettes avancent sans se rencontrer, avant de tomber dans le tube de récupération). Cependant il existe une autre solution, plus radicale : l'utilisation de systèmes microfluidiques sur puce en polydiméthylsiloxane. Ces systèmes sont en effet réputés pour autoriser une plus grande maîtrise dans la granulométrie des particules produites. En outre, il faut noter que la distribution des microgels chargés en BSA est tout de même plus resserrée que celle des microgels blancs. Cela peut s'expliquer par une réticulation plus rapide des microgels chargés. En effet, il était montré dans la partie IV.2.2 que la distance parcourue par la phase aqueuse avant de subir l'émulsification était plus longue dans le cas des microgels chargés. La réticulation est donc supposée très avancée au moment de l'émulsification : les gouttes réticuleraient alors plus rapidement après l'émulsification, et auraient moins le temps de coalescer dans le tube de récupération. Cette réticulation avancée au moment de l'émulsification expliquerait aussi la forme légèrement oblongue des microgels chargés. Ces derniers, en réticulant dans les tubulures, garderaient la déformation de la goutte générée par le flux de liquide.

En termes d'élasticité enfin, les microgels produits sont comparables à certains microgels de gélatine méthacryliques (72), et bien plus élastiques que des microgels de PEG<sub>20 000</sub> diacryliques de concentration 0,5 % m/m (66). De plus, nos particules ne sont pas plastiques. Cette résistance mécanique pourrait être un avantage, car elle permet potentiellement le séchage des particules sans dégradation, et donc le stockage sous une forme sèche stable. Elle est aussi le témoin d'une réticulation réussie : le transfert d'échelle de la réticulation macroscopique vers une réticulation en microréacteurs est donc bien un succès. De plus, cette

réticulation semble poussée, favorable à une petite taille de maille et donc à une libération prolongée de la BSA.

#### IV.2.5. Libération de la protéine encapsulée

La BSA est libérée selon deux modes successifs bien distincts. Pour comprendre le comportement de la BSA au cours de ces deux phases, il faut calculer la taille de la maille  $\xi$  au sein du gel de PEG-Si réticulé. L'Équation 9 permet de faire ce calcul, à partir du module de cisaillement  $G$ .

$$\xi = \left(\frac{kT}{G}\right)^{1/3}$$

Où :  $\xi$  : Taille de maille (m)  
 $k$  : Constante de Boltzmann ( $1,38.10^{-26}$  J.K<sup>-1</sup>)  
 $T$  : Température (K)  
 $G$  : Module de cisaillement (Pa)

Équation 9 : Calcul de la taille de maille (36)

Ce module de cisaillement  $G$ , n'est pas assimilable au module d'Young, qui lui est un module d'élasticité. Cependant, lorsque le matériau étudié est isotrope, il est possible de calculer l'un à partir de l'autre, comme le montre l'Équation 10.

$$G = \frac{E}{2(1 + \nu)}$$

Où :  $G$  : Module de cisaillement (Pa)  
 $E$  : Module d'Young (Pa)  
 $\nu$  : Coefficient de Poisson (SU)

Équation 10 : Relation entre module d'Young et module de cisaillement (164)

Le coefficient de Poisson  $\nu$  est fixé à 0,5, qui est la valeur pour un matériau incompressible, car nos gels sont composés à 80 % d'eau (72,141,142). Il est admis aussi que le module d'indentation local mesuré en AFM équivaut au module d'Young. La taille de maille est alors estimée à environ 4 nm. La BSA quant à elle, a un diamètre hydrodynamique en solution aqueuse de l'ordre de 7 à 8 nm (165,166). Elle est donc très peu susceptible de diffuser au travers du réseau polymérique.

Or, dans un premier temps, on observe une libération extrêmement rapide, appelée communément un *burst release*. Ce phénomène est très courant lorsque des actifs sont encapsulés dans des systèmes particuliers, qu'ils soient de type microgels (167) ou non (168). Il est souvent expliqué par la présence d'une fraction de la molécule active faiblement liée en surface de la particule. Ces molécules, à portée du milieu de libération, sont donc très faciles à désorber, surtout en milieu salin. Dans notre cas, la présence d'une grande quantité de BSA en surface est évidente, du fait de ses propriétés tensioactives (152–154).

Après cette première étape de libération très rapide, une libération nettement plus lente de la protéine était observée. La réticulation du PEG-Si étant chimiosélective, cette rétention de la

BSA n'est certainement pas due à une liaison covalente entre elle et le réseau polymérique. Les molécules de BSA libérées lors de cette étape sont très probablement celles encapsulées dans le cœur des microgels. Leur diamètre hydrodynamique étant très peu favorable à leur diffusion au sein des microgels, elles sont libérées extrêmement lentement. Nous avons donc bien encapsulé une fraction de la BSA dans les microgels. La libération prolongée ainsi obtenue permettrait de réduire la fréquence d'administration de cette formulation au patient.

Cependant, le *burst release* reste une limite à l'utilisation de ces microgels dans un cadre thérapeutique. Pour réduire ce phénomène, plusieurs pistes sont proposées. Certaines études mentionnent l'influence des interactions électrostatiques, qui peuvent ralentir la libération de l'actif lorsqu'il est de même charge que le réseau polymérique (90). La BSA est ici globalement négative, du fait d'un pH (d'une valeur de 7,4) supérieur au point isoélectrique de la protéine ( $pI = 4,7$ ) (169). La greffe de molécules silylées positives sur les chaînes de PEG (par hydrolyse/condensation) pourrait ainsi ralentir la libération de la BSA, et donc limiter le *burst release*. Une deuxième possibilité pourrait être d'utiliser des tensioactifs entrant en compétition avec la BSA au niveau de l'interface. Si les tensioactifs se placent de façon plus dense et s'adsorbent plus vite que la protéine, cela pourrait limiter la présence de cette dernière à l'interface. Des tensioactifs silylés pourraient même être utilisés. Ces tensioactifs réticulables pourraient éventuellement retenir la BSA enchevêtrée à l'interface. Enfin, une dernière voie pour limiter le *burst release* pourrait être de diminuer encore la taille de maille. Cela peut être fait en augmentant le nombre de fonctions siloxanes, en augmentant la concentration en PEG-Si, ou bien en séchant les microgels avant la fin de la réticulation. En effet, le séchage entraîne une contraction des gels, et donc une mise en contact plus intime des chaînes polymériques entre elles, qui réticulent plus efficacement. Des résultats expérimentaux, encore en cours de validation, semblent appuyer cette hypothèse.

On trouve d'autres travaux sur des gels de PEG encapsulant de la BSA (170). La réticulation opérée par cette équipe limite fortement le *burst release*, qui existe malgré tout, mais à moindre mesure. Cependant, il paraît difficile de réaliser une comparaison catégorique, car nous n'avons aucune idée de la taille de maille des gels présentés. De plus, les gels cités sont de taille macroscopique. La surface de contact avec le milieu de libération est donc moindre que dans le cas de microgels. Aussi, la distance de diffusion au sein de la matrice est plus importante pour des macrogels que pour des microgels. La diffusion est donc logiquement moins rapide, d'où une libération plus lente que pour des microgels (171). Aussi, les gels préparés par cette équipe contiennent une fraction de chitosane dans leur matrice, ce qui peut générer des interactions électrostatiques attractives entre la protéine négative et le réseau polymérique partiellement positif.

### **IV.3. Voies d'administration possibles des microgels**

Cette thèse fut l'occasion de montrer qu'il était possible, grâce à un procédé microfluidique simple, de produire des microgels encapsulant des protéines. Cette discussion intervient donc à l'issue d'une preuve de concept. Aucun contexte pathologique n'étant ciblé en particulier, l'objectif est maintenant d'appréhender les différentes voies d'administration éventuellement compatibles avec les caractéristiques de nos microgels. Cette analyse, loin d'être exhaustive, se focalisera sur les différentes voies d'administration de particules gélifiées, qu'elles encapsulent ou non des protéines. Elle portera sur la possibilité d'administrer nos microgels par voie parentérale, orale ou topique ; sur l'existence ou non d'études précurseuses, et sur les limites à surmonter pour accéder à certaines voies *a priori* incompatibles.

### IV.3.1. Voies parentérales

#### IV.3.1.1 Voie intraveineuse

Si les voies parentérales sont souvent les plus évidentes pour les systèmes particuliers, la taille des microgels est *a priori* incompatible avec une administration en intraveineuse. En effet, les capillaires pulmonaires, dont la lumière avoisine les 6 µm de diamètre (172), retiendraient les microgels les plus gros. A notre connaissance, il n'y a pas de spécifications en termes de diamètre maximal injectable. Cependant, une étude évoque des spécifications USP donnant un seuil de 5 µm pour les émulsions H/E, avec tout au plus 0,05 % des gouttes pouvant dépasser cette valeur (173). Cette marge est permise par la nature liquide des gouttes d'huile, qui peuvent passer dans les vaisseaux les plus petits en se déformant. Or, les microgels produits au cours de la présente étude sont solides, comme en témoignent leur module d'indentation : une spécification adaptée à cette moindre déformabilité serait donc encore plus restrictive. On estime à 4 % la proportion de microgels chargés en BSA supérieurs à 5 µm. Le risque d'embolie pulmonaire et de phlébite est donc bien présent. Ainsi, on évitera d'administrer les microgels produits par voie intraveineuse, excepté dans les cas où l'on recherche l'embolie. Il existe en effet des thérapies dites de « chimioembolisation », pour lesquels on injecte volontairement des microgels de grande taille interrompant le flux sanguin vers une tumeur. Ces microgels, qui peuvent aussi encapsuler une molécule active, peuvent alors libérer cette dernière au plus près de l'organe cible. Des microgels de PEG ont déjà été proposés pour ce type de traitement (174–176). La taille de ces derniers dépend des vaisseaux à emboliser, mais ils sont en général plus gros que ceux décrits dans la présente thèse. Une utilisation dans ce cadre-là ne semble donc pas envisageable sans une augmentation de la taille des microgels de PEG-Si.

#### IV.3.1.2 Autres voies parentérales

Si l'injection en intraveineuse des microgels produits ne semble pas pertinente, d'autres voies parentérales sont possibles pour obtenir un effet systémique. Par exemple, on trouve trace d'un vaccin encapsulé dans des microgels, pour une administration par injection sous-cutanée (177). Des microgels libérant de l'insuline en sous-cutané ont aussi pu être testés chez la souris (93). La voie intramusculaire est une autre solution, avec des microgels utilisés comme adjuvant dans un vaccin (178).

Pour des effets loco-régionaux, les voies intra-articulaires (179) et intra-myocardiques (180) ont déjà été explorées. Il semblerait que pour ces formes-là, la taille des microgels à injecter soit moins problématique qu'en intraveineuse.

Le segment postérieur de l'œil peut aussi faire l'objet de traitements par injection locale. En effet, la diffusion de molécules actives du sang vers ces structures est souvent limitée par la barrière hémato-rétinienne. Les administrations intravitréale et subconjonctivale permettent de contourner ce problème (181). Et si l'injection de molécules actives à l'état dissout est possible, une encapsulation de ces molécules permet de ralentir leur libération et leur clairance, et de diminuer leur toxicité locale (181,182). Il n'y a à notre connaissance aujourd'hui aucune étude sur des nanogels ou des microgels injectés dans l'œil. De nombreux autres systèmes particuliers ont en revanche été testés (181,182). Cependant, ils peuvent parfois rendre la vision floue ; un inconvénient que des particules gélifiées n'auraient peut-être pas, du fait d'indices de réfraction proches de celui de l'eau.

Enfin, une dernière voie parentérale peut-être proposée : la voie transtympanique. Si elle reste une voie peu commune, elle est cependant la voie la moins invasive dans le traitement de certaines pathologies de l'oreille interne. L'injection se fait alors au travers du tympan, dans l'oreille moyenne. L'actif doit alors diffuser jusqu'à la membrane de la fenêtre ronde, point d'entrée vers la cochlée et l'oreille interne. Or, le renouvellement de la périlymphe de l'oreille moyenne est très rapide, conduisant à un temps de résidence très court des actifs dans ce compartiment. Dans ce cadre, l'injection de systèmes particuliers et/ou d'hydrogels est pertinent. En effet, si la taille des microgels ne leur permet pas de passer la fenêtre ronde, un brevet décrit comment les inclure dans un film s'appliquant sur la cochlée, les stabilisant à proximité de la fenêtre ronde pour y libérer de façon prolongée des actifs (184). Si le passage des particules est souhaité, il est préférable d'utiliser des particules nanométriques. Aucun nanogel n'a été développé à cet effet, mais de nombreuses nanoparticules sont décrites dans la littérature (183). Ainsi, rien ne semble limiter l'utilisation de nanogels, qui restent une forme de choix si l'actif est une protéine ou un peptide thérapeutique.

### **IV.3.2. Voie orale**

Si de nombreuses voies parentérales peuvent être envisagées pour l'administration des microgels, la voie orale reste une alternative intéressante lorsqu'un effet systémique est recherché. Elle est même bien souvent préférée des patients, en ce qu'elle est non invasive. En outre, certains systèmes particuliers ont l'avantage de protéger l'actif qu'ils encapsulent, du fait des matériaux qui les composent. Cela peut leur conférer la capacité d'éviter la dégradation enzymatique et chimique de substances actives fragiles, notamment dans l'estomac (185). Les particules, une fois dans l'intestin, peuvent alors soit rester dans la lumière du tube digestif, soit être internalisées par les cellules de la muqueuse intestinale. Le devenir des particules est en fait régi par leurs caractéristiques physico-chimiques, et notamment (mais pas exclusivement) par leur taille. En effet, il semblerait que la probabilité d'internalisation d'une particule diminue d'autant plus que leur taille augmente (186). Dans le cas des microgels produits au cours des travaux présentés ici, l'internalisation serait probablement minimale. L'élimination des microgels risque donc d'être très rapide. Dans ce cas, il conviendrait de mettre à profit la mucoadhésivité de certains matériaux pour garder au moins les particules en contact intime avec les muqueuses digestives. L'incorporation de cystéine ou de chitosane à nos gels pourrait favoriser ce phénomène (185,187). Elle permettrait d'augmenter le temps de résidence des microgels dans le tractus digestif, et d'installer un gradient de diffusion de l'actif encapsulé de la particule adhésive vers les cellules intestinales. Dans ce contexte, des microgels pour administration orale ont été proposés par plusieurs équipes, pour encapsuler des petites molécules (188), des protéines comme l'insuline (189,190), et même des lactobacilles pour des traitements probiotiques (191–193). Dans ce dernier cas cependant, les microgels sont bien plus gros que ceux décrits dans la présente thèse, avec des tailles de plusieurs centaines de micromètres.

### **IV.3.3. Voies topiques**

En dehors des voies parentérales et orales, les systèmes galéniques particuliers peuvent enfin être appliqués par voie topique. La voie topique la plus courante est la voie transdermique, et on trouve en effet plusieurs publications sur des suspensions de particules pour cette voie. Il est couramment admis que les nanoparticules à visée thérapeutique ne pénètrent pas la barrière cutanée lorsqu'elle est saine (194,195). Cependant, on relève plusieurs articles faisant état de la pénétration de nanoparticules, voire même de

microparticules, pénétrant la peau jusqu'à ses couches viables (196–198). Or, il est difficile de comparer les études entre elles et de formuler des conclusions générales valables pour tous les types de particules. L'état physiopathologique de la peau utilisée (espèce donneuse, zone du corps, taux d'hydratation, lésions, pathologies sous-jacentes) et la nature des particules (hydrophobie, charge de surface, présence de tensioactifs) sont des facteurs à prendre en compte lorsqu'on analyse de telles données, alors que la taille des particules est bien souvent le seul facteur discuté. Aucune hypothèse ne sera donc faite quant à la possible pénétration des microgels dans la barrière cutanée. Si la pénétration des particules fait toujours débat, il y a bien consensus sur le fait qu'elles s'accumulent dans les follicules pileux. Cette accumulation, loin d'être un problème, fait du follicule un réservoir d'où peut se faire la libération des actifs encapsulés à même de passer la barrière cutanée. On trouve ainsi mention de suspensions de microgels de polymère acrylique pour application cutanée, ayant pour objectif une perméation de l'actif à travers toutes les couches de la peau (199). D'autres publications font état de microgels polyacryliques chargés d'actifs, eux-mêmes piégés dans un film polyacrylique pour panser des plaies (200). Lorsque la diffusion de l'actif à travers les couches externes de la peau est trop lente, il est possible d'utiliser des dispositifs transdermiques à micro-aiguilles pour amener les microgels au plus près des couches viables de la peau (201,202).

Si la peau est le tissu le plus souvent visé par les formulations à application topique, d'autres voies existent. Les segments antérieurs de l'œil par exemple, comme la cornée et l'uvée, peuvent être traités par une application topique. L'inconvénient majeur de cette voie est le temps de résidence très court des substances actives dissoutes. Or, une encapsulation dans des micro/nanoparticules permet de ralentir l'élimination de ces substances actives par le drainage lacrymal, et de contrôler leur libération (182,203). Dans ce contexte, des nanogels contenant du timolol ont été inclus dans des lentilles de contact, permettant une libération topique prolongée du timolol (204). Pour ce type d'applications, la taille des particules ne semble pas être un élément limitant. Il est donc possible d'imaginer utiliser les microgels décrits dans la présente thèse selon un modèle similaire. En revanche, lorsque la pénétration au travers de la cornée est désirée, une taille nanométrique doit être préférée. Des études montrent en effet que des nanogels de chitine pouvaient pénétrer dans les couches profondes de la cornée (205). La pilocarpine et la dexaméthasone ont ainsi fait l'objet d'une encapsulation dans des nanogels pour l'administration topique en collyre (206,207). A notre connaissance, aucune étude à ce jour ne décrit l'utilisation de gels de taille micrométrique en application topique sur l'œil. Cependant, on trouve mention de microsphères non hydratées de gélatine en suspension dans l'eau, libérant de la pilocarpine de façon prolongée (208). Ces microsphères ne sont pas décrites comme des microgels. Cependant, leur hydratation à une température proche de la température de solubilisation moyenne des gélatines (209) pourrait faire d'elles des microgels. Quoiqu'il en soit, nous ne voyons pas de raison de limiter la voie oculaire aux seules objets nanométriques, tant que le confort du patient est préservé. En effet, au-delà de 10  $\mu\text{m}$ , une sensation de grain de sable peut apparaître après instillation des microparticules (210). Cependant, les microgels de PEG-Si restent en-dessous de cette valeur.

Enfin, il convient de citer les voies nasales et vaginales, qui sont peu étudiées mais restent un champ pertinent d'application de gels particuliers. Par exemple, des nanogels entourés de bicouches lipidiques ont été développés pour imiter les virus, et servir de vaccins biomimétiques (211). Ces formes sont envisagées pour une administration nasale ou vaginale, car ces organes sont le siège de réactions immunitaires mucosales supportées par la

production d'immunoglobulines A. Si l'imitation de virus nécessite une taille nanométrique, on peut imaginer des vecteurs biomimétiques d'antigènes bactériens, plutôt micrométriques. Dans ce cadre, les microgels décrits dans la présente thèse seraient une forme intéressante.

## Conclusion et Perspectives

---

L'objectif de cette thèse était le développement de microgels de PEG-Si par microfluidique, réticulés en conditions douces, en vue de la microencapsulation de protéines et/ou de peptides. Nous avons tenté de répondre point par point à un cahier des charges adapté aux applications de microencapsulation de matériel biologique. En s'appuyant sur notre compréhension des mécanismes de réticulation d'un PEG bis-silylé, nous avons pu optimiser les conditions de la réticulation pour qu'elle se fasse en conditions douces, en moins de 2h après application d'un changement de pH. Nous avons alors réalisé une émulsion E/H par un procédé microfluidique simple, pour mettre en œuvre cette réticulation maîtrisée au cœur des gouttes d'eau. Les microgels ainsi obtenus avaient une résistance mécanique importante, témoin de leur réticulation chimique, et une taille adaptée à un grand nombre de voies d'administration. Devant ces résultats encourageants sur les systèmes blancs une protéine modèle, la BSA, a été incorporée à la phase aqueuse. L'encapsulation de la protéine fut un succès, car nous avons obtenu des microgels capables de libérer en 24h environ 80 % de la BSA.

Cependant, quelques points restent à améliorer. En effet, la distribution granulométrique des microgels était relativement large. L'utilisation de circuits microfluidiques sur puce développées suite à ces travaux pourrait permettre d'homogénéiser la taille des microgels. En outre, l'ajout de la BSA au sein du système a provoqué certaines perturbations au niveau de l'émulsification. Ces perturbations doivent être analysées, et leurs causes comprises, afin de pouvoir les prévenir. Enfin, notons que si la protéine a bien été encapsulée dans les microgels, elle restait très majoritairement en surface, occasionnant un *burst release* dans les premières minutes d'immersion dans le milieu de dissolution. L'ajout de charges positives au sein du système grâce à la chimie des alkoxy-silyles est la voie privilégiée aujourd'hui pour ralentir la libération.

Ainsi, si le procédé reste à optimiser, le travail développé tout au long de cette thèse n'en reste pas moins une preuve de concept solide pour le développement d'une plateforme polyvalente et adaptable d'encapsulation de protéines thérapeutiques. Cette plateforme s'appuie notamment sur deux piliers majeurs : un matériau biocompatible réticulant dans des conditions douces, et un procédé extrêmement flexible, modulable à l'envie, et adapté aux défis de la production industrielle de demain.

## Références bibliographiques

---

1. Tourné-Péteilh C, Robin B, Lions M, Martinez J, Mehdi A, Subra G, et al. Combining sol-gel and microfluidics processes for the synthesis of protein-containing hybrid microgels. *Chem Commun* [Internet]. 30 sept 2019 [cité 28 oct 2019]; Disponible sur: <http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2019/cc/c9cc04963k>
2. Banga AK, Chien YW. Systemic delivery of therapeutic peptides and proteins. *Int J Pharm*. 1 déc 1988;48(1):15-50.
3. Lu Y, Yang J, Segal E. Issues related to targeted delivery of proteins and peptides. *AAPS J*. 21 juill 2006;8(3):E466-78.
4. Lu Y, Sun W, Gu Z. Stimuli-responsive nanomaterials for therapeutic protein delivery. *J Controlled Release*. 28 nov 2014;194:1-19.
5. Bernard J. Biomédicaments en France - Etat des lieux 2014 [Internet]. LEEM - Comité Biotech; 2014 sept [cité 31 mars 2018] p. 33. Disponible sur: <http://www.leem.org/sites/default/files/Biom%C3%A9dicaments-etat-des-lieux-2014.pdf>
6. Leader B, Baca QJ, Golan DE. Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification. *Nat Rev Drug Discov*. janv 2008;7(1):21-39.
7. Usmani SS, Bedi G, Samuel JS, Singh S, Kalra S, Kumar P, et al. THPdb: Database of FDA-approved peptide and protein therapeutics. *PLOS ONE*. 31 juill 2017;12(7):e0181748.
8. Fosgerau K, Hoffmann T. Peptide therapeutics: current status and future directions. *Drug Discov Today*. 1 janv 2015;20(1):122-8.
9. Frokjaer S, Otzen DE. Protein drug stability: a formulation challenge. *Nat Rev Drug Discov*. avr 2005;4(4):298-306.
10. Houston ME, Campbell AP, Lix B, Kay CM, Sykes BD, Hodges RS. Lactam Bridge Stabilization of  $\alpha$ -Helices: The Role of Hydrophobicity in Controlling Dimeric versus Monomeric  $\alpha$ -Helices. *Biochemistry*. 1 janv 1996;35(31):10041-50.
11. Fiche info - VICTOZA 6 mg/ml, solution injectable en stylo prérempli - Base de données publique des médicaments [Internet]. [cité 17 juin 2018]. Disponible sur: <http://base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr/extrait.php?specid=62645506#>
12. Fiche info - PEGASYS 180 microgrammes, solution injectable en stylo prérempli - Base de données publique des médicaments [Internet]. [cité 31 mars 2018]. Disponible sur: <http://base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr/extrait.php?specid=64839577>
13. Fiche info - PLEGRIDY 125 microgrammes, solution injectable en stylo prérempli - Base de données publique des médicaments [Internet]. [cité 31 mars 2018]. Disponible sur: <http://base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr/extrait.php?specid=60665360#>
14. Yadav SC, Kumari A, Yadav R. Development of peptide and protein nanotherapeutics by nanoencapsulation and nanobioconjugation. *Peptides*. 1 janv 2011;32(1):173-87.
15. Jorgensen L, Moeller EH, van de Weert M, Nielsen HM, Frokjaer S. Preparing and evaluating delivery systems for proteins. *Eur J Pharm Sci*. 1 nov 2006;29(3):174-82.

16. McClements DJ. Encapsulation, protection, and delivery of bioactive proteins and peptides using nanoparticle and microparticle systems: A review. *Adv Colloid Interface Sci.* 1 mars 2018;253:1-22.
17. Du AW, Stenzel MH. Drug Carriers for the Delivery of Therapeutic Peptides. *Biomacromolecules.* 14 avr 2014;15(4):1097-114.
18. Masuda K, Horie K, Suzuki R, Yoshikawa T, Hirano K. Oral-Antigen Delivery via a Water-in-Oil Emulsion System Modulates the Balance of the Th1/Th2 Type Response in Oral Tolerance. *Pharm Res.* 1 janv 2003;20(1):130-4.
19. Jorgensen L, Vermehren C, Bjerregaard S, Frokjaer S. In vitro release of insulin aspart incorporated into water-in-oil emulsions. *J Drug Deliv Sci Technol.* 1 janv 2004;14(6):455-9.
20. Couvreur P, Puisieux F. Nano- and microparticles for the delivery of polypeptides and proteins. *Adv Drug Deliv Rev.* 1 mai 1993;10(2):141-62.
21. Sinha VR, Trehan A. Biodegradable microspheres for protein delivery. *J Controlled Release.* 31 juill 2003;90(3):261-80.
22. De Koker S, De Cock LJ, Rivera-Gil P, Parak WJ, Auzély Veltz R, Vervaet C, et al. Polymeric multilayer capsules delivering biotherapeutics. *Adv Drug Deliv Rev.* 14 août 2011;63(9):748-61.
23. Almeida AJ, Souto E. Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins. *Adv Drug Deliv Rev.* 10 juill 2007;59(6):478-90.
24. Sharma AR, Kundu SK, Nam J-S, Sharma G, Priya Doss CG, Lee S-S, et al. Next Generation Delivery System for Proteins and Genes of Therapeutic Purpose: Why and How? [Internet]. *BioMed Research International.* 2014 [cité 13 nov 2019]. Disponible sur: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/327950/abs/>
25. Rogovina LZ, Vasil'ev VG, Braudo EE. Definition of the concept of polymer gel. *Polym Sci Ser C.* 1 sept 2008;50(1):85-92.
26. Li J, Mooney DJ. Designing hydrogels for controlled drug delivery. *Nat Rev Mater.* déc 2016;1(12):16071.
27. Gu H, Duits MHG, Mugele F. Droplets Formation and Merging in Two-Phase Flow Microfluidics. *Int J Mol Sci.* 15 avr 2011;12(12):2572-97.
28. Masaro L, Zhu XX. Physical models of diffusion for polymer solutions, gels and solids. *Prog Polym Sci.* 1 août 1999;24(5):731-75.
29. Amsden B. Solute Diffusion within Hydrogels. Mechanisms and Models. *Macromolecules.* 1 nov 1998;31(23):8382-95.
30. Gutenwik J, Nilsson B, Axelsson A. Determination of protein diffusion coefficients in agarose gel with a diffusion cell. *Biochem Eng J.* 1 juill 2004;19(1):1-7.
31. O'Shea TM, Aimetti AA, Kim E, Yesilyurt V, Langer R. Synthesis and Characterization of a Library of In-Situ Curing, Nonswelling Ethoxylated Polyol Thiol-ene Hydrogels for Tailorable Macromolecule Delivery. *Adv Mater.* 1 janv 2015;27(1):65-72.

32. Ishihara M, Obara K, Ishizuka T, Fujita M, Sato M, Masuoka K, et al. Controlled release of fibroblast growth factors and heparin from photocrosslinked chitosan hydrogels and subsequent effect on in vivo vascularization. *J Biomed Mater Res A*. 1 mars 2003;64A(3):551-9.
33. Kean T, Thanou M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Adv Drug Deliv Rev*. 31 janv 2010;62(1):3-11.
34. Wang L, Liu M, Gao C, Ma L, Cui D. A pH-, thermo-, and glucose-, triple-responsive hydrogels: Synthesis and controlled drug delivery. *React Funct Polym*. 1 mars 2010;70(3):159-67.
35. Tong J, Anderson JL. Partitioning and diffusion of proteins and linear polymers in polyacrylamide gels. *Biophys J*. 1 mars 1996;70(3):1505-13.
36. Pagels RF, Prud'homme RK. Polymeric nanoparticles and microparticles for the delivery of peptides, biologics, and soluble therapeutics. *J Controlled Release*. 10 déc 2015;219:519-35.
37. Mann BK, Schmedlen RH, West JL. Tethered-TGF- $\beta$  increases extracellular matrix production of vascular smooth muscle cells. *Biomaterials*. 1 mars 2001;22(5):439-44.
38. Van Hove AH, G. Beltejar M-J, Benoit DSW. Development and in vitro assessment of enzymatically-responsive poly(ethylene glycol) hydrogels for the delivery of therapeutic peptides. *Biomaterials*. 1 déc 2014;35(36):9719-30.
39. Macdonald ML, Samuel RE, Shah NJ, Padera RF, Beben YM, Hammond PT. Tissue integration of growth factor-eluting layer-by-layer polyelectrolyte multilayer coated implants. *Biomaterials*. 1 févr 2011;32(5):1446-53.
40. Mateen R, Hoare T. Injectable, in situ gelling, cyclodextrin–dextran hydrogels for the partitioning-driven release of hydrophobic drugs. *J Mater Chem B*. 2014;2(32):5157-67.
41. Rabinow BE. Nanosuspensions in drug delivery. *Nat Rev Drug Discov*. sept 2004;3(9):785-96.
42. Cheng Y, Prud'homme RK, Thomas JL. Diffusion of mesoscopic probes in aqueous polymer solutions measured by fluorescence recovery after photobleaching. *Macromolecules*. 2002;35(21):8111-21.
43. Vert M, Doi Y, Hellwich K-H, Hess M, Hodge P, Kubisa P, et al. Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). *Pure Appl Chem*. 2012;84(2):377–410.
44. Senff H, Richtering W. Influence of cross-link density on rheological properties of temperature-sensitive microgel suspensions. *Colloid Polym Sci*. 1 sept 2000;278(9):830-40.
45. Wang H, Boerman OC, Sariibrahimoglu K, Li Y, Jansen JA, Leeuwenburgh SCG. Comparison of micro- vs. nanostructured colloidal gelatin gels for sustained delivery of osteogenic proteins: Bone morphogenetic protein-2 and alkaline phosphatase. *Biomaterials*. 1 nov 2012;33(33):8695-703.

46. Zhang H, Mardyani S, Chan WCW, Kumacheva E. Design of Biocompatible Chitosan Microgels for Targeted pH-Mediated Intracellular Release of Cancer Therapeutics. *Biomacromolecules*. 1 mai 2006;7(5):1568-72.
47. Jagur-Grodzinski J. Polymeric gels and hydrogels for biomedical and pharmaceutical applications. *Polym Adv Technol*. 1 janv 2010;21(1):27-47.
48. Liu L-S, Liu S-Q, Ng SY, Froix M, Ohno T, Heller J. Controlled release of interleukin-2 for tumour immunotherapy using alginate/chitosan porous microspheres. *J Controlled Release*. 3 janv 1997;43(1):65-74.
49. Karakasyan C, Mathos J, Lack S, Davy J, Marquis M, Renard D. Microfluidics-assisted generation of stimuli-responsive hydrogels based on alginates incorporated with thermo-responsive and amphiphilic polymers as novel biomaterials. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2015;135:619-29.
50. Marquis M, Davy J, Cathala B, Fang A, Renard D. Microfluidics assisted generation of innovative polysaccharide hydrogel microparticles. *Carbohydr Polym*. 2015;116:189-99.
51. Marquis M, Alix V, Capron I, Cuenot S, Zykwincka A. Microfluidic Encapsulation of Pickering Oil Microdroplets into Alginate Microgels for Lipophilic Compound Delivery. *ACS Biomater Sci Eng*. 2016;2(4):535-43.
52. Reis CP, Neufeld RJ, Vilela S, Ribeiro AJ, Veiga F. Review and current status of emulsion/dispersion technology using an internal gelation process for the design of alginate particles. *J Microencapsul*. 1 janv 2006;23(3):245-57.
53. Marquis M, Davy J, Fang A, Renard D. Microfluidics-Assisted Diffusion Self-Assembly: Toward the Control of the Shape and Size of Pectin Hydrogel Microparticles. *Biomacromolecules*. 12 mai 2014;15(5):1568-78.
54. Costa ALR, Gomes A, Ushikubo FY, Cunha RL. Gellan microgels produced in planar microfluidic devices. *J Food Eng*. sept 2017;209:18-25.
55. Aydin Z, Akbuğa J. Chitosan beads for the delivery of salmon calcitonin: Preparation and release characteristics. *Int J Pharm*. 5 avr 1996;131(1):101-3.
56. Calvo P, Remuñan-López C, Vila-Jato JL, Alonso MJ. Chitosan and Chitosan/Ethylene Oxide-Propylene Oxide Block Copolymer Nanoparticles as Novel Carriers for Proteins and Vaccines. *Pharm Res*. 1 oct 1997;14(10):1431-6.
57. Pan Y, Li Y, Zhao H, Zheng J, Xu H, Wei G, et al. Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo. *Int J Pharm*. 5 déc 2002;249(1-2):139-47.
58. Sezer AD, Akbuğa J. Controlled release of piroxicam from chitosan beads. *Int J Pharm*. 6 juill 1995;121(1):113-6.
59. Mandal TK, Bostanian LA, Graves RA, Chapman SR. Poly(d,l-Lactide-Co-Glycolide) Encapsulated Poly(Vinyl Alcohol) Hydrogel as a Drug Delivery System. *Pharm Res*. 1 nov 2002;19(11):1713-9.
60. Ficek BJ, Peppas NA. Novel preparation of poly (vinyl alcohol) microparticles without crosslinking agent for controlled drug delivery of proteins. *J Controlled Release*. 1 déc 1993;27(3):259-64.

61. Peppas NA, Merrill EW. Development of semicrystalline poly(vinyl alcohol) hydrogels for biomedical applications. *J Biomed Mater Res.* 1 mai 1977;11(3):423-34.
62. Rossow T, Heyman JA, Ehrlicher AJ, Langhoff A, Weitz DA, Haag R, et al. Controlled Synthesis of Cell-Laden Microgels by Radical-Free Gelation in Droplet Microfluidics. *J Am Chem Soc.* 2012;134(10):4983-9.
63. Yun YH, Goetz DJ, Yellen P, Chen W. Hyaluronan microspheres for sustained gene delivery and site-specific targeting. *Biomaterials.* 1 janv 2004;25(1):147-57.
64. Plamper FA, Richtering W. Functional Microgels and Microgel Systems. *Acc Chem Res.* févr 2017;50(2):131-40.
65. Bachman H, Brown AC, Clarke KC, Dhada KS, Douglas A, Hansen CE, et al. Ultrasoft, highly deformable microgels. *Soft Matter.* 2015;11(10):2018-28.
66. Glaubitz M, Medvedev N, Pussak D, Hartmann L, Schmidt S, Helm CA, et al. A novel contact model for AFM indentation experiments on soft spherical cell-like particles. *Soft Matter.* 2014;10(35):6732-41.
67. West JL, Hubbell JA. Photopolymerized hydrogel materials for drug delivery applications. *React Polym.* 1 juin 1995;25(2):139-47.
68. Trongsatitkul T, Budhlall BM. Multicore–Shell PNIPAm-co-PEGMA Microcapsules for Cell Encapsulation. *Langmuir.* 15 nov 2011;27(22):13468-80.
69. Rolland JP, Maynor BW, Euliss LE, Exner AE, Denison GM, DeSimone JM. Direct Fabrication and Harvesting of Monodisperse, Shape-Specific Nanobiomaterials. *J Am Chem Soc.* 1 juill 2005;127(28):10096-100.
70. Celetti G, Natale CD, Causa F, Battista E, Netti PA. Functionalized poly(ethylene glycol) diacrylate microgels by microfluidics: In situ peptide encapsulation for in serum selective protein detection. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 1 sept 2016;145:21-9.
71. Cha C, Oh J, Kim K, Qiu Y, Joh M, Shin SR, et al. Microfluidics-Assisted Fabrication of Gelatin-Silica Core–Shell Microgels for Injectable Tissue Constructs. *Biomacromolecules.* 2014;15(1):283-90.
72. Nguyen AH, McKinney J, Miller T, Bongiorno T, McDevitt TC. Gelatin methacrylate microspheres for controlled growth factor release. *Acta Biomater.* 2015;13:101-10.
73. Cretu A, Kipping M, Adler H-J, Kuckling D. Synthesis and characterization of hydrogels containing biodegradable polymers. *Polym Int.* 1 juill 2008;57(7):905-11.
74. Jagadeesan D, Nasimova I, Gourevich I, Starodubtsev S, Kumacheva E. Microgels for the Encapsulation and Stimulus-Responsive Release of Molecules with Distinct Polarities. *Macromol Biosci.* 2011;11(7):889-96.
75. Trongsatitkul T, Budhlall BM. Temperature dependence of serum protein adsorption in {PEGylated} {PNIPAm} microgels. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2013;103:244-52.
76. Bromberg LE, Ron ES. Temperature-responsive gels and thermogelling polymer matrices for protein and peptide delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 4 mai 1998;31(3):197-221.

77. Majorek KA, Porebski PJ, Dayal A, Zimmerman MD, Jablonska K, Stewart AJ, et al. Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. *Mol Immunol.* 1 oct 2012;52(3):174-82.
78. Salis A, Boström M, Medda L, Cugia F, Barse B, Parsons DF, et al. Measurements and Theoretical Interpretation of Points of Zero Charge/Potential of BSA Protein. *Langmuir.* 20 sept 2011;27(18):11597-604.
79. Halwer M, Nutting GC, Brice BA. Molecular Weight of Lactoglobulin, Ovalbumin, Lysozyme and Serum Albumin by Light Scattering<sup>2</sup>. *J Am Chem Soc.* 1 juin 1951;73(6):2786-90.
80. Nepal D, Geckeler KE. pH-Sensitive Dispersion and Debundling of Single-Walled Carbon Nanotubes: Lysozyme as a Tool. *Small.* 2006;2(3):406-12.
81. Hasegawa U, Sawada S, Shimizu T, Kishida T, Otsuji E, Mazda O, et al. Raspberry-like assembly of cross-linked nanogels for protein delivery. *J Controlled Release.* 16 déc 2009;140(3):312-7.
82. Mellott MB, Searcy K, Pishko MV. Release of protein from highly cross-linked hydrogels of poly(ethylene glycol) diacrylate fabricated by UV polymerization. *Biomaterials.* 1 mai 2001;22(9):929-41.
83. De Geest BG, Urbanski JP, Thorsen T, Demeester J, De Smedt SC. Synthesis of Monodisperse Biodegradable Microgels in Microfluidic Devices. *Langmuir.* 1 nov 2005;21(23):10275-9.
84. Johansson C, Hansson P, Malmsten M. Interaction between lysozyme and poly(acrylic acid) microgels. *J Colloid Interface Sci.* 15 déc 2007;316(2):350-9.
85. Li Y, de Vries R, Slaghek T, Timmermans J, Cohen Stuart MA, Norde W. Preparation and Characterization of Oxidized Starch Polymer Microgels for Encapsulation and Controlled Release of Functional Ingredients. *Biomacromolecules.* 13 juill 2009;10(7):1931-8.
86. Jooybar E, Abdekhodaie MJ, Mousavi A, Zoetebier B, Dijkstra PJ. Enzymatically crosslinked hyaluronic acid microgels as a vehicle for sustained delivery of cationic proteins. *Eur Polym J.* 1 juin 2019;115:234-43.
87. Lee KW, Yoon JJ, Lee JH, Kim SY, Jung HJ, Kim SJ, et al. Sustained release of vascular endothelial growth factor from calcium-induced alginate hydrogels reinforced by heparin and chitosan. *Transplant Proc.* 1 oct 2004;36(8):2464-5.
88. Lin Y-H, Sonaje K, Lin KM, Juang J-H, Mi F-L, Yang H-W, et al. Multi-ion-crosslinked nanoparticles with pH-responsive characteristics for oral delivery of protein drugs. *J Controlled Release.* 8 déc 2008;132(2):141-9.
89. Wang Y-W, Chen L-Y, An F-P, Chang M-Q, Song H-B. A novel polysaccharide gel bead enabled oral enzyme delivery with sustained release in small intestine. *Food Hydrocoll.* 1 nov 2018;84:68-74.
90. Zhang Z, Zhang R, Zou L, McClements DJ. Protein encapsulation in alginate hydrogel beads: Effect of pH on microgel stability, protein retention and protein release. *Food Hydrocoll.* 1 juill 2016;58:308-15.

91. Nolan CM, Gelbaum LT, Lyon LA. H NMR Investigation of Thermally Triggered Insulin Release from Poly(N-isopropylacrylamide) Microgels. *Biomacromolecules*. 1 oct 2006;7(10):2918-22.
92. Yin R, Tong Z, Yang D, Nie J. Glucose-responsive microhydrogels based on methacrylate modified dextran/concanavalin A for insulin delivery. *J Controlled Release*. 30 nov 2011;152:e163-5.
93. Gu Z, Dang TT, Ma M, Tang BC, Cheng H, Jiang S, et al. Glucose-Responsive Microgels Integrated with Enzyme Nanocapsules for Closed-Loop Insulin Delivery. *ACS Nano*. 27 août 2013;7(8):6758-66.
94. Murthy N, Xu M, Schuck S, Kunisawa J, Shastri N, Fréchet JM. A macromolecular delivery vehicle for protein-based vaccines: Acid-degradable protein-loaded microgels. *Proc Natl Acad Sci*. 29 avr 2003;100(9):4995-5000.
95. Hsiao L-W, Lai Y-D, Lai J-T, Hsu C-C, Wang N-Y, Steven S-SW, et al. Cross-linked polypeptide-based gel particles by emulsion for efficient protein encapsulation. *Polymer*. 21 avr 2017;115:261-72.
96. Ventura J, Eron SJ, González-Toro DC, Raghupathi K, Wang F, Hardy JA, et al. Reactive Self-Assembly of Polymers and Proteins to Reversibly Silence a Killer Protein. *Biomacromolecules*. 12 oct 2015;16(10):3161-71.
97. Thornton PD, Mart RJ, Webb SJ, Ulijn RV. Enzyme-responsive hydrogel particles for the controlled release of proteins: designing peptide actuators to match payload. *Soft Matter*. 2008;4(4):821-7.
98. Pinkerton NM, Zhang SW, Youngblood RL, Gao D, Li S, Benson BR, et al. Gelation Chemistries for the Encapsulation of Nanoparticles in Composite Gel Microparticles for Lung Imaging and Drug Delivery. *Biomacromolecules*. 13 janv 2014;15(1):252-61.
99. Lin C-C, Sawicki SM, Metters AT. Free-Radical-Mediated Protein Inactivation and Recovery during Protein Photoencapsulation. *Biomacromolecules*. 1 janv 2008;9(1):75-83.
100. Echalié C. Conception de matériaux hybrides peptidiques biomimétiques [Thèse] [Ingénierie biomoléculaire]. [Montpellier]: Université de Montpellier; 2016 [cité 15 mars 2017]. Disponible sur: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01476825/document>
101. Echalié C, Pinese C, Garric X, Van Den Berghe H, Jumas Bilak E, Martinez J, et al. Easy Synthesis of Tunable Hybrid Bioactive Hydrogels. *Chem Mater*. 2016;28(5):1261-5.
102. Echalié C, Jebors S, Laconde G, Brunel L, Verdié P, Causse L, et al. Sol-gel synthesis of collagen-inspired peptide hydrogel. *Mater Today*. 2017;20(2):59-66.
103. Vinatier C, Magne D, Moreau A, Gauthier O, Malard O, Vignes-Colombeix C, et al. Engineering cartilage with human nasal chondrocytes and a silanized hydroxypropyl methylcellulose hydrogel. *J Biomed Mater Res A*. 1 janv 2007;80A(1):66-74.
104. Buchtová N, Réthoré G, Boyer C, Guicheux J, Rambaud F, Vallé K, et al. Nanocomposite hydrogels for cartilage tissue engineering: mesoporous silica nanofibers interlinked with siloxane derived polysaccharide. *J Mater Sci Mater Med*. 1 août 2013;24(8):1875-84.

105. Bourges X, Weiss P, Daculsi G, Legeay G. Synthesis and general properties of silylated-hydroxypropyl methylcellulose in prospect of biomedical use. *Adv Colloid Interface Sci.* 2 déc 2002;99(3):215-28.
106. Zayed M, Tourne-Peteilh C, Ramonda M, Rethore G, Weiss P, Martinez J, et al. Microgels of silylated HPMC as a multimodal system for drug co-encapsulation. *Int J Pharm.* 5 nov 2017;532(2):790-801.
107. Bourges X, Weiss P, Coudreuse A, Daculsi G, Legeay G. General properties of silylated hydroxyethylcellulose for potential biomedical applications. *Biopolymers.* 5 avr 2002;63(4):232-8.
108. Martinez J, Subra G, Mehdi A, Jebors S, Enjalbal C, Brunel L, et al. Matériaux hybrides peptide-silice [Internet]. WO2013190148A1, 2013 [cité 22 juin 2017]. Disponible sur: <https://patents.google.com/patent/WO2013190148A1/fr>
109. Pinese C, Jebors S, Echalié C, Licznar-Fajardo P, Garric X, Humblot V, et al. Simple and Specific Grafting of Antibacterial Peptides on Silicone Catheters. *Adv Healthc Mater.* 1 déc 2016;5(23):3067-73.
110. Brinker CJ, Scherer GW. *Sol-gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-gel Processing.* Gulf Professional Publishing; 1990. 928 p.
111. Oh JK, Drumright R, Siegwart DJ, Matyjaszewski K. The development of microgels/nanogels for drug delivery applications. *Prog Polym Sci.* avr 2008;33(4):448-77.
112. Omi S, Ma G-H, Nagai M. Membrane emulsification a versatile tool for the synthesis of polymeric microspheres. *Macromol Symp.* 1 févr 2000;151(1):319-30.
113. Shi Y, Gao X, Chen L, Zhang M, Ma J, Zhang X, et al. High throughput generation and trapping of individual agarose microgel using microfluidic approach. *Microfluid Nanofluidics.* 1 oct 2013;15(4):467-74.
114. Sugiura S, Oda T, Izumida Y, Aoyagi Y, Satake M, Ochiai A, et al. Size control of calcium alginate beads containing living cells using micro-nozzle array. *Biomaterials.* 1 juin 2005;26(16):3327-31.
115. Mitra S, Gaur U, Ghosh PC, Maitra AN. Tumour targeted delivery of encapsulated dextran–doxorubicin conjugate using chitosan nanoparticles as carrier. *J Controlled Release.* 6 juill 2001;74(1):317-23.
116. Leong YS, Candau F. Inverse microemulsion polymerization. *J Phys Chem.* 1 juin 1982;86(13):2269-71.
117. Bodmeier R, Oh K-H, Pramart Y. Preparation and Evaluation Of Drug-Containing Chitosan Beads. *Drug Dev Ind Pharm.* 1 janv 1989;15(9):1475-94.
118. Zhang B, Tao H, Niu X, Li S, Chen H-Q. Lysozyme distribution, structural identification, and in vitro release of starch-based microgel-lysozyme complexes. *Food Chem.* 15 juill 2017;227:137-41.
119. Agnihotri SA, Aminabhavi TM. Controlled release of clozapine through chitosan microparticles prepared by a novel method. *J Controlled Release.* 28 avr 2004;96(2):245-59.

120. Yeh J, Ling Y, Karp JM, Gantz J, Chandawarkar A, Eng G, et al. Micromolding of shape-controlled, harvestable cell-laden hydrogels. *Biomaterials*. 1 nov 2006;27(31):5391-8.
121. Benoît J-P, Richard J, Venier-Julienne M-C. Microencapsulation. In: *Techniques de l'Ingénieur [Internet]*. Techniques de l'Ingénieur. Paris; 2013 [cité 7 juin 2017]. (Procédés chimie-bio-agro). Disponible sur: <http://www.techniques-ingenieur.fr/res/pdf/encyclopedia/42611210-j2210.pdf>
122. Teh S-Y, Lin R, Hung L-H, Lee AP. Droplet microfluidics. *Lab Chip*. 2008;8(2):198-220.
123. Choi C-H, Weitz DA, Lee C-S. One Step Formation of Controllable Complex Emulsions: From Functional Particles to Simultaneous Encapsulation of Hydrophilic and Hydrophobic Agents into Desired Position. *Adv Mater*. 14 mai 2013;25(18):2536-41.
124. Headen DM, Aubry G, Lu H, García AJ. Microfluidic-Based Generation of Size-Controlled, Biofunctionalized Synthetic Polymer Microgels for Cell Encapsulation. *Adv Mater*. 2014;26(19):3003–3008.
125. Wei J, Ju X-J, Zou X-Y, Xie R, Wang W, Liu Y-M, et al. Multi-Stimuli-Responsive Microcapsules for Adjustable Controlled-Release. *Adv Funct Mater*. 1 juin 2014;24(22):3312-23.
126. Nunes JK, Tsai SSH, Wan J, Stone HA. Dripping and jetting in microfluidic multiphase flows applied to particle and fibre synthesis. *J Phys Appl Phys*. 2013;46(11):114002.
127. Tice JD, Lyon AD, Ismagilov RF. Effects of viscosity on droplet formation and mixing in microfluidic channels. *Anal Chim Acta*. 2004;507(1):73-7.
128. Baroud CN, Gallaire F, Dangla R. Dynamics of microfluidic droplets. *Lab Chip*. 2010;10(16):2032-45.
129. Chau M, Abolhasani M, Therien-Aubin H, Li Y, Wang Y, Velasco D, et al. Microfluidic Generation of Composite Biopolymer Microgels with Tunable Compositions and Mechanical Properties. *Biomacromolecules*. juill 2014;15(7):2419-25.
130. Shimanovich U, Song Y, Brujic J, Shum HC, Knowles TPJ. Multiphase Protein Microgels. *Macromol Biosci*. 2015;15(4):501–508.
131. Wang CX, Utech S, Gopez JD, Mabesoone MFJ, Hawker CJ, Klinger D. Non-Covalent Microgel Particles Containing Functional Payloads: Coacervation of PEG-Based Triblocks via Microfluidics. *ACS Appl Mater Interfaces*. 6 juill 2016;8(26):16914-21.
132. Garcia A, Headen D, Phelps EA, Aubry GA, Lu H, Garcia CG. Microgels for encapsulation of cells and other biologic agents [Internet]. Atlanta; US 20150071997 A1, 2015 [cité 18 avr 2017]. Disponible sur: <http://patft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect1=PTO1&Sect2=HITOFF&d=PALL&p=1&u=%2Fnetahhtml%2FPTO%2Fsrchnum.htm&r=1&f=G&l=50&s1=9381217.PN.&OS=PN/9381217&RS=PN/9381217>
133. Deveza L, Ashoken J, Castaneda G, Tong X, Keeney M, Han L-H, et al. Microfluidic Synthesis of Biodegradable Polyethylene-Glycol Microspheres for Controlled Delivery of Proteins and DNA Nanoparticles. *ACS Biomater Sci Eng*. 2015;1(3):157-65.
134. Allazetta S, Hausherr TC, Lutolf MP. Microfluidic Synthesis of Cell-Type-Specific Artificial Extracellular Matrix Hydrogels. *Biomacromolecules*. 2013;14(4):1122-31.

135. Xia B, Krutkramelis K, Oakey J. Oxygen-Purged Microfluidic Device to Enhance Cell Viability in Photopolymerized PEG Hydrogel Microparticles. *Biomacromolecules*. 11 juill 2016;17(7):2459-65.
136. Hoffman AS. The early days of PEG and PEGylation (1970s–1990s). *Acta Biomater*. 1 août 2016;40:1-5.
137. Massiot D, Fayon F, Capron M, King I, Le Calvé S, Alonso B, et al. Modelling one- and two-dimensional solid-state NMR spectra. *Magn Reson Chem*. 1 janv 2002;40(1):70-6.
138. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 28 juin 2012;9:671-5.
139. Sader JE, Chon JWM, Mulvaney P. Calibration of rectangular atomic force microscope cantilevers. *Rev Sci Instrum*. 29 sept 1999;70(10):3967-9.
140. Hermanowicz P, Sarna M, Burda K, Gabryś H. AtomicJ: An open source software for analysis of force curves. *Rev Sci Instrum*. 1 juin 2014;85(6):063703.
141. Ferencz R, Sanchez J, Blümich B, Herrmann W. {AFM} nanoindentation to determine Young's modulus for different {EPDM} elastomers. *Polym Test*. 2012;31(3):425-32.
142. Dhahri S, Ramonda M, Marlière C. In-Situ Determination of the Mechanical Properties of Gliding or Non-Motile Bacteria by Atomic Force Microscopy under Physiological Conditions without Immobilization. *PLOS ONE*. 2013;8(4):1-23.
143. Harding JW, Sneddon IN. The elastic stresses produced by the indentation of the plane surface of a semi-infinite elastic solid by a rigid punch. *Math Proc Camb Philos Soc*. juin 1945;41(1):16-26.
144. Bovine Serum Albumin, Product Information [Internet]. Sigma; 1997 [cité 8 août 2019]. Disponible sur: [https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product\\_Information\\_Sheet/a4919pis.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/a4919pis.pdf)
145. Cheng G-X, Liu J, Zhao R-Z, Yao K-D, Sun P-C, Men A-J, et al. Studies on dynamic behavior of water in crosslinked chitosan hydrogel. *J Appl Polym Sci*. 7 févr 1998;67(6):983-8.
146. Ma J, Guo C, Tang Y, Liu H. <sup>1</sup>H NMR Spectroscopic Investigations on the Micellization and Gelation of PEO–PPO–PEO Block Copolymers in Aqueous Solutions. *Langmuir*. 1 sept 2007;23(19):9596-605.
147. Alonso B, Véron E, Durand D, Massiot D, Clinard C. New insights into the formation of textures through spray-drying and self-assembly. *Microporous Mesoporous Mater*. 2007;106(1–3):76-94.
148. Moiré M, Peysson Y, Herzhaft B, Pannacci N, Gallaire F, Augello L, et al. Ultralow Interfacial Tension Measurement through Jetting/Dripping Transition. *Langmuir*. 14 mars 2017;33(10):2531-40.
149. Murugesan T, Perumalsamy M. Densities and Viscosities of Polyethylene Glycol 2000 + Salt + Water Systems from (298.15 to 318.15) K. *J Chem Eng Data*. 2005;50(4):1290-3.

150. Opawale FO, Burgess DJ. Influence of Interfacial Properties of Lipophilic Surfactants on Water-in-Oil Emulsion Stability. *J Colloid Interface Sci.* 1 janv 1998;197(1):142-50.
151. Riechers B, Maes F, Akoury E, Semin B, Gruner P, Baret J-C. Surfactant adsorption kinetics in microfluidics. *Proc Natl Acad Sci.* 11 oct 2016;113(41):11465-70.
152. Burgess DJ, Sahin ON. Interfacial Rheological and Tension Properties of Protein Films. *J Colloid Interface Sci.* 1 mai 1997;189(1):74-82.
153. Roach LS, Song H, Ismagilov RF. Controlling Nonspecific Protein Adsorption in a Plug-Based Microfluidic System by Controlling Interfacial Chemistry Using Fluorous-Phase Surfactants. *Anal Chem.* 2005;77(3):785-96.
154. Campana M, Hosking SL, Petkov JT, Tucker IM, Webster JRP, Zorbakhsh A, et al. Adsorption of Bovine Serum Albumin (BSA) at the Oil/Water Interface: A Neutron Reflection Study. *Langmuir.* 26 mai 2015;31(20):5614-22.
155. Anna SL, Bontoux N, Stone HA. Formation of dispersions using “flow focusing” in microchannels. *Appl Phys Lett.* 15 janv 2003;APLCLASS2019(1):364-6.
156. International Council of Harmonization. Impurities: Guidelines for residual solvents (Q3C (R6)) [Internet]. ICH; 2016 [cité 26 juin 2017]. Disponible sur: [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q3C/Q3C\\_R6\\_\\_Step\\_4.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3C/Q3C_R6__Step_4.pdf)
157. Okur AC, Erkoç P, Kizilel S. Targeting cancer cells via tumor-homing peptide CREKA functional PEG nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 1 nov 2016;147:191-200.
158. Impellitteri NA, Toepke MW, Lan Levensgood SK, Murphy WL. Specific VEGF sequestering and release using peptide-functionalized hydrogel microspheres. *Biomaterials.* 1 avr 2012;33(12):3475-84.
159. Water JJ, Kim Y, Maltesen MJ, Franzky H, Foged C, Nielsen HM. Hyaluronic Acid-Based Nanogels Produced by Microfluidics-Facilitated Self-Assembly Improves the Safety Profile of the Cationic Host Defense Peptide Novicidin. *Pharm Res.* 1 août 2015;32(8):2727-35.
160. Kim Y, Lee Chung B, Ma M, Mulder WJM, Fayad ZA, Farokhzad OC, et al. Mass Production and Size Control of Lipid–Polymer Hybrid Nanoparticles through Controlled Microvortices. *Nano Lett.* 11 juill 2012;12(7):3587-91.
161. Wei X, Chang Z, Liu H. Influence of sodium dodecyl sulfate on the characteristics of bovine serum albumin solutions and foams. *J Surfactants Deterg.* 2003;6(2):107-12.
162. Kawakatsu T, Kikuchi Y, Nakajima M. Regular-sized cell creation in microchannel emulsification by visual microprocessing method. *J Am Oil Chem Soc.* 1 mars 1997;74(3):317-21.
163. Baret J-C, Kleinschmidt F, El Harrak A, Griffiths AD. Kinetic Aspects of Emulsion Stabilization by Surfactants: A Microfluidic Analysis. *Langmuir.* 2009;25(11):6088-93.
164. Phani KK, Sanyal D. The relations between the shear modulus, the bulk modulus and Young’s modulus for porous isotropic ceramic materials. *Mater Sci Eng A.* 25 août 2008;490(1):305-12.

165. Zustiak SP, Leach JB. Characterization of protein release from hydrolytically degradable poly(ethylene glycol) hydrogels. *Biotechnol Bioeng.* 2011;108(1):197-206.
166. İmren D, Gümüşderelioğlu M, Güner A. In vitro release kinetics of bovine serum albumin from highly swellable dextran hydrogels. *J Appl Polym Sci.* 2010;115(2):740-7.
167. Zuo Q, Lu J, Hong A, Zhong D, Xie S, Liu Q, et al. Preparation and characterization of PEM-coated alginate microgels for controlled release of protein. *Biomed Mater. avr* 2012;7(3):035012.
168. Martínez Rivas CJ, Tarhini M, Badri W, Miladi K, Greige-Gerges H, Nazari QA, et al. Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery. *Int J Pharm.* 30 oct 2017;532(1):66-81.
169. Ge S, Kojio K, Takahara A, Kajiyama T. Bovine serum albumin adsorption onto immobilized organotrichlorosilane surface: Influence of the phase separation on protein adsorption patterns. *J Biomater Sci Polym Ed.* 1 janv 1998;9(2):131-50.
170. Bhattarai N, Ramay HR, Gunn J, Matsen FA, Zhang M. PEG-grafted chitosan as an injectable thermosensitive hydrogel for sustained protein release. *J Controlled Release.* 18 avr 2005;103(3):609-24.
171. Lee JH, Yeo Y. Controlled drug release from pharmaceutical nanocarriers. *Chem Eng Sci.* 24 mars 2015;125:75-84.
172. Wong J, Brugger A, Khare A, Chaubal M, Papadopoulos P, Rabinow B, et al. Suspensions for intravenous (IV) injection: A review of development, preclinical and clinical aspects. *Adv Drug Deliv Rev.* 22 mai 2008;60(8):939-54.
173. Driscoll DF. Lipid Injectable Emulsions: Pharmacopeial and Safety Issues. *Pharm Res.* 9 août 2006;23(9):1959.
174. Deschamps F, Isoardo T, Denis S, Tsapis N, Tselikas L, Nicolas V, et al. Biodegradable Pickering emulsions of Lipiodol for liver trans-arterial chemo-embolization. *Acta Biomater.* 15 mars 2019;87:177-86.
175. Bédouet L, Verret V, Louguet S, Servais E, Pascale F, Beilvert A, et al. Anti-angiogenic drug delivery from hydrophilic resorbable embolization microspheres: An in vitro study with sunitinib and bevacizumab. *Int J Pharm.* 30 avr 2015;484(1):218-27.
176. Bédouet L, Moine L, Servais E, Beilvert A, Labarre D, Laurent A. Tunable delivery of niflumic acid from resorbable embolization microspheres for uterine fibroid embolization. *Int J Pharm.* 10 sept 2016;511(1):253-61.
177. De Geest BG, De Koker S, Demeester J, De Smedt SC, Hennink WE. Pulsed in vitro release and in vivo behavior of exploding microcapsules. *J Controlled Release.* 5 mai 2009;135(3):268-73.
178. Vialle R, Dupuis L, Deville S, Bertrand F, Gaucheron J, Aucouturier J. Microgel particulate adjuvant: characterisation and mechanisms of action. *Procedia Vaccinol.* 1 janv 2010;2(1):12-6.
179. Kazezian Z, Sakai D, Pandit A. Hyaluronic Acid Microgels Modulate Inflammation and Key Matrix Molecules toward a Regenerative Signature in the Injured Annulus Fibrosus. *Adv Biosyst.* 2017;1(10):1700077.

180. Cui X, Tang J, Hartanto Y, Zhang J, Bi J, Dai S, et al. NIPAM-based Microgel Microenvironment Regulates the Therapeutic Function of Cardiac Stromal Cells. *ACS Appl Mater Interfaces*. 7 nov 2018;10(44):37783-96.
181. Bochot A, Fattal E. Liposomes for intravitreal drug delivery: A state of the art. *J Controlled Release*. 20 juill 2012;161(2):628-34.
182. Halasz K, Kelly SJ, Iqbal MT, Pathak Y, Sutariya V. Micro/Nanoparticle Delivery Systems for Ocular Diseases. *ASSAY Drug Dev Technol*. 15 mai 2019;17(4):152-66.
183. Mäder K, Lehner E, Liebau A, Plontke SK. Controlled drug release to the inner ear: Concepts, materials, mechanisms, and performance. *Hear Res*. 1 oct 2018;368:49-66.
184. Dormer N, Berkland C. Extended-Release Drug Delivery Compositions [Internet]. WO/2015/191950, 2015 [cité 1 oct 2019]. Disponible sur: <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2015191950>
185. Hamman JH, Enslin GM, Kotzé AF. Oral Delivery of Peptide Drugs. *BioDrugs*. 1 mai 2005;19(3):165-77.
186. Desai MP, Labhassetwar V, Amidon GL, Levy RJ. Gastrointestinal Uptake of Biodegradable Microparticles: Effect of Particle Size. *Pharm Res*. 1 déc 1996;13(12):1838-45.
187. Vinogradov SV. Colloidal Microgels in Drug Delivery Applications [Internet]. *Current Pharmaceutical Design*. 2006 [cité 25 août 2019]. Disponible sur: <http://www.eurekaselect.com/58296/article>
188. Blanchette J, Peppas NA. Oral Chemotherapeutic Delivery: Design and Cellular Response. *Ann Biomed Eng*. 1 févr 2005;33(2):142-9.
189. Krauland AH, Bernkop-Schnürch A. Thiomers: development and in vitro evaluation of a peroral microparticulate peptide delivery system. *Eur J Pharm Biopharm*. 1 mars 2004;57(2):181-7.
190. Liu L, Zhang Y, Yu S, Zhang Z, He C, Chen X. pH- and Amylase-Responsive Carboxymethyl Starch/Poly(2-isobutyl-acrylic acid) Hybrid Microgels as Effective Enteric Carriers for Oral Insulin Delivery. *Biomacromolecules*. 11 juin 2018;19(6):2123-36.
191. Picone CSF, Bueno AC, Michelon M, Cunha RL. Development of a probiotic delivery system based on gelation of water-in-oil emulsions. *LWT*. 1 déc 2017;86:62-8.
192. Gu M, Zhang Z, Pan C, Goulette TR, Zhang R, Hendricks G, et al. Encapsulation of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* G7 in gastroprotective microgels: Improvement of the bacterial viability under simulated gastrointestinal conditions. *Food Hydrocoll*. 1 juin 2019;91:283-9.
193. Yeung TW, Üçok EF, Tiani KA, McClements DJ, Sela DA. Microencapsulation in Alginate and Chitosan Microgels to Enhance Viability of *Bifidobacterium longum* for Oral Delivery. *Front Microbiol* [Internet]. 2016 [cité 12 oct 2019];7. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.00494/full>
194. Penetration of nanoparticles and nanomaterials in the skin: Fiction or reality? *J Pharm Sci*. 1 janv 2010;99(1):21-50.

195. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 30 mai 2011;63(6):470-91.
196. Rolland A, Wagner N, Chatelus A, Shroot B, Schaefer H. Site-Specific Drug Delivery to Pilosebaceous Structures Using Polymeric Microspheres. *Pharm Res.* 1 déc 1993;10(12):1738-44.
197. de Jalón EG, Blanco-Príeto MJ, Ygartua P, Santoyo S. PLGA microparticles: possible vehicles for topical drug delivery. *Int J Pharm.* 11 sept 2001;226(1):181-4.
198. Tinkle Sally S, Antonini James M, Rich Brenda A, Roberts Jenny R, Salmen Rebecca, DePree Karyn, et al. Skin as a route of exposure and sensitization in chronic beryllium disease. *Environ Health Perspect.* 1 juill 2003;111(9):1202-8.
199. Lopez VC, Hadgraft J, Snowden MJ. The use of colloidal microgels as a (trans)dermal drug delivery system. *Int J Pharm.* 23 mars 2005;292(1):137-47.
200. Lin S-Y, Chen K-S, Run-Chu L. Design and evaluation of drug-loaded wound dressing having thermoresponsive, adhesive, absorptive and easy peeling properties. *Biomaterials.* 15 nov 2001;22(22):2999-3004.
201. Nayak A, Short L, Das DB. Lidocaine permeation from a lidocaine NaCMC/gel microgel formulation in microneedle-pierced skin: vertical (depth averaged) and horizontal permeation profiles. *Drug Deliv Transl Res.* 1 août 2015;5(4):372-86.
202. Di J, Yao S, Ye Y, Cui Z, Yu J, Ghosh TK, et al. Stretch-Triggered Drug Delivery from Wearable Elastomer Films Containing Therapeutic Depots. *ACS Nano.* 22 sept 2015;9(9):9407-15.
203. Sivaram AJ, Rajitha P, Maya S, Jayakumar R, Sabitha M. Nanogels for delivery, imaging and therapy. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 1 juill 2015;7(4):509-33.
204. Kim H-J, Zhang K, Moore L, Ho D. Diamond Nanogel-Embedded Contact Lenses Mediate Lysozyme-Dependent Therapeutic Release. *ACS Nano.* 25 mars 2014;8(3):2998-3005.
205. Mohammed N, Rejinold NS, Mangalathillam S, Biswas R, Nair SV, Jayakumar R. Fluconazole Loaded Chitin Nanogels as a Topical Ocular Drug Delivery Agent for Corneal Fungal Infections [Internet]. 2013 [cité 29 sept 2019]. Disponible sur: <http://www.ingentaconnect.com/content/asp/jbn/2013/00000009/00000009/art00006%3bjsessionid=7qr5ni3r4sudb.x-ic-live-03>
206. Moya-Ortega MD, Alves TFG, Alvarez-Lorenzo C, Concheiro A, Stefánsson E, Thorsteinsdóttir M, et al. Dexamethasone eye drops containing  $\gamma$ -cyclodextrin-based nanogels. *Int J Pharm.* 30 janv 2013;441(1):507-15.
207. Abd El-Rehim HA, Swilem AE, Klingner A, Hegazy E-SA, Hamed AA. Developing the Potential Ophthalmic Applications of Pilocarpine Entrapped Into Polyvinylpyrrolidone–Poly(acrylic acid) Nanogel Dispersions Prepared By  $\gamma$  Radiation. *Biomacromolecules.* 11 mars 2013;14(3):688-98.
208. Leucuța SE. The kinetics of in vitro release and the pharmacokinetics of miotic response in rabbits of gelatin and albumin microspheres with pilocarpine. *Int J Pharm.* 15 août 1989;54(1):71-8.

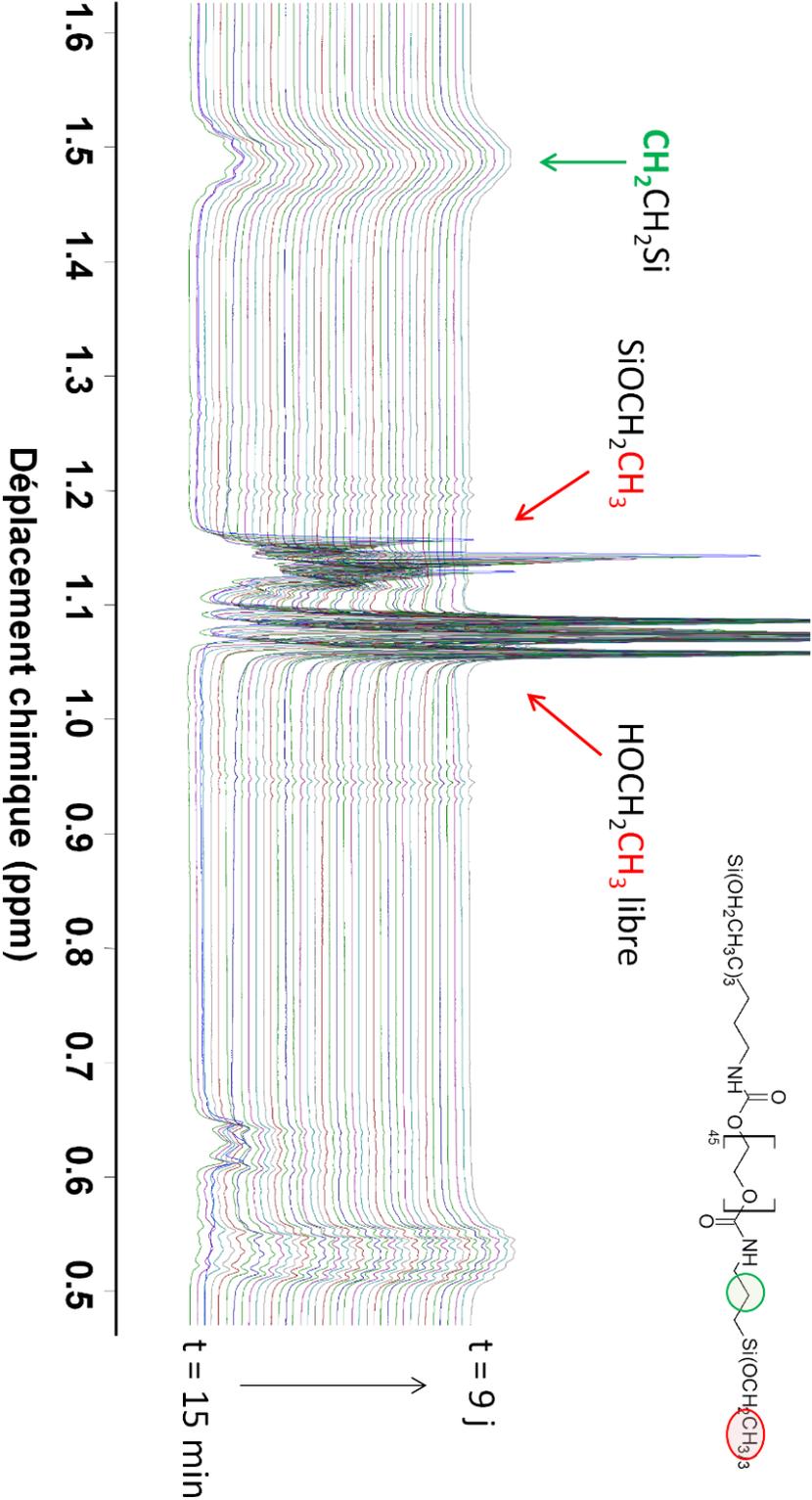
209. Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME. Gelatin. In: Handbook of pharmaceutical excipients. 6th edition. RPS Publishing (Pharmaceutical Press); 2009. p. 279.
210. Zimmer A, Kreuter J. Microspheres and nanoparticles used in ocular delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev.* 1 août 1995;16(1):61-73.
211. von Hoegen P. Synthetic biomimetic supra molecular Biovector™ (SMBV™) particles for nasal vaccine delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 23 sept 2001;51(1):113-25.

## Annexes

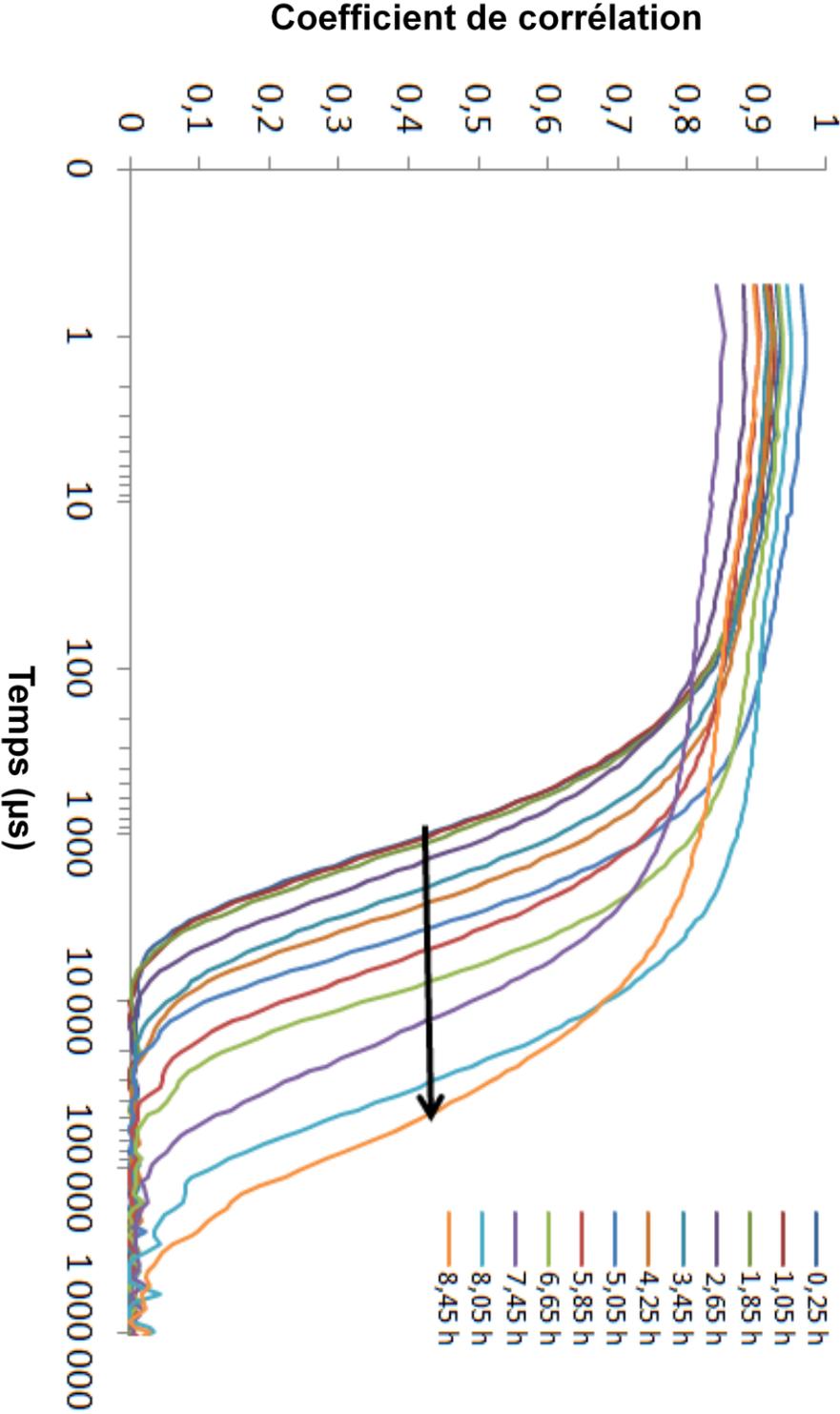
---

Annexe 1. Cinétique d'évolution du spectre RMN <sup>1</sup> H du PEG-Si ([PEG-Si] = 20 % m/v dans tampon Citrate/Phosphate à pH = 4,9), avec identification des massifs suivis .....	98
Annexe 2. Corrélogrammes des mesures réalisées en DLS au cours du temps sur une solution de [PEG-Si] = 20 % m/v à pH = 4,9 à 25°C.....	99
Annexe 3. Recherche du domaine linéaire réalisée en oscillation sur une solution de [PEG-Si] = 20 % m/v à pH = 4,9 à 25°C, 27h après la mise en solution .....	100
Annexe 4. Recherche du domaine linéaire réalisée en oscillation sur une solution de [PEG-Si] = 20 % m/v à pH = 7,5 à 25°C, ayant été neutralisée après 3h à pH = 4,9 (recherche réalisée 8h après la mise en solution).....	101
Annexe 5. Superposition des cinétiques de réticulation obtenues en RMN <sup>1</sup> H et en rhéologie en oscillation ([PEG-Si] = 20 % m/v dans tampon Citrate/Phosphate à pH = 4,9 à 25°C) .....	102

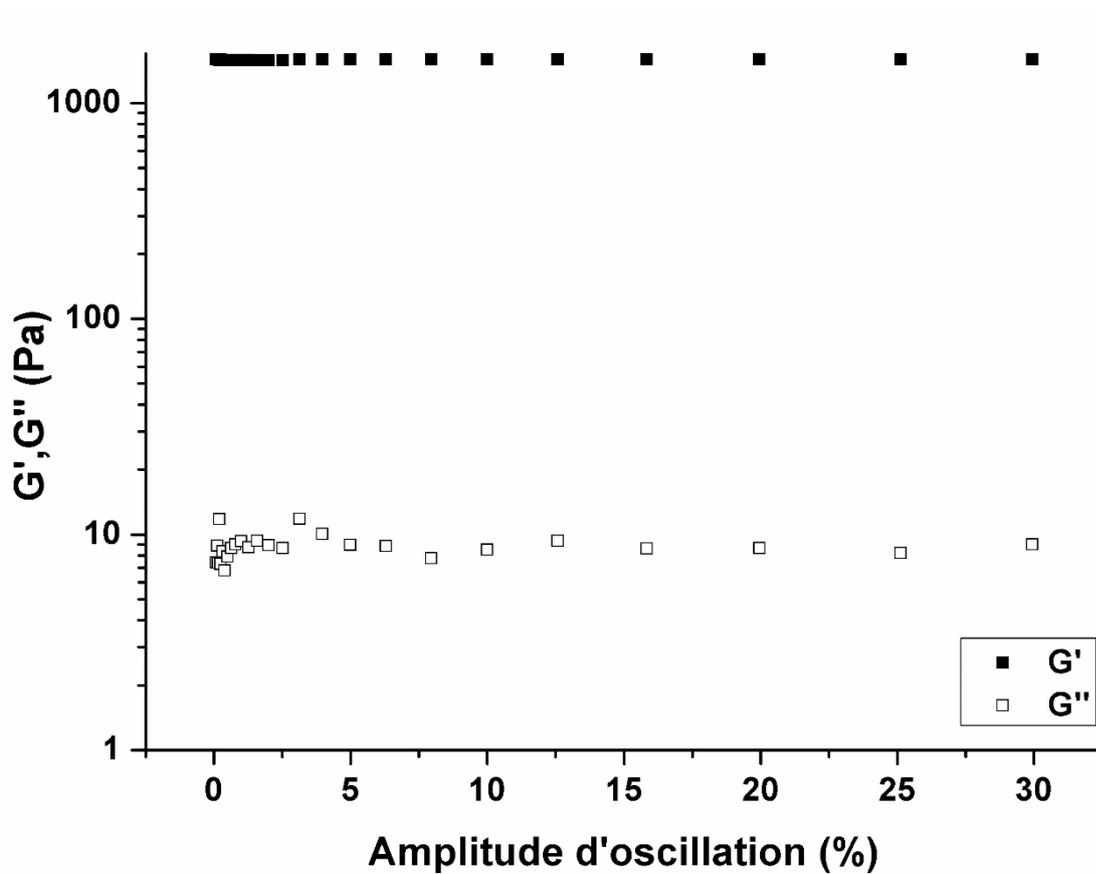
Annexe 1. Cinétique d'évolution du spectre RMN <sup>1</sup>H du PEG-Si ([PEG-Si] = 20 % m/v dans tampon Citrate/Phosphate à pH = 4,9), avec identification des massifs suivis



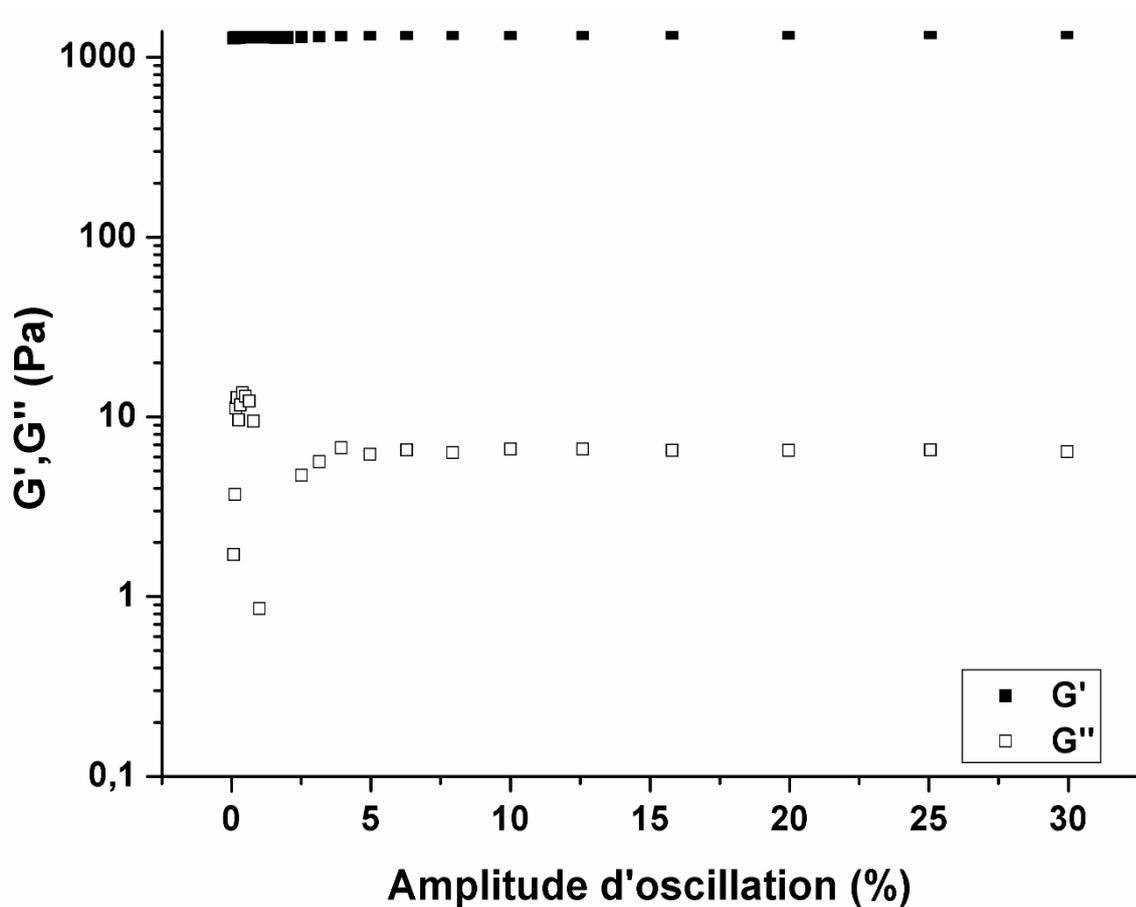
**Annexe 2. Corrélogrammes des mesures réalisées en DLS au cours du temps sur une solution de [PEG-Si] = 20 % m/v à pH = 4,9 à 25°C**



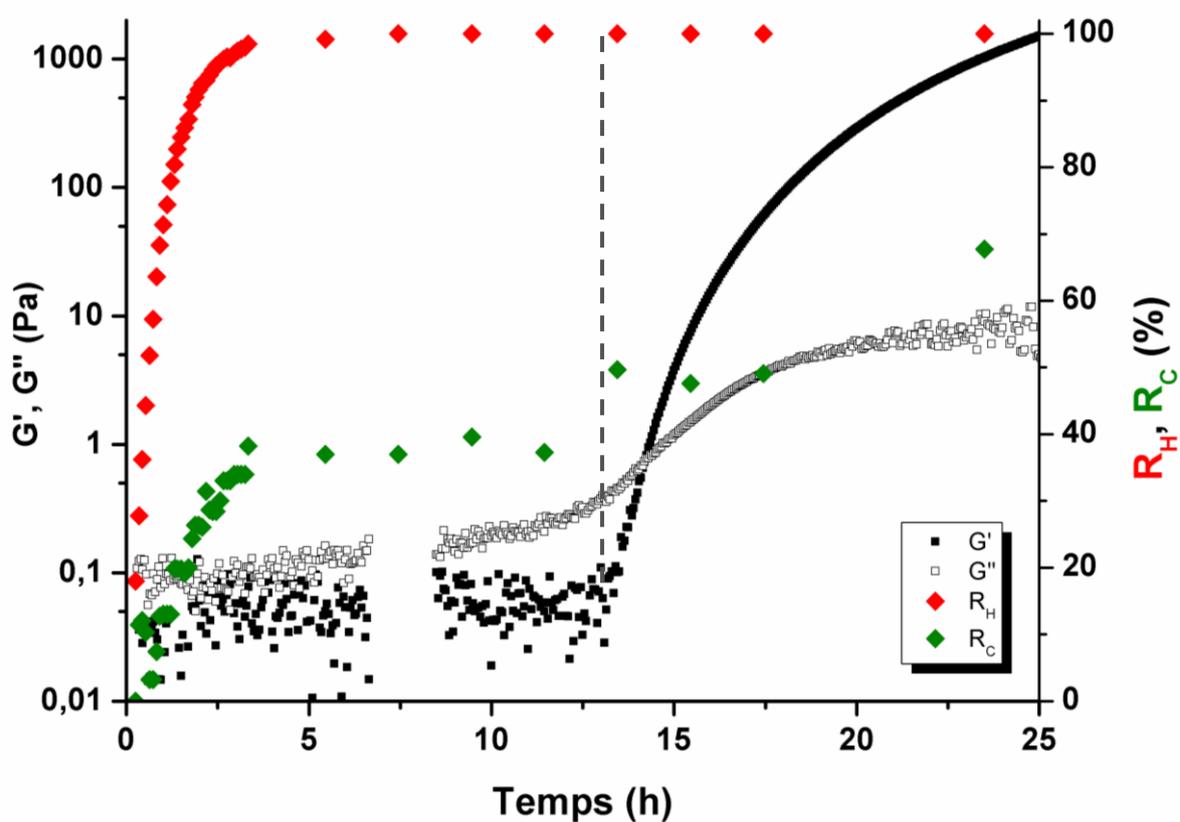
**Annexe 3. Recherche du domaine linéaire réalisée en oscillation sur un gel réticulé de [PEG-Si] = 20 % m/v à pH = 4,9 à 25°C, 27h après la mise en solution**



Annexe 4. Recherche du domaine linéaire réalisée en oscillation sur un gel réticulé de [PEG-Si] = 20 % m/v à pH = 7,5 à 25°C, ayant été neutralisée après 3h à pH = 4,9 (recherche réalisée 8h après la mise en solution)



Annexe 5. Superposition des cinétiques de réticulation obtenues en RMN  $^1\text{H}$  et en rhéologie en oscillation ([PEG-Si] = 20 % m/v dans tampon Citrate/Phosphate à pH = 4,9 à 25°C)



## Serment De Galien

---

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

## **Préparation microfluidique de microgels de poly(éthylène glycol) bis-silylé en vue de la microencapsulation de protéines thérapeutiques**

---

L'utilisation des protéines dans le traitement de nombreuses affections connaît un succès grandissant. Cependant, la fragilité de ces molécules vis-à-vis de la dégradation rend encore leur emploi difficile. Des solutions d'encapsulation et de libération prolongée doivent donc être trouvées pour permettre une utilisation massive des protéines et peptides thérapeutiques. Les microgels constituent une plateforme adaptée à l'administration de ces molécules actives. Le travail présenté avait pour objectif le développement par un procédé microfluidique de microgels de poly(éthylène glycol) bis-silylé, en vue de la microencapsulation d'une protéine modèle. Après une étude fondamentale sur les mécanismes de gélification du polymère bis-silylé, nous avons pu opérer sa réticulation en conditions douces, dans les deux heures suivant l'application d'un stimulus. Nous avons alors réalisé une émulsion eau-dans-huile par un procédé microfluidique, pour transposer ce processus de réticulation à l'échelle d'une gouttelette d'eau. Les microgels ainsi obtenus avaient une résistance mécanique importante, et une taille adaptée à un grand nombre de voies d'administration. L'incorporation de la protéine modèle au sein de ces microgels fut un succès. La libération de la protéine, bien que rapide, montre la capacité d'encapsulation de nos microgels. Ce travail ouvre donc la voie vers le développement d'une plateforme flexible d'encapsulation de protéines thérapeutiques, devant permettre l'essor de ces substances actives prometteuses.

---

Mots-clés : Administration de protéines, Microgels, Poly(éthylène glycol) silylé, Chimie sol-gel, Microfluidique, Libération prolongée

## **Preparation of bis-silylated poly(ethylene glycol) microgels in a microfluidic device in order to encapsulate therapeutic proteins**

---

The use of proteins to treat many diseases is increasing dramatically. However, these molecules are very fragile: they degrade easily, which makes them difficult to use. Solutions for proteins encapsulation and sustained release must be found to allow their massive use. Microgels represent a suitable platform to deliver these active substances. Our work aimed to develop bis-silylated poly(ethylene glycol) microgels by a microfluidic process, in order to encapsulate therapeutic proteins. After a fundamental study of the gelation mechanism of the bis silylated polymer, we could perform its cross-linking in soft conditions, in the two hours following the application of a stimulus. Then we prepared a water-in-oil emulsion in a microfluidic device, to repeat the cross-linking process on a water droplet scale. The microgels obtained had a great mechanical strength, and the suitable size to be administrated through many routes. The embedding of the model protein in the formula has been successfully performed. The protein release, while fast, showed the encapsulation capacity of the microgels. Thus, this work paves the way towards the development of a flexible encapsulation platform for therapeutic proteins, allowing the rise of these promising active ingredients.

---

Keywords: Protein delivery, Microgels, Silylated poly(ethylene glycol), Sol-gel chemistry, Microfluidics, Sustained release