



HAL
open science

Biodégradabilité de hyaluronanes hydrophobisés catalysée par la hyaluronidase : inhibition par interactions hydrophobes

Fériel Amar-Bacoup

► **To cite this version:**

Fériel Amar-Bacoup. Biodégradabilité de hyaluronanes hydrophobisés catalysée par la hyaluronidase : inhibition par interactions hydrophobes. Chimie. Université de Rouen Normandie, 2010. Français. NNT : 2010ROUES005 . tel-04254516

HAL Id: tel-04254516

<https://hal.science/tel-04254516v1>

Submitted on 25 Oct 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE

Présentée à l'Université de ROUEN
pour l'obtention du diplôme de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE ROUEN

Discipline : Chimie
Spécialité : Polymères Fonctionnels : Structure, Fonction et
Environnement

par

Feriel AMAR

Biodégradabilité de hyaluronanes hydrophobisés catalysée par la hyaluronidase Inhibition par interactions hydrophobes

Soutenue le 15 juin 2010 devant le jury composé de

M. P. MICHAUD	Professeur de l'université de Clermont-Ferrand	Rapporteur
M. J. DESBRIERES	Professeur de l'université de Pau et des pays de l'Adour	Rapporteur
M. J.P. VANNIER	Professeur de l'université de Rouen	
M. E. ABOUT-JAUDET	Maître de Conférences de l'université de Rouen	
M. D. LE CERF	Professeur de l'université de Rouen	Directeur de thèse



Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés au sein du laboratoire « Polymères, Biopolymères, Membranes », UMR 6270 du CNRS et de l'Université de Rouen.

Je remercie tout d'abord Monsieur Guy-Alain Junter, directeur du laboratoire « Polymères, Biopolymères, Surfaces » pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Monsieur Didier Le Cerf, Professeur à l'Université de Rouen, pour toutes les qualités avec lesquelles il a encadré ces travaux et le soutien qu'il m'a témoigné.

Je me sens particulièrement honorée de l'attention que Monsieur Jacques Desbrières, Professeur à l'université de Pau et des Pays de l'Adour, et Monsieur Philippe Michaux, Professeur à l'université de Clermont-Ferrand, ont bien voulu m'accorder en jugeant ce travail.

Mes remerciements vont également à Monsieur Jean-Pierre Vannier, Professeur à l'Université de Rouen, pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail en acceptant de participer à ce jury.

Je souhaiterais exprimer toute ma reconnaissance à M. Jean-Claude Vincent pour sa patience et toute l'aide qu'il m'a apportée pour les études enzymatique à M. Elie About-Jaudet pour avoir partagé avec moi son savoir en chimie organique ainsi qu'à M. Luc Picton pour ses précieux conseils en physicochimie.

Je tiens à remercier Madame Corinne Loutellier-Bourrhis, maître de conférences à l'Université de Rouen, pour son aimable collaboration lors de la réalisation des mesures de spectrométrie de masse. Je remercie aussi vivement Madame Laurence Lecamp, maître de conférences à l'Université de Rouen, pour le temps et l'aide précieuse qu'elle m'a apporté pour mes analyses RMN.

Je tiens à associer à mes remerciements tous les membres (anciens et actuels) du laboratoire, en particulier l'équipe « Systèmes Colloïdaux Complexes » pour leur gentillesse, leur aide quotidienne et leur amitié.

Enfin une liste non exhaustive des personnes à qui j'aimerais adresser toute ma reconnaissance : Zied, Mélanie, Aurélie, Stéphane, Anca, Céline, Virginie, Karine, Thomas, Charlotte, Corinne, Stéphane, Sébastien, Camille, Nicolas, Antoine, Nadjat, Gisèle, Laurent, Farah, Sabrina, Ghina, Ghania, Manuella, Renaud ...

Quelques remerciements particuliers à Nicolas Levasseur, dont les travaux de recherche m'ont accompagnés tout au long de ma thèse, à Hélène Lenormand, qui m'a tout appris quand je suis arrivée au laboratoire, à Anne-Sophie Pépin, ma super collègue de bureau pour son soutien et son incroyable bonne humeur quoi qu'il arrive.

Ces remerciements ne seraient évidemment pas complets si j'oubliai de remercier ma famille : ma mère qui m'a toujours encouragée, mes beaux parents pour leur gentillesse et leur bonne humeur et enfin mon mari, Jérémy, pour son infinie patience et pour m'avoir soutenue et surtout supportée dans les bons et les mauvais moments de ma thèse.

SOMMAIRE

<u>INTRODUCTION GENERALE</u>	12
<u>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</u>	15
I. Les glycosaminoglycanes	16
<i>I.A. Définition et origine</i>	16
<i>I.B. Structure et propriétés biologiques</i>	18
<i>I.C. Modifications chimiques des glycosaminoglycanes</i>	18
II. Le hyaluronane	20
<i>II.A. Découverte et localisation du hyaluronane</i>	20
II.A.1. Origine et biosynthèse du hyaluronane	20
II.A.2. Biodégradation du HA	22
<i>II.B. Méthodes de détermination de la masse molaire du HA</i>	24
<i>II.C. Propriétés physico-chimique du HA</i>	25
II.C.1. Principales caractéristiques physico-chimiques	25
II.C.2. Propriétés rhéologiques	25
<i>II.D. Conformation du HA</i>	25
<i>II.E. Fonctions biologiques et applications</i>	27
II.E.1. Fonctions biologiques du HA natif	27
II.E.2. Fonctions biologiques des fragments de HA	28
II.E.3. Applications du HA	28
<i>II.F. Modifications chimiques du HA</i>	30
II.F.1. Réticulation du HA	30
II.F.2. Dérivés de HA par greffage	31
II.F.3. Applications des dérivés de HA	32
II.F.4. Applications et étude réalisées sur des esters de HA	32

III. Les hyaluronidases	33
<i>III.A. Origine et localisation des hyaluronidases</i>	33
III.A.1. Classification des hyaluronidases	34
III.A.2. Les hyaluronidases eucaryotes	35
III.A.2.a. Les HAases humaines	35
III.A.2.b. Les HAases testiculaires bovines	36
III.A.2.c. La HAase de venin d'abeille	37
<i>III.B. Structure tridimensionnelle et mécanisme d'action des HAases</i>	37
<i>III.C. Fonctions biologiques et applications thérapeutiques</i>	39
<i>III.D. Mesure de son activité enzymatique</i>	40
III.D.1. Méthodes chimiques	40
III.D.2. Méthodes physico-chimiques (erreur de numérotation)	41
III.D.3. Méthodes biologiques	41
<i>III.E. Composés inhibant l'activité de la HAase</i>	42
IV. Le système enzymatique HA/HAase	43
<i>IV.A. Rappel sur la cinétique enzymatique de Michaëlis Menten</i>	43
IV.A.1. Principe de la réaction enzymatique	43
IV.A.2. Méthodes de linéarisation	45
<i>IV.B. Inhibition et évolution des paramètres de Michaëlis et Menten</i>	48
IV.B.1. Inhibition compétitive	48
IV.B.2. Inhibition incompétitive	49
IV.B.3. Inhibition non compétitive	50
IV.B.4. Inhibition mixte	51
<i>IV.C. Comportement atypique du système HA/HAase</i>	53
IV.C.1. Premières études enzymatiques du système HA/HAase	53
IV.C.2. Complexation non-spécifique HA-HAase	54

IV.D. Etude enzymatique sur des HA modifiés	56
V. Les polymères associatifs.....	57
V.A. Associations hydrophobes	58
V.B. Paramètres influençant l'établissement d'associations hydrophobes...58	
V.B.1. La concentration en polymère	59
V.B.2. La force ionique	60
V.B.3. Etude viscosimétrique	61
V.B.3.a. Rappel théorique	61
V.B.3.b. Détermination de la viscosité intrinsèque	61
V.B.4. La température	63
V.B.5. La répartition des groupes hydrophobes.....	63
V.C. Comportement en solution de HA hydrophobisés	64
<u>MATERIELS ET METHODES</u>.....	67
I. Produits utilisés et préparation des solutions	68
I.A. Solutions mères de HA	68
I.B. Solutions mères de Haase	68
I.C. Solutions mères de chlorure de sodium.....	69
II. Protocole d'estérification des fragments de HA.....	69
III. Caractérisation chimique et physico-chimique du HA et de ses esters	70
III.A. Spectroscopie infrarouge (IR).....	70
III. A. 1. Principe	70
III. A. 2. Protocole.....	71

<i>III.B. Résonance Magnétique Nucléaire du proton (RMN)</i>	72
III.B.1. Principe	72
III.B.2. Protocole.....	72
 <i>III.C. Dosage conductimétrique</i>	72
 <i>III.D. Analyse par couplage SEC ou AF4/MALLS</i>	74
III.D.1. Chromatographie d'exclusion stérique (SEC)	74
III.D.1.a. Principe	74
III.D.1.b. Appareillage	74
III.D.2. Fractionnement par flux force flux croisé (AF4)	74
III.D.2.a. Principe	74
III.D.2.b. Appareillage	75
III.D.3. Diffusion statique de la lumière	76
III.D.4. Couplage SEC ou AF4/MALLS	80
III.D.5. Préparation des solutions	80
 <i>III.E. Analyse par spectrométrie de masse</i>	81
III.E.1. Electrospray.....	81
III.E.1.a. Principe	81
III.E.1.b. Protocole	82
III.E.2. MALDI-TOF.....	82
III.E.2.a. Principe	82
III.E.2.b. Protocole	83
 <i>III.F. Analyse viscosimétrique</i>	84
III.F.1. Principe du viscosimètre de type couette	84
III.F.2. Protocole	85
 <i>III.G. Analyse par spectrophotométrie de fluorescence</i>	85
III.G.1. Principe	85
III.G.2. Protocole.....	86

IV. Méthode d'étude de l'hydrolyse enzymatique	87
<i>IV.A. Dosage des extrémités réductrices N-acétylglucosamine</i>	87
IV.A.1. Préparation du milieu réactionnel	87
IV.A.2. Protocole	87
IV.A.3. Analyse du signal	90
IV.A.4. Etalonnage de la méthode	92
IV.A.5. Exploitation des données cinétiques : lissage des cinétiques d'hydrolyse enzymatiques	94
<i>IV.B. Suivi cinétique par couplage SEC/DRI</i>	97
IV.B.1. Principe	97
IV.B.2. Appareillage	97
IV.B.3. Préparation des solutions	98
IV.B.4. Etalonnage du dispositif	99
<u>PARTIE RESULTATS</u>	101
I. Production de fragments de hyaluronane par voie enzymatique	102
<i>I.A. Paramètres influençant la réaction enzymatique</i>	102
I.A.1. Choix de l'enzyme	102
I.A.2. Influence de la concentration en HA et en Haase	104
I.A.3. Influence de la force ionique	105
I.A.4. Influence du pH	106
<i>I.B. Procédé d'arrêt de la réaction enzymatique</i>	107
<i>I.C. Récupération des fragments de HA par précipitation alcoolique</i>	108
<i>I.D. Production de fragments de faible masse molaire (20 000 g.mol⁻¹ <Mn< 50 000 g.mol⁻¹)</i>	109
I.D.1. Conditions enzymatiques choisies	109
I.D.2. Analyse des fragments de HA obtenus	112
<i>I.E. Production de fragments de Mn forte > 300 000 g.mol⁻¹</i>	113
I.E.1. Conditions enzymatiques choisies	113
I.E.2. Analyse des fragments de HA obtenus	115

II. Synthèse et caractérisation chimique des esters de hyaluronane	116
<i>II.A. Conditions de synthèse des esters de hyaluronane</i>	116
<i>II.B. Détermination du taux d'estérification des fragments de HA</i>	118
III. Caractérisation physico-chimique des esters de HA	122
<i>III.A. Analyse par couplage SEC/MALLS</i>	122
III.A.1. Esters obtenus à partir de HA 23 et HA 28	122
III.A.1.a. Influence du taux d'estérification (chaîne éthyle).....	122
III.A.1.b. Influence du taux d'estérification (chaîne octyle).....	125
III.A.1.c. Influence de la longueur de la chaîne alkyle	127
III.A.1.d. Bilan	129
III.A.2. Esters obtenus à partir de HA 500	129
III.A.2.a. Influence du taux d'estérification (chaîne octyle).....	129
III.A.2.b. Influence de la chaîne alkyle ajoutée.....	132
III.A.2.c. Bilan.....	133
<i>III.B. Analyse par couplage AF4/MALLS</i>	134
<i>III.C. Caractéristiques viscosimétriques des esters de HA</i>	136
III.C.1. Analyses effectuées à 25°C	136
III.C.1.a. Etude du régime des différents esters de HA en solution dans l'eau pure	136
III.C.1.b. Détermination de la viscosité intrinsèque dans l'eau pure	138
III.C.1.c. Etude du régime des esters de HA dans NaCl 0,15 mol.L ⁻¹	141
III.C.1.d. Détermination de la viscosité intrinsèque dans NaCl 0,15 mol.L ⁻¹	142
III.C.2. Analyses effectuées à 37°C	143
III.C.2.a. Etude du régime des esters de HA dans l'eau pure	143
III.C.2.b. Détermination de la viscosité intrinsèque dans l'eau pure	144
III.C.2.c. Etude du régime des esters de HA dans NaCl 0,15 mol.L ⁻¹	147
III.C.2.d. Détermination de la viscosité intrinsèque dans NaCl 0,15 mol.L ⁻¹	148
III.C.3. Bilan des analyses viscosimétriques.....	148
<i>III.D. Inclusion d'une sonde hydrophobe dans les solutions d'esters de HA</i>	149
III.D.1. Esters obtenus à partir de HA 23 et 28	149
III.D.1.a. Influence du taux d'estérification.....	149
III.D.1.b. Influence de la longueur de la chaîne alkyle.....	150

III.D.2. Esters obtenus à partir de HA 500	151
III.D.2.a. Influence du taux d'estérification.....	151
III.D.2.b. Influence de la longueur de la chaîne alkyle.....	152

IV. Influence de l'estérification du HA sur son hydrolyse

enzymatique.....154

IV.A. <i>Comportement de la méthode de Reissig vis-à-vis des esters de HA</i>	154
---	-----

IV.B. <i>Influence de l'estérification sur l'hydrolyse enzymatique à concentration en HA fixe</i>	158
---	-----

IV.B.1. Influence de la longueur de la chaîne alkyle	158
IV.B.2. Influence du taux d'estérification (chaînes éthyle et octyle).....	162
IV.B.3. Bilan.....	167

IV.C. <i>Influence de la concentration en HA sur la cinétique de l'hydrolyse enzymatique de HA estérifiés</i>	167
---	-----

IV.C.1. Substrat-dépendance des fragments de HA précurseurs.....	168
IV.C.2. Substrat-dépendance des fragments de HA octylés préparés à partir de HA 28	173
IV.C.2.a. Détermination des paramètres de Michaëlis	173
IV.C.2.b. Evolution de la Mn de fin d'analyse cinétique	179
IV.C.3. Substrat-dépendance des HA octylés préparés à partir de HA 500.....	180
IV.C.3.a. Détermination des paramètres de Michaëlis	180
IV.C.3.b. Evolution de la Mn de fin d'analyse cinétique	184
IV.C.4. Mécanisme mis en jeu dans l'inhibition de l'activité enzymatique	185

IV.D. <i>Etude du produit obtenu en fin d'hydrolyse enzymatique</i>	188
---	-----

IV.D.1. Analyses par SEC/RI et par spectrométrie de masse	190
IV.D.1.a. Conditions enzymatiques	190
IV.D.1.b. Analyse du précurseur HA 28.....	190
IV.D.1.c Analyse des fragments de HA 23 et 28 estérifiés à taux d'estérification fixé à 40%	193
IV.D.1.d. Saponification des fins de réaction des esters de HA 23 et 28.....	195
IV.D.1.e. Analyse des fragments de HA 23 et 28 estérifiés à taux d'estérification variable.....	196
IV.D.1.f. Analyse des fragments de HA 500 estérifiés	200

IV.D.2. Hypothèses sur la répartition des chaînes alkyle sur les fragments de HA.....	201
--	-----

<u>CONCLUSION GENERALE</u>	206
---	-----

<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	212
---	-----

INTRODUCTION GENERALE

Ce travail s'est effectué au laboratoire Polymères, Biopolymères, Surfaces UMR 6270 de l'université de Rouen au sein de l'équipe Systèmes Colloïdaux Complexes sous la responsabilité du Professeur Didier Le Cerf.

Le hyaluronane (HA), polysaccharide naturel de la famille des glycosaminoglycanes (GAG), est présent dans la matrice extracellulaire (MEC) de nombreux organismes vivants. Bien que considéré pendant longtemps comme simple élément inerte remplit l'espace en raison de sa capacité à retenir de grandes quantités d'eau, de nombreuses études ont peu à peu mis en évidence l'intervention du HA dans de nombreux processus biologiques fondamentaux. Il est également apparu que ses propriétés physicochimiques ainsi que ses fonctions biologiques dépendent fortement de la longueur de sa chaîne, les chaînes courtes ou longues pouvant avoir des effets antagonistes. HA est aussi le substrat d'enzymes désignées hyaluronidases (HAase). L'activité de la HAase joue très probablement un rôle important dans les fonctions du HA en contrôlant l'équilibre entre le HA de grande taille et les oligosaccharides. Outre les fonctions du HA et de la HAase dans les conditions normales, les teneurs anormalement élevées de ces espèces dans certaines pathologies telles que le cancer, rendent l'étude de l'hydrolyse du HA catalysée par la HAase fondamentale. Au cours de ces dernières années, une importante étude de la cinétique d'hydrolyse du HA catalysée par la HAase a été menée au laboratoire concernant le caractère atypique du comportement enzymatique du couple HA/HAase (Astériou, 2002), l'hydrolyse enzymatique du HA de différentes masses molaires (Tranchepain, 2004), les interactions HA-protéine de nature électrostatique (Lenormand, 2007) et les premières modifications chimiques du HA (Levasseur, 2006).

De par son origine naturelle, son ensemble unique de propriétés biophysicochimiques et son absence d'immunogénicité, le HA est une macromolécule très attractive sur le plan médical. Ce type d'application peut nécessiter que le HA soit chimiquement modifié pour lui apporter des propriétés supplémentaires. Ainsi des biomatériaux à base de HA ont commencé à être développés, en particulier, pour la réparation tissulaire et la libération contrôlée de principes actifs. Pendant de nombreuses années, notre équipe a acquis de l'expérience dans le domaine de la

modification chimique de polysaccharides comme le pullulane, le dextrane ou encore la cellulose ainsi que l'étude physicochimique de leurs nouvelles propriétés.

Pour la plupart des biomatériaux à base de HA, la biocompatibilité est avérée. Cependant, la biodégradabilité via l'action de la hyaluronidase (HAase), enzyme qui catalyse l'hydrolyse du HA, n'a été que peu étudiée.

Sur la base des connaissances déjà acquises par notre équipe et d'autres équipes à travers le monde, le but de ce travail de thèse est d'étudier de manière approfondie la biodégradabilité catalysée par la HAase de HA hydrophobisés par greffage de chaînes alkyle. L'influence de la longueur de la chaîne alkyle ainsi que celle du taux d'estérification sera étudiée sur le comportement des polysaccharides obtenus, sur la cinétique de l'hydrolyse et sur les produits de l'hydrolyse.

Ce manuscrit propose dans une première partie, sous forme d'une synthèse bibliographique, un aperçu des connaissances actuelles concernant les principales caractéristiques du hyaluronane, des différentes hyaluronidases, le système enzymatique hyaluronane/hyaluronidase et les propriétés des polymères associatifs.

Une seconde partie présente les matériels et les méthodes d'études utilisées pendant ce travail en détaillant précisément les modes opératoires.

La troisième partie expose l'ensemble des résultats obtenus décomposé de la façon suivante : la production de HA de masse molaire contrôlée, la modification chimique, l'analyse structurale des HA obtenus et leur comportement en solution diluée, l'hydrolyse enzymatique des différents échantillons de HA en s'attardant notamment sur la cinétique et la structure des produits de l'hydrolyse. Enfin, les conclusions de ce travail sont regroupées dans une dernière partie, où sont également proposées les perspectives envisageables de ces recherches.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

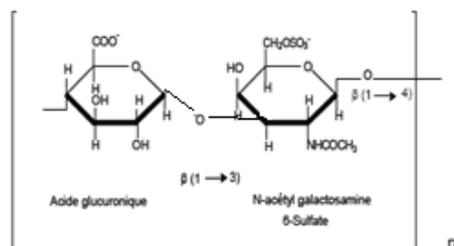
Les travaux présentés dans ce manuscrit ont consisté en l'étude de l'hydrolyse enzymatique catalysée par la hyaluronidase (HAase) de hyaluronane (HA) chimiquement modifié. Une synthèse bibliographique présente tout d'abord brièvement la famille de polysaccharides présente dans le corps humain à laquelle appartient le hyaluronane : les glycosaminoglycanes. Il s'ensuit une description détaillée des caractéristiques et des propriétés du hyaluronane et de l'enzyme qui catalyse son hydrolyse la hyaluronidase. Le comportement enzymatique atypique du couple HA/HAase ainsi que quelques rappels sur la cinétique enzymatique de Michaëlis-Menten sont présentés par la suite. Une dernière partie résumant les propriétés des polymères associatifs ainsi que les principaux facteurs influençant la formation des associations hydrophobes permettra de discuter des nouvelles propriétés du HA apportées par la modification chimique choisie.

I. Les glycosaminoglycanes

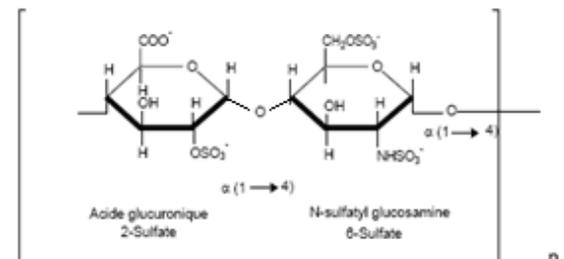
I.A. Définition et origine

Les glycosaminoglycanes (GAG) sont des hétéropolysaccharides situés principalement dans la peau, le cartilage, les os, la cornée et sont constitués de chaînes de polymères linéaires. La plupart sont synthétisés dans l'appareil de Golgi des cellules. Ces chaînes sont composées de la répétition de disaccharides contenant toujours une hexosamine (Ponedel'kina *et al.*, 2007).

Chondroïtine 6-sulfate



Héparane Sulfate



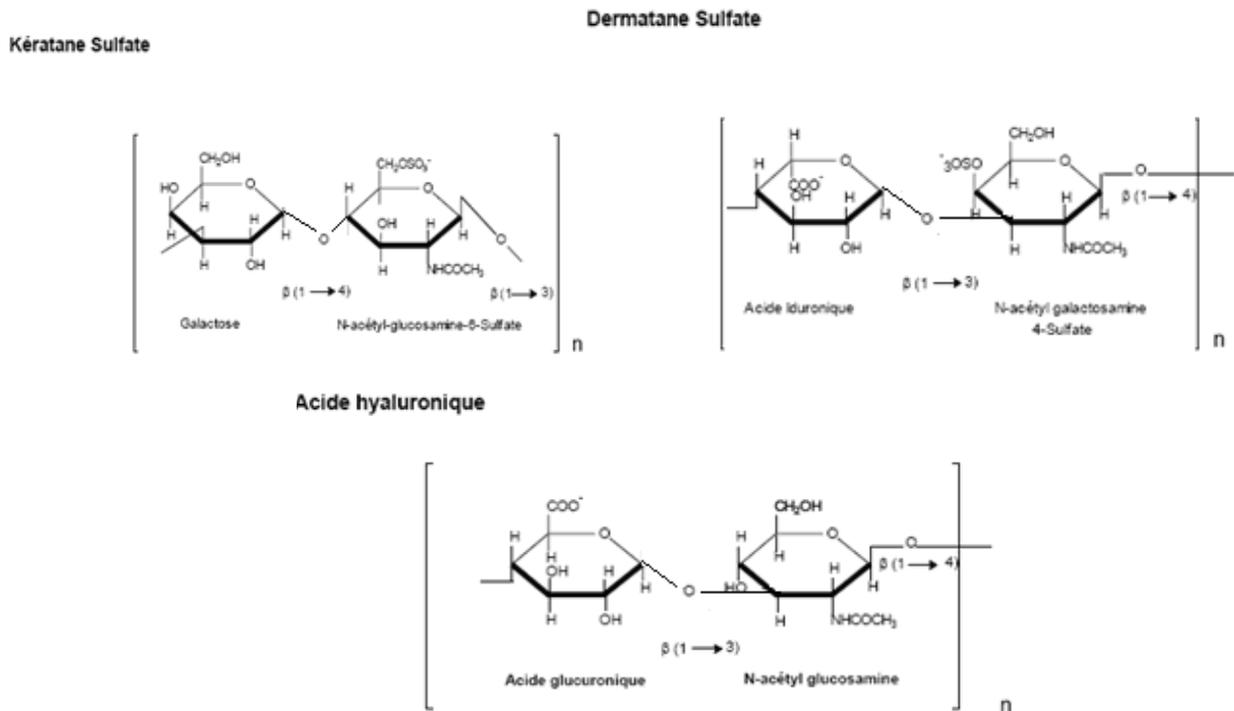


Figure 1 : Formules chimiques des différents glycosaminoglycanes

Comme présentée par la figure 1, la famille des GAG comprend les GAG de structure tels que le kéراتane sulfate, le dermatane sulfate, l'héparane sulfate, les chondroïtines sulfates 4 et 6 le HA et le GAG de sécrétion tel que l'héparane. Les chondroïtines sulfates, le kéراتane sulfate et le hyaluronane ont des structures très similaires. Les cellules de plusieurs organes synthétisent certains types de GAG. Les chondroïtines sulfates sont produites par des fibroblastes et ont été isolées pour la première fois à partir de cornée bovine par Davidson et Meyer (1954). Elles sont largement distribuées dans les tissus et les fluides des animaux. Le dermatane est métabolisé à partir de chondroïtine sulfate par épimérisation qui convertit l'acide D-glucuronique en acide L-iduronique. Le dermatane sulfate est donc une forme dérivée de la chondroïtine sulfate et les deux types de séquences disaccharidiques répétitives peuvent se rencontrer sous forme de segments alternés sur la même chaîne de glycosaminoglycane. Il a été isolé pour la première fois par Meyer et Chaffee (1941) à partir de peau de cochon. Les kéراتanes-sulfates sont des polysaccharides composés de D-galactose et de N-acétyl-D-glucosamine (figure 1) dont la masse molaire varie de 4.10^3 à $19.10^3 \text{ g.mol}^{-1}$. On le trouve en grande quantité dans la cornée et les disques

intervertébraux. L'héparane est un GAG hautement sulfaté, biosynthétisé par les mastocytes, qui est notamment présent dans le foie, les reins, le sang, les muscles et la peau. Le HA, seul GAG non sulfaté est très présent dans la peau, l'humeur vitrée de l'œil et le liquide synovial. Il sera présenté de manière plus développée par la suite.

1.B. Structure et propriétés biologiques

Des études structurales ont été réalisées sur les GAG et montrent qu'ils prennent des conformations hélicoïdales avec deux à huit disaccharides par pas d'hélice selon les conditions expérimentales telles que le pH ou la force ionique (Scott et Tigwell, 1978 ; Atkins *et al.*, 1980).

Les GAG ont de nombreuses propriétés mécaniques et biologiques notamment lorsqu'ils se lient de façon covalente aux protéines pour former des protéoglycanes. Ces protéoglycanes participent à l'organisation et à l'orientation des fibrilles collagéniques (Scott *et al.*, 1995). Les fibrilles de collagène ainsi que les protéoglycanes sont les constituants principaux de la matrice extracellulaire (MEC). Ils forment un réseau au sein de la MEC (Scott *et al.*, 1975 ; 1992). L'héparane est également bien connue pour son activité anticoagulante. La glucosamine N-sulfatée de l'héparine sert de site pour une liaison spécifique avec l'antithrombine III, une protéine du sang (Lindahl *et al.*, 1994).

Il existe des enzymes capables de dégrader les GAG. Selon leur mode de réaction, ces enzymes sont des polysaccharides lyases ou polysaccharides hydrolases. Ce groupe d'enzymes inclut les héparines lyases I, II et III, les chondroïtines sulfates lyases ABC, AC et B et les hyaluronidases (Yamagata *et al.*, 1968). Ces enzymes catalysent la rupture des liaisons glycosidiques des GAG (Linhardt *et al.*, 1992).

1.C. Modifications chimiques des glycosaminoglycanes

Des modifications chimiques possibles sont nombreuses et peuvent apporter de nouvelles propriétés physico-chimiques et biologiques et augmenter ainsi le nombre d'applications notamment dans le domaine médical.

Afin d'obtenir des propriétés proches de celles de l'héparine, le groupement N-acétyl des chondroïtines sulfates et du dermatane sulfate peut être remplacé par un

groupement N-sulfate. La désacétylation est tout d'abord effectué via l'action d'une hydrazine à 105°C. La réaction est suivie d'une sulfatation en utilisant un complexe de triéthyl amine sulfatée en milieu alcalin (Nadkarni *et al.*, 1996). Des études montrent que les chondroïtines sulfates et les dermatanes N-désacétylés peuvent se lier avec la L-sélectine ce qui leur confère une activité anti-VIH et peuvent prévenir une migration anormale des leucocytes dans les tissus (Hara *et al.*, 2003). Augmenter le degré de sulfatation de l'héparane en la faisant interagir sous forme de sel d'ammonium quaternaire avec un excès de pyridine sulfatée influence ses propriétés anticoagulantes (Toida *et al.*, 1999). En revanche, la désulfatation de l'héparane active le facteur de croissance des fibroblastes ainsi que le phénomène de prolifération cellulaire (Hara *et al.*, 2003).

Des estérifications ont été réalisées sur les fonctions carboxyl et hydroxyl des glycosaminoglycanes. Des biomatériaux, utilisés dans le domaine médical, sont préparés à partir d'esters de chondroïtine sulfate et d'héparane. Les esters sont préparés par réaction avec l'acide cinnamique à l'aide d'irradiation UV (Takehisa *et al.*, 1998). Lorsque les fonctions hydroxyl sont acétylées, l'héparane est utilisé dans le domaine cosmétique (Petitou *et al.*, 1990). Des études montrent (Barzu *et al.*, 1993) que l'héparane et le dermatane sulfate sous forme d'esters de butyrate et de caproate ont une activité anti VIH.

Des modifications des groupements N-sulfate en groupements amide sont réalisées tout d'abord par réaction de N-désulfatation suivi par une acylation avec un chlorure d'acide gras tel que l'acide oléique ou palmitique. Les dérivés d'héparines lipophiliques ont la capacité d'inhiber certaines enzymes (Moczar *et al.*, 1991). Une des méthodes la plus fréquemment employée pour l'obtention des dérivés amides de GAG est leur mise en contact avec une amine primaire en présence de carbodiimide agissant comme activateur de la réaction (Nakajima *et al.*, 1995).

II. Le hyaluronane

II.A. Découverte et localisation du hyaluronane

II.A.1. Origine et biosynthèse du hyaluronane

Comme expliqué précédemment, le HA fait partie de la famille des glycosaminoglycanes. Meyer et Palmer purifient, pour la première fois en 1934, le hyaluronane à partir de l'humeur vitrée d'œil bovin (Meyer et Palmer, 1934) la structure chimique exacte est déterminée en 1954 (Weissman et Meyer, 1954 ; Jeanloz et Flowers., 1962).

Le HA est un des constituants majeurs de la MEC des tissus de mammifères. Le processus de biosynthèse du HA est effectué au niveau de la membrane plasmique par un groupe de protéines transmembranaires appelées les hyaluronane synthases (HAS). Trois hyaluronane synthases HAS1, HAS2, HAS3 sont identifiées et diffèrent par leur fonction catalytique et par la masse molaire des chaînes de HA obtenues. La masse molaire de HA synthétisé par HAS1 et HAS2 est importante, d'environ 4.10^6 g.mol⁻¹ alors que HAS3 produit du HA d'environ 300 000 g.mol⁻¹ (Girish *et al.*, 2007). Ces protéines synthétisent le HA à partir de deux substrats : UDP acide glucuronique (UDP-GlcA) et UDP N-acétyl glucosamine (UDP-GlcNAc) selon la réaction suivante :



Le schéma de la biosynthèse du HA est résumé sur la figure 2.

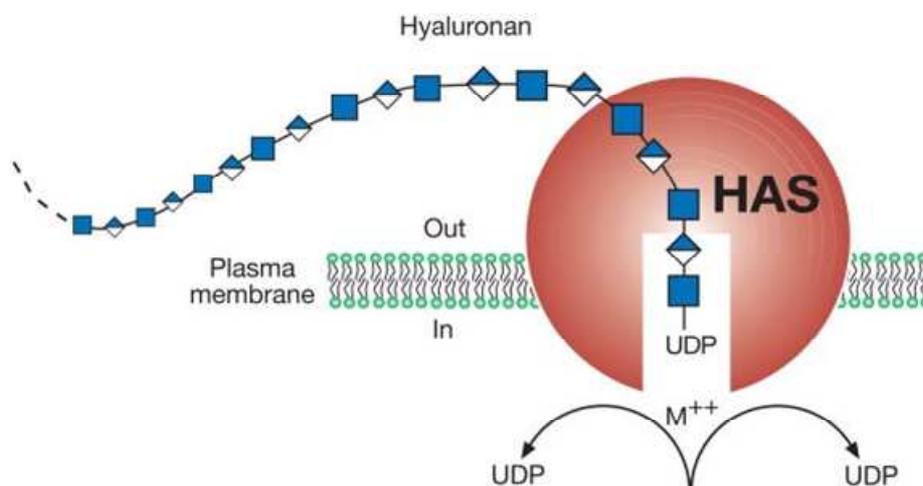


Figure 2 : Schéma de la biosynthèse de hyaluronane

acide glucuronique : ▽ n-acétylglucosamine : ■

Le HA est donc formé par la répétition d'un motif disaccharide de base constitué d'un acide D-glucuronique (GlcUA) lié en $\beta(1-3)$ à une N-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc). Ces motifs sont liés entre eux par des liaisons $\beta(1-4)$ (figure 3). Une fois la synthèse de la chaîne de HA effectuée, elle est extrudée à l'extérieur de la cellule dans la MEC.

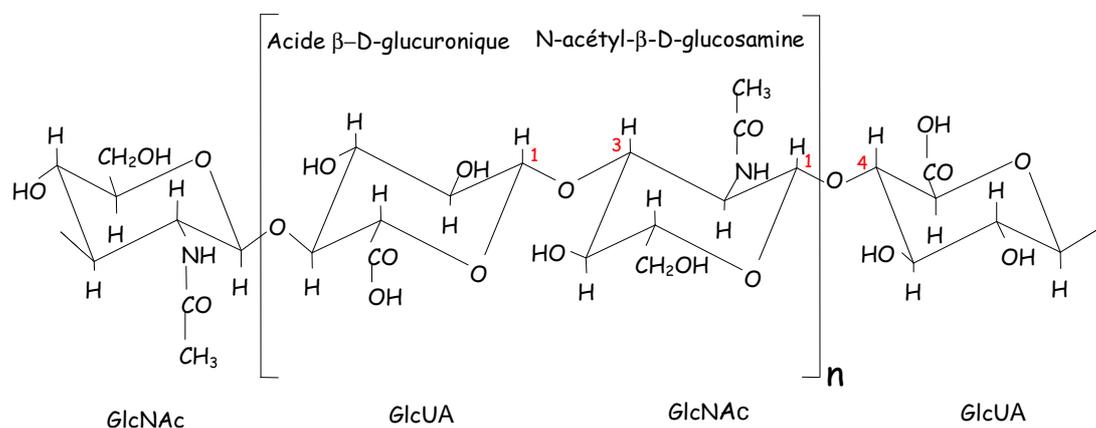


Figure 3 : Motif disaccharidique de répétition du HA (GlcNAc : N-acétyl-D-glucosamine ; GlcUA : acide D-glucuronique)

Certains chercheurs émettent l'hypothèse que la production de HA serait apparue assez tard dans l'évolution (Lee et Spicer, 2000). Aucun gène codant pour une protéine de HAS n'a été identifié chez les drosophiles (Adams *et al.*, 2000). Cependant la production de HA est également détectée chez certaines bactéries telles que les streptocoques ou certains virus. Les gènes codant pour les HAS pourraient avoir été transmis horizontalement des pathologies vers les hôtes infectés (Yamada et Kawasaki, 2005).

Le HA fût tout d'abord extrait de crête de coq ou de cordon ombilical mais les quantités étaient faibles et la séparation du HA et des protéines étaient très coûteuses. Une avancée significative a été réalisée en produisant le HA par fermentation bactérienne (Yamada *et al.*, 2005). Cependant, la production de HA par fermentation bactérienne engendre la formation d'exotoxines et d'hémolysines rendant la purification difficile et coûteuse. Une étude montre que l'algue *Chlorella* est capable après infection par le virus PBCV-1 (souche Pbi et NC64A) de produire dans un temps limité du HA (Graves *et al.*, 1999). Des chercheurs utilisent ce principe pour intégrer de façon stable dans le génome de plantes vertes un acide nucléique codant pour HAS et ainsi permettre la production de HA (Frohberg et Koch, 2006).

II.A.2. Biodégradation du HA

Chez les mammifères, le HA est principalement biodégradé par voie enzymatique. Les enzymes participant à la biodégradation du HA sont les hyaluronidases, la β -glucuronidase et la β -N-acétyl-glucosaminidase. Ces enzymes sont complémentaires puisque les HAases dégradent le HA de forte masse molaire et les deux autres enzymes dégradent le HA dans le lysosome en enlevant le sucre réducteur terminal. La dégradation finale produit les sucres N-acétyl-glucosamine et l'acide D-glucuronique (figure 4).

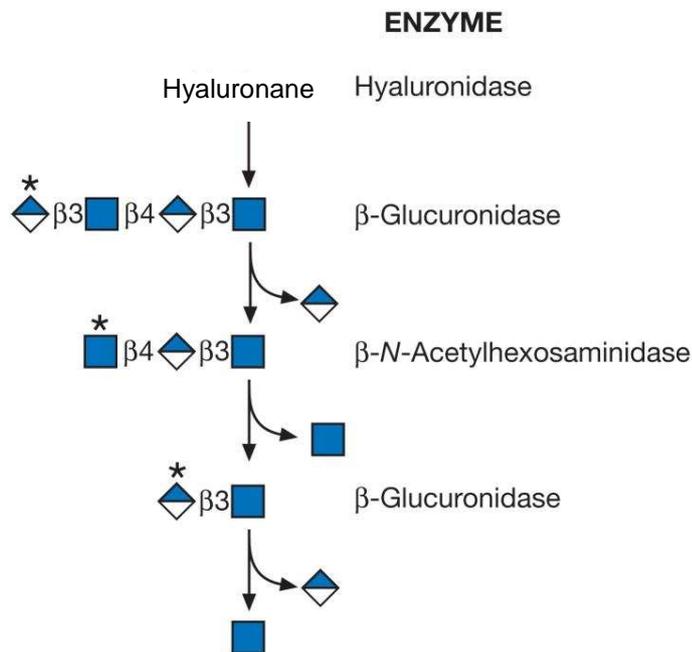


Figure 4 : Schéma de la biodégradation par voie enzymatique du hyaluronane

II.A.3. Dégradation du HA par voies chimique et thermique

Une dégradation est également possible par des molécules oxydantes réactives. Ce mécanisme de dégradation est notamment impliqué dans les processus inflammatoires (Noble, 2002) (figure 5). Cette dégradation produit des radicaux libres en attaquant les fonctions hydroxyl. Soltes *et al.* (Soltes *et al.*, 2007) étudient ce phénomène de dégradation en utilisant le peroxyde d'hydrogène ainsi qu'un métal de transition qui catalyse la réaction.

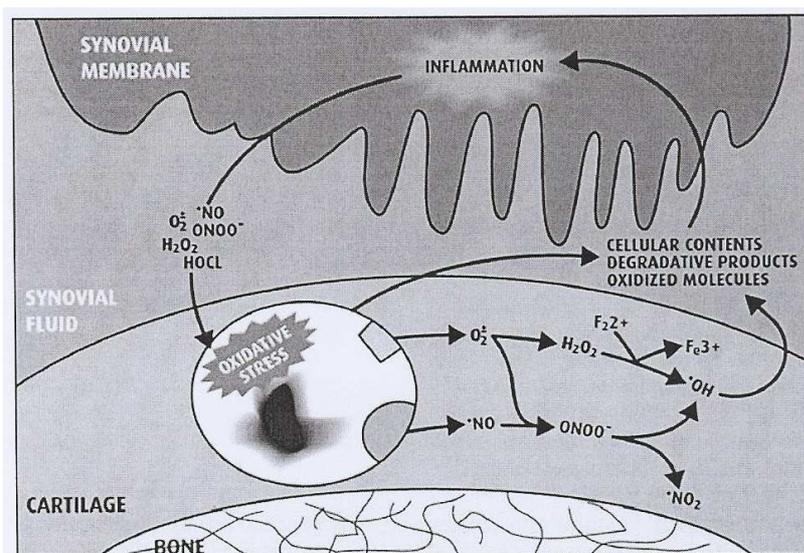


Figure 5 : Implication de la dégradation par des molécules oxydantes dans le phénomène d'inflammation

In vitro, en faisant varier des paramètres externes tels que la température et le pH, il est également possible de dégrader le HA. Tokita et Okamoto (1995) (Stern *et al.*, 2007) ont étudié l'hydrolyse acide et basique du HA et en ont déduit par analyse RMN ^{13}C les mécanismes. Tout d'abord, une dégradation hydrolytique se produit de manière aléatoire le long de la chaîne de HA et obéit à une loi cinétique du premier ordre. L'hydrolyse acide effectuée à pH proche de 2 concerne le sucre acide D-glucuronique qui a une nature nucléophile alors que la dégradation basique effectuée à pH proche de 13 concerne sur le sucre N-acétyl-glucosamine qui a une nature électrophile. La coupure des liaisons glycosidiques se fait en une étape pour l'hydrolyse acide alors que sous conditions alcalines les coupures de liaisons se font en deux étapes. Rehakova *et al.* (Rehakova *et al.*, 1994) étudient le traitement de différents échantillons de HA dans une gamme de température allant de 60 à 90°C et montrent une dégradation modérée du HA ainsi qu'une augmentation de la polymolécularité.

II.B. Méthodes de détermination de la masse molaire du HA

Pour caractériser les produits issus de la biodégradation, plusieurs techniques existent et permettent de déterminer les masses molaires du HA, la masse molaire moyenne en nombre (\overline{Mn}), la masse molaire moyenne en masse (\overline{Mw}), la masse molaire viscosimétrique (\overline{Mv}).

Une des méthodes les plus couramment employées pour déterminer les \overline{Mn} et \overline{Mw} de polymères neutres ou de polyélectrolytes est la chromatographie d'exclusion stérique (SEC), permettant une séparation de l'échantillon selon son volume hydrodynamique, couplée à un détecteur réfractométrique (RI) ainsi qu'un détecteur de diffusion de lumière multi angles (MALLS) pour éviter un étalonnage préalable du système (Adam et Gosh, 2001). Cette méthode permet de déterminer la distribution de taille de HA synthétisé par les HAS (Kumari *et al.*, 2006). Tranchepain *et al.* (2006) combinent le couplage SEC/MALLS avec la spectrométrie de masse pour déterminer la masse molaire d'une large gamme de fragments de HA allant de 800 à 300 000 g.mol⁻¹. La spectrométrie de masse peut donc s'appliquer à la détermination de masse molaire de fragments courts de polysaccharides et à l'évaluation de leur pureté. Pour cela, deux techniques peuvent être utilisées : ESI-MS (ElectroSpray Ionization-Mass Spectrometry) (Price *et al.*, 1997) et MALDI-TOF-MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight-Mass Spectrometry) (Shiller *et al.*, 1999). Les études précédentes menées au laboratoire montrent qu'il est possible de déterminer la \overline{Mn} du HA en combinant également la SEC avec une méthode colorimétrique. La méthode colorimétrique, méthode simple à utiliser, est basée sur le calcul du rapport de la concentration massique en HA sur la concentration molaire d'extrémités réductrices.

Lorsque la viscosité en solution du HA est élevée et très différente de celle du solvant, il est possible de déterminer la \overline{Mv} par une méthode viscosimétrique (Anadere *et al.*, 1979).

L'électrophorèse capillaire, méthode fréquemment employée pour l'analyse des GAGs comme la chondroïtine sulfate et le dermatane sulfate, présente des applications en terme de détermination de masse molaire mais également en terme de

détermination de concentration de HA dans des préparations pharmaceutiques (Jackson, 1990).

II.C. Propriétés physico-chimiques du HA

II.C.1. Principales caractéristiques physico-chimiques

La présence d'un acide uronique dans l'unité de répétition du HA lui confère des propriétés de polyélectrolyte et le rend parfaitement soluble en milieu aqueux neutre. Le pKa des acides glucuroniques est de l'ordre de 2,9 (Berriaud *et al.*, 1998). Les charges portées par le HA conduisent à des interactions à courte et longue distance pouvant être écrantées par la présence d'électrolytes. Le HA est donc très sensible à la présence de sel en solution et au pH.

Rinaudo *et al.* (Rinaudo *et al.*, 1993) ont évalué par couplage SEC/MALLS, la longueur de persistance du HA, en l'absence de répulsions électrostatiques, à environ 7 nm. Cette valeur traduit un caractère semi-rigide de la chaîne macromoléculaire et correspond aux valeurs prédites par modélisation moléculaire (Haxaire *et al.*, 2000).

II.C.2. Propriétés rhéologiques

Le succès récent du HA tient à ses propriétés viscoélastiques. Depuis plus de 30 ans, de nombreux travaux ont porté sur l'étude du comportement rhéologique du HA (Fouissac *et al.*, 1992 ; Roure *et al.*, 1996) ainsi que sur les différents paramètres tels que la concentration en polymère, la masse molaire, la température, la force ionique, la nature des contre-ions et le pH qui peuvent influencer ce comportement (Gibbs *et al.*, 1968 ; Kobayashi *et al.*, 1994).

II.D. Conformation du HA

Il apparaît que le HA présente en solution aqueuse une structure secondaire stabilisée par des liaisons hydrogène intramoléculaires. Ces liaisons hydrogène parallèles à l'axe de la chaîne impliquent les groupements hydroxyl, N-acétyl et carboxyl et lient les sucres adjacents (Scott *et al.*, 1984). Le HA adopte une configuration en hélice avec un certain degré de rigidité. En solution, aucune transition conformationnelle hélice-pelote, avec du HA d'origine bactérienne, n'a pu être

observée à ce jour. La transition conformationnelle pour des solutions de HA issu de crête de coq mise en évidence par changement du pouvoir rotatoire spécifique et par dichroïsme circulaire (Hirano et Kondo, 1973 ; Hirano et Kondo-Ikeda, 1974) peut être liée à la présence de protéines, toujours présentes dans le HA d'origine animale. L'analyse de cette structure secondaire a mis en évidence que l'hélice formée par le HA fait apparaître des « patch hydrophobes » (Scott, 1997). Cette structure pourrait être la base d'une conformation tertiaire en solution. Les différences de taille de chaînes vont induire des différences de structure. Le HA de masses molaires élevées reste cependant une molécule très hydrophile et peut être considérée comme une pelote hautement hydratée. L'eau retenue au sein de la macromolécule procure au HA un important volume hydrodynamique. Lorsque les chaînes de HA sont courtes (en dessous de 10 000 g.mol⁻¹), elles se comportent comme des segments rigides (Stern *et al.*, 2006).

La RMN ¹H et ¹³C a été utilisée pour tenter de définir la conformation du HA en solution aqueuse. L'utilisation de l'eau comme solvant ne permet pas d'observer facilement les groupes NH et OH directement impliqués dans des liaisons hydrogène. De ce fait, de nombreuses études ont été réalisées dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) deutérié. Les travaux de Cowman *et al.* (1984) ont suggéré que dans une solution de HA l'addition d'eau dans le DMSO modifie les liaisons hydrogène. La liaison hydrogène qui lie directement les groupes NH et COOH serait remplacée par une molécule d'eau créant un pont entre le NH et le COO⁻ (figure 6b) (Heatley et Scott, 1988). En 1984, Scott *et al.* (1984) ont dénombré quatre liaisons hydrogène par unité tétrasaccharidique

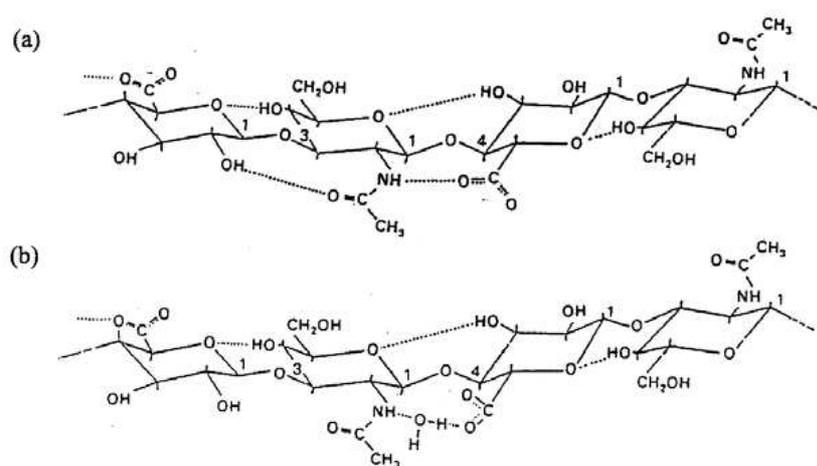


Figure 6 : Structure secondaire du HA dans (a) du DMSO et (b) du DMSO contenant de l'eau (Heatley et Scott, 1988)

Les travaux de Scott *et al.* (1984) ont été corroborés par des analyses de spectroscopie infrarouge qui ont permis de localiser les ponts hydrogène intra et interchaînes ainsi que l'insertion des molécules d'eau (Haxaire, 2000 ; Haxaire *et al.*, 2003 ; Marechal *et al.*, 2003). La spectrométrie infrarouge a mis également en évidence le mécanisme d'hydratation et les changements conformationnels induits au sein de la chaîne par l'hydratation.

Almond *et al.* (1997 ; 1998 ; 2000 ; 2006) ont étudié la conformation d'oligosaccharides en solution par simulation de dynamique moléculaire ainsi que par analyses RMN. Ils observent que les liaisons hydrogène intramoléculaires se réarrangent rapidement et s'échangent avec les molécules d'eau. Le modèle le plus répandu du HA en solution est celui d'une hélice gauche stabilisée par un réseau de liaisons hydrogène intramoléculaires dynamiques entre résidus adjacents : cette structure, lui conférant le caractère semi-rigide, est présente dans les simulations de dynamique moléculaire de Almond *et al.*

II.E. Fonctions biologiques et applications

II.E.1. Fonctions biologiques du HA natif

Sous sa forme native, c'est-à-dire ayant une masse molaire de plusieurs millions de grammes par mole, le HA est présent en concentration élevée dans les tissus conjonctifs mous tels que la peau, le cordon ombilical, le liquide synovial et l'humeur vitrée de l'œil. Des quantités importantes sont également observées dans les poumons, les reins les tissus des muscles.

Grâce à sa structure, le HA contribue tout d'abord à l'hydratation de la MEC. Il assure un rôle organisationnel au sein de la MEC en se liant de façon spécifique ou non à des cellules ou à d'autres composés. Il module par exemple l'organisation de fibrines, de fibronectines et du réseau de collagène en interagissant spécifiquement avec plusieurs protéoglycane comme l'aggrecane et le versicane (Nehls et Hayen, 2000). Le HA est également impliqué dans des phénomènes biologiques plus complexes comme la migration et la prolifération cellulaire (Chajara *et al.*, 2003). Le HA intervient dans ces processus par l'intermédiaire d'un groupe de protéines appelées les hyaladhérines (Delpech *et al.*, 1993). Bien qu'actuellement le rôle exact du HA ne soit pas clairement identifié, il est connu que le HA est également impliqué dans le phénomène de cicatrisation. Chen et Abatangelo (1999) suggèrent que le HA

intervient à chaque étape de la cicatrisation. Il active la première étape d'inflammation et initie la réponse de cicatrisation. De plus, le tissu de granulation formé par la suite, est toujours très riche en HA ce qui facilite la migration et la prolifération cellulaire ainsi que l'organisation de la MEC.

Des augmentations de concentration en HA ont été corrélées au développement de certaines pathologies. Ce phénomène est étudié dans le cas, par exemple, de l'arthrite rhumatoïde et permet aussi d'évaluer le succès de transplantation de foie ou de rein (Laurent et Fraser, 1992). Il est donc possible d'utiliser le HA comme marqueur pour diagnostiquer certaines pathologies. Lokeshwar *et al.* (2000) applique ce principe et montrent que la concentration en HA est un indicateur dans le cancer de la prostate.

II.E.2. Fonctions biologiques des fragments de HA

La masse molaire du HA a son importance sur les fonctions biologiques du HA. Elle peut déclencher des fonctions antagonistes comme par exemple l'angiogénèse. Le HA de forte masse molaire inhibe la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (Deed *et al.*, 1998) alors que les fragments de 4 à 25 disaccharides vont favoriser ce phénomène (West et Fan, 2002). Le processus d'angiogénèse est détourné par les tumeurs cancéreuses pour leur permettre l'apport de nutriment et de se propager dans le corps. Elles utilisent ce processus en produisant des hyaluronidases qui catalysent la biodégradation du HA (Stern, 2008). Si le HA de forte masse molaire est garant de tissus sains, la présence de fragments de HA est un signal de dysfonctionnement.

II.E.3. Applications du HA

Dans le domaine cosmétique, le HA intervient dans la formulation de crèmes ou de gels en raison de ses propriétés hydratantes (Band, 1985). Du fait de ses propriétés viscoélastiques et de ses fonctions biologiques remarquables (interactions avec certaines protéines), le HA est principalement utilisé dans le domaine biomédical (Asari et Miyauchi, 2000).

Les recherches actuelles suggèrent de nouvelles applications dont le traitement des escarres chez l'adulte, du cancer ou du développement fœtal humain. Négativement

chargé, il attire une grande quantité de cations (surtout Na⁺) osmotiquement actifs, qui eux-mêmes attirent une grande quantité de molécules d'eau (Alberts, 2008). Le fort taux d'hydratation des gels de HA, associé à l'action positive de ce polysaccharide sur la différenciation et la prolifération cellulaire, en font des matériaux de choix pour la réparation de nombreux tissus, dont notamment la peau (King *et al.*, 1991 ; Burd *et al.*, 1991).

Grâce à sa biocompatibilité, le HA présente des qualités particulières pour la libération contrôlée de principes actifs (Yun *et al.*, 2004 ; Brown et Jones, 2005). Les propriétés du HA ont été mises à profit en ophtalmologie (Goa et Benfield, 1994). En effet, le HA est utilisé sous forme de gel, en tant qu'agent protecteur, lors d'interventions en microchirurgie de l'oeil (Lisegang, 1990). Les principales formulations de HA commercialisées pour ce type d'applications sont le Healon® (Advanced Medical Optics, Etats-Unis), l'Opegan® (Santen Pharmaceuticals, Japon) et l'OpeganHi® (Santen Pharmaceuticals, Japon).

Le HA est, de plus, utilisé dans le traitement des pathologies ostéoarticulaires. Dans ce cadre, des solutions visqueuses de HA sont utilisées pour la viscosupplémentation (Balazs et Delinger, 1993). En effet, l'arthrose résulte de la dégradation du liquide synovial et en particulier du HA qui le compose. Le liquide synovial perd alors ses propriétés rhéologiques. Chez une personne saine, celles-ci apparaissent variables selon les contraintes articulaires imposées au cours des mouvements lents et rapides. La viscosité et l'élasticité sont complémentaires : dans les mouvements lents, le liquide est plus visqueux qu'élastique et inversement dans les mouvements rapides. Le liquide synovial dégradé devient de moins en moins visqueux et perd son caractère viscoélastique. Ce liquide une fois détérioré ne joue plus son rôle de lubrifiant et d'absorbeur de chocs articulaires et entraîne ainsi une inflammation et la dégradation des différentes couches cartilagineuses. La viscosupplémentation consiste en l'injection de HA dans une articulation arthrosique afin de restaurer les fonctions lubrifiantes et protectrices en remplaçant le HA détérioré. Commercialement, on trouve l'Arthrum® (LCA, France), le Hyalgan® (Fidia pharmaceuticals, Etats-Unis), le Superartz® (Seikagaku, Japon), Ostenil® (Chemedica AG, Allemagne), Sinovial® (Genévrier, Sophia Antipolis, France) et Viscoseal® (TRB Chemedica International, Suisse).

II.F. Modifications chimiques du HA

De nombreux travaux de recherche ont été consacrés à la modification chimique du HA afin d'étendre les applications du HA dans les domaines biomédical et pharmaceutique. Le HA regroupe de nombreuses propriétés physico-chimiques et biologiques. Contrairement aux protéines qui se dénaturent facilement, le HA peut résister aux modifications chimiques sans perdre ses propriétés biologiques. Pour modifier chimiquement le HA, deux approches sont étudiées : la réticulation de HA et les dérivés de HA par greffage.

II.F.1. Réticulation du HA

Concernant la réticulation du HA, la plupart des méthodes repose sur les fonctions hydroxyl et carboxyl et selon deux schémas généraux (Leach et Schmidt, 2004). Le premier consiste à faire réagir en une seule étape le HA et le réticulant. C'est le cas des synthèses utilisant comme agent réticulant un diepoxy ou encore un divinyl sulfone. Des études plus détaillées de la chimie des diepoxy montrent qu'à faible pH, les composés diepoxy forment des liaisons ester avec la fonction carboxyl du HA alors qu'à pH élevé des liaisons éther sont formées avec les fonctions hydroxyl (Zhao *et al.*, 2002). Les hydrogels préparés à partir de réticulant divinylsulfone tels que Hylan-B (Biomatrix) peuvent avoir différentes propriétés mécaniques selon les conditions de réaction (Balazs *et al.*, 1991 ; Band, 1998). Comparé au HA natif, le gel Hylan-B se maintient plus longtemps *in vivo*. Le second schéma est en deux étapes (figure 7). Il s'agit de la synthèse d'un dérivé de HA qui est réticulé par la suite. La photoréticulation fonctionne selon ce schéma. Les dérivés méthacrylate de HA vont se réticuler à la longueur d'onde appropriée (Smeds *et al.*, 1999).

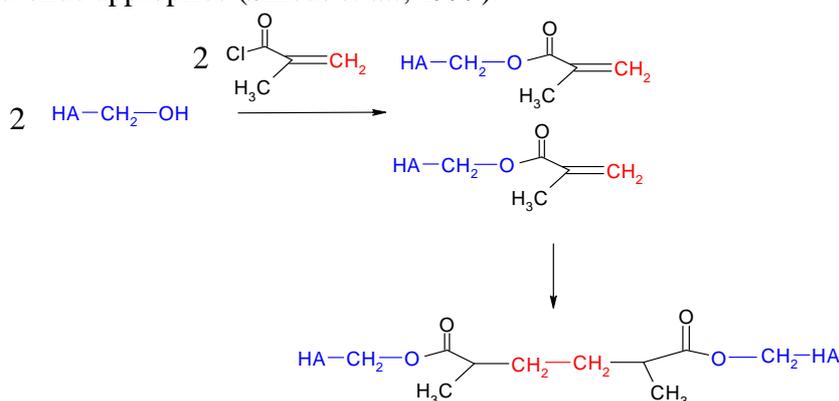


Figure 7 : Schémas réactionnels de réticulation chimique en deux étapes.

II.F.2. Dérivés de HA par greffage

Concernant le greffage, de nombreuses études ont conduit à la synthèse de trois principaux types de dérivés (figure 8). Le HA étant le seul GAG non sulfaté, des recherches ont rapidement été entreprises pour étudier les propriétés qu'apportent l'ajout de groupements sulfate (Barbucci *et al.*, 1995 ; Suzuki *et al.*, 2001). Cette modification crée des dérivés de HA structurellement proches de l'héparine.

Une activation par un carbodiimide permet de réduire des fonctions carboxyl du HA en fonction alcool primaire (Luit et Cui, 1996) ou encore d'obtenir des dérivés hydrazide (Preswitch, 2001). Ce type de réaction est très sensible au pH et peut former selon les conditions un produit intermédiaire acyluréé non réactif à partir de la fonction carboxyl ce qui diminue le rendement.

Les dérivés estérifiés sont des produits plus rigides et plus hydrophobes que le HA non modifié (Campoccia *et al.*, 1998). Cette modification est généralement effectuée via une étape d'alkylation au moyen d'halogénures d'alkyle. Les taux d'estérification de ces dérivés varient de 0 à 100%. Fidia Advanced Polymers ont créé une gamme d'esters de HA incluant des esters éthylés (figure 8) (Hyaff 7®) et benzylés (Hyaff 11®) de HA. Ces esters peuvent prendre des formes de fibres, de membranes, d'éponges ou de microsphères. Des brevets ont suivi expliquant des réactions d'estérification à partir de HA sous forme de sel d'ammonium pour le rendre plus réactif. Della Valle *et al.* (1990) préparent par cette méthode une série d'esters de HA avec des chaînes alkyle qui varient de la chaîne décyle à la chaîne dodécyle avec de faibles taux d'estérification. Zhang et James (2005) utilisent le triméthylcétyle ammonium comme groupe protecteur de la fonction carboxyl pour réaliser une réaction d'estérification entre différents chlorure d'acide et les fonctions hydroxyl du HA.

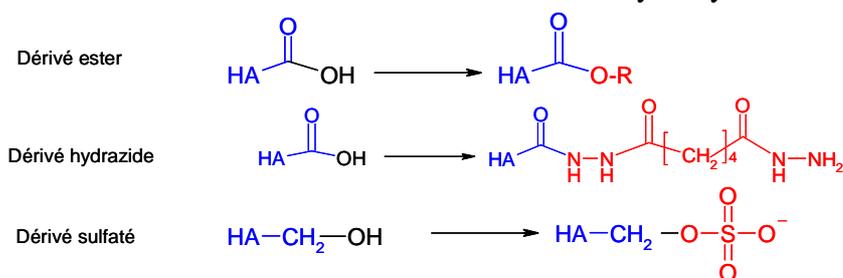


Figure 8 : Principales voies de modification chimique du HA par greffage : estérification, amidation et sulfatation

II.F.3. Applications des dérivés de HA

Une variété de biomatériaux à base de HA modifié est employé avec succès dans le domaine de la viscosupplémentation (Peyron, 1993 ; Pozo *et al.*, 1997 ; Dausse *et al.*, 2003). Les dérivés hydrazide de HA sont utilisables pour de la libération contrôlée de principes actifs (Preswitch, 2001). En sulfatant le HA pour obtenir des structures chimiquement proches de l'héparine, des chercheurs ont également obtenu les propriétés anticoagulantes de l'héparine (Suzuki *et al.*, 2001).

Des recherches ont mis en évidence que les hydrogels de HA sont d'excellents biomatériaux pour libérer des principes actifs ou des cellules pour réparer les tissus du cartilage. Des hydrogels de HA peuvent être implantés pour prévenir les risques d'adhésions postopératoires qui empêchent une cicatrisation correcte (Matsuda *et al.*, 1992). David *et al.* (2004 ; 2008) ont montré que les hydrogels de HA sont des modèles tridimensionnels adaptés pour l'étude des mécanismes d'invasion des cellules cancéreuses.

II.F.4. Applications et étude réalisées sur des esters de HA

Comparé à des biomatériaux utilisés classiquement tels que les céramiques poreuses de phosphate de calcium dans le domaine des substituts de tissus osseux, les matériaux Hyaff permettent la production de quantités plus importantes de cellules osseuses et de cartilage (Solchaga *et al.*, 1999). Lorsque des kératocytes et des fibroblastes sont cultivés *in vitro* avec des Hyaff, cela crée des biomatériaux semblables à la peau formant deux couches distinctes à l'image de l'épiderme et du derme (Brun *et al.*, 1998). Dans le paragraphe II.A.3. portant sur la dégradation du HA, nous avons noté que le HA peut être dégradé par des molécules oxydantes pendant le processus d'inflammation. Or, Mosely *et al.* (2002) utilisent les propriétés anti-oxydantes des esters de HA pour intervenir dans le phénomène d'inflammation.

Les esters de HA sont fréquemment utilisés comme bio implant postopératoires de différents domaines chirurgicaux car ils permettent d'une part d'obtenir des matériaux fibreux et d'autre part sa durée de vie *in vivo* est plus longue que celle du HA non modifié. Récemment, les esters de HA Hyaff 11 100% benzylé ont également trouvé une application lors de la microchirurgie des cordes vocales

(Finck and Lefebvre, 2005 ; Finck *et al.*, 2009). Des études ont été réalisées sur le cochon (Rousseau *et al.*, 2004) et le lapin (Thibeault *et al.*, 2004) et montrent que la quantité de HA estérifié diminue lorsque les cordes vocales sont blessées jusqu'à 15 jours après le traumatisme. L'hypothèse est qu'implanter du HA bio résorbable peut favoriser le processus de cicatrisation. La mise en place du bio implant Hyaff est présentée sur la figure 9.



Figure 9 : Fibres de HA estérifiées (Hyaff 11) dans la plaie microchirurgicale de cordes vocales (Finck, 2008)

Les Hyaff sont employés dans le domaine de la chirurgie rhinosinusale et comme pansement chirurgical et tampon nasal pour limiter les problèmes d'hémorragie (Miller *et al.*, 2003) grâce à la texture fibreuse et à la capacité absorbante de ces matériaux.

III. Les hyaluronidases

III.A. Origine et localisation des hyaluronidases

La régulation de la taille et de la concentration des chaînes de HA est principalement assurée par des enzymes : les hyaluronidases (HAases). La première activité enzymatique de la hyaluronidase a été identifiée à partir d'extrait de testicules de mammifères.

III.A.1. Classification des hyaluronidases

Cette famille regroupe des enzymes capables de catalyser la rupture des liaisons glycosidiques du HA, leur mécanisme dépendant de leur origine. La première classification a été établie par Meyer en 1971 (Meyer, 1971) et est représentée sur la figure 10.

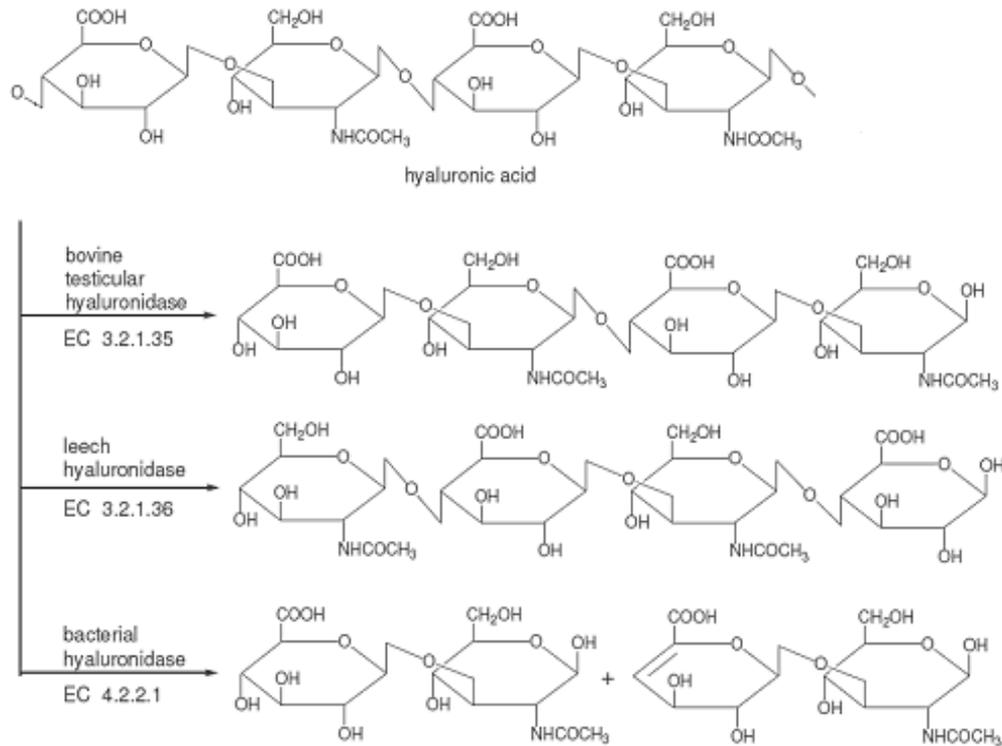


Figure 10 : Classification des HAases selon Meyer en 1971 (Botzki, 2004)

Le premier groupe correspond aux hyaluronates 4-glycanohydrolases, les hyaluronidases des mammifères (EC 3.2.1.35). Ce groupe dégrade les chaînes de HA en catalysant l'hydrolyse des liaisons glycosidiques β (1-4) donnant une extrémité réductrice N-acétyl-D-glucosamine et fournissant comme produit principal des tétrasaccharides. Ces glycosidases ont une activité à la fois hydrolase et transglycosidase. Ces enzymes dégradent non seulement le HA mais également les chondroïtines sulfates ainsi que le dermatane sulfate. Les enzymes les plus connues de ce groupe sont les HAases testiculaires, lysosomales et de venin d'abeille.

Le second groupe correspond aux hyaluronates 3-glycanohydrolases (EC 3.2.1.36) que l'on trouve dans les glandes salivaires de sangsue et d'ankylostome. Ces enzymes ont une activité hydrolytique comme le groupe précédent et catalyse l'hydrolyse des liaisons glycosidiques β (1-3) fournissant comme produit final un mélange d'hexa et de tétrasaccharides.

Le dernier groupe rassemble les hyaluronates lyases (EC 4.2.2.1). Elles catalysent la β élimination des liaisons glycosidiques β (1-4) produisant des oligosaccharides de HA ayant une insaturation sur l'acide D-glucuronique. Les hyaluronates lyases ont été isolées à partir de microorganismes tels que des souches bactériennes de *Clostridium*, *Micrococcus*, *Streptococcus* et *Streptomyces* (Suzuki, 2002).

Les HAases peuvent donc être également séparées en deux grandes familles : les HAases procaryotes et les HAases eucaryotes.

III.A.2. Les hyaluronidases eucaryotes

III.A.2.a. Les HAases humaines

Concernant le génome humain, six gènes ont été identifiés pour coder les hyaluronidases rassemblés en deux groupes. Trois gènes sont regroupés sur le chromosome 3p21.3 codant pour les HAases HYAL1, HYAL2 et HYAL3 et les trois autres gènes HYAL4, HYALP1 et PH20/SPAM1 sont regroupés sur le chromosome 7q31.3. Le gène HYALP1 ne produit apparemment aucune protéine (Csoka *et al.*, 2001).

HYAL1 est la première HAase humaine isolée à partir du plasma humain. Elle est prédominante dans le plasma et l'urine. Elle se trouve à une concentration élevée dans le foie, les reins, la rate et le cœur. Elle est localisée dans les lysosomes (Frost *et al.*, 1997). La présence de HYAL2 est également observée dans les principaux tissus. La protéine HYAL2 est une protéine membranaire liée à la membrane plasmique par une glycosylphosphatidylinositol (GPI). HYAL1 et HYAL2 sont responsables du catabolisme du HA intracellulaire et extracellulaire (Csoka *et al.*, 2001 ; Stern et Jedrzejak, 2006). L'activité enzymatique pour HYAL1 et HYAL2 est optimale pour un pH proche de 4. Cependant une faible activité est détectée pour la HYAL2 à pH

physiologique. Ces deux protéines ont un rôle complémentaire sur le catabolisme du HA. HYAL2 catalyse la rupture des liaisons glycosidiques de HA de forte masse molaire pour obtenir des fragments de HA d'environ 20 000 g.mol⁻¹ à la surface des cellules. Les fragments de HA sont par la suite internalisés et dégradés par la HYAL1 pour obtenir des tétrasaccharides (Csoka *et al.*, 2001 ; Stern, 2004).

La présence de protéine HYAL3 est détectée dans la moelle osseuse et les testicules de mammifères. Cependant aucune activité enzymatique n'a été détectée en utilisant les dosages classiques d'activité de HAase (Nagata *et al.*, 2004). La protéine HYAL4 serait une protéine membranaire présente dans les muscles et dans le placenta. Une activité chondroïtinase est détectée mais aucune activité envers le HA (Csoka *et al.*, 2001 ; Rigden *et al.*, 2004).

La protéine PH-20 peut être à la fois sous forme de protéine membranaire et sous forme de protéine soluble (Cherr *et al.*, 2001). Sous forme de protéine membranaire, elle est notamment présente à la surface des spermatozoïdes de mammifères. Des activités enzymatiques sont observées à des pH neutres comme à des pH acides. Certains auteurs suggèrent l'implication des deux domaines différents de la protéine PH-20 (Yudin *et al.*, 2001).

III.A.2.b. La HAase testiculaire bovine

L'activité de la hyaluronidase testiculaire bovine est connue depuis longtemps (Chain et Duthie, 1939) et des préparations de HAase bovine et ovine sont employées dans des applications thérapeutiques comme facteur de diffusion (Menzel et Farr, 1998). Meyer *et al.* (1997) observent des similitudes entre la HAase testiculaire bovine et la protéine humaine PH-20. La HAase testiculaire bovine est une endoglycanohyrolase (EC 3.2.1.35) et catalyse l'hydrolyse des liaisons glycosidiques $\beta(1-4)$ du HA. Elle dégrade également les chondroïtines 4- et 6-sulfates ainsi que les dermatanes sulfates. Takagaki *et al.* (1994) identifient par spectrométrie de masse le tétrasaccharide comme le plus petit produit de l'hydrolyse catalysée par la HAase testiculaire bovine.

III.A.2.c. La HAase de venin d'abeille

La HAase de venin d'abeille est un des principaux composants actifs du venin d'abeille. Elle facilite la pénétration du venin dans le corps en dégradant le HA présent dans la peau. Cette HAase est une hyaluronate 4-glycanohydrolase (EC 3.2.1.35). Elle contient 30% de similitude de séquence avec les HAases de mammifères et conserve les sites actifs (Gmachl et Kreil, 1993 ; Markovic-Housley *et al.*, 2000), ce qui laisse supposer que les HAases de mammifères agissent par un mécanisme catalytique similaire. Le profil pH de son activité enzymatique montre un maximum à 4,5 et également une activité plus faible à pH neutre (Allalouf *et al.*, 1975). Elle fût la première HAase analysée au niveau moléculaire par études cristallographiques (Markovic-Housley *et al.*, 2000). Elle contient à l'état mature 349 acides aminés dont quatre résidus cystéine, intervenant dans la formation de ponts disulfure, et quatre sites potentiels de N-glycosylation (Kemeny *et al.*, 1984).

III.B. Structure tridimensionnelle et mécanisme d'action des HAases

A partir de la structure cristalline de la HAase de venin d'abeille et de la HAase de guêpe (Skov *et al.*, 2006), il est possible d'extrapoler les informations obtenues sur les HAases de mammifères. En plus d'une homologie de séquences, des études de reconnaissance de repliements ont révélé des similitudes structurales permettant l'élaboration d'un modèle tridimensionnel (Jedrzejak et Stern, 2005).

Récemment, il s'est avéré possible d'obtenir la structure cristalline de la HYAL1 (Chao *et al.*, 2007). Cette étude apporte de nouvelles informations concernant la structure et les fonctions des HAases. La structure tridimensionnelle est représentée sur la figure 11.

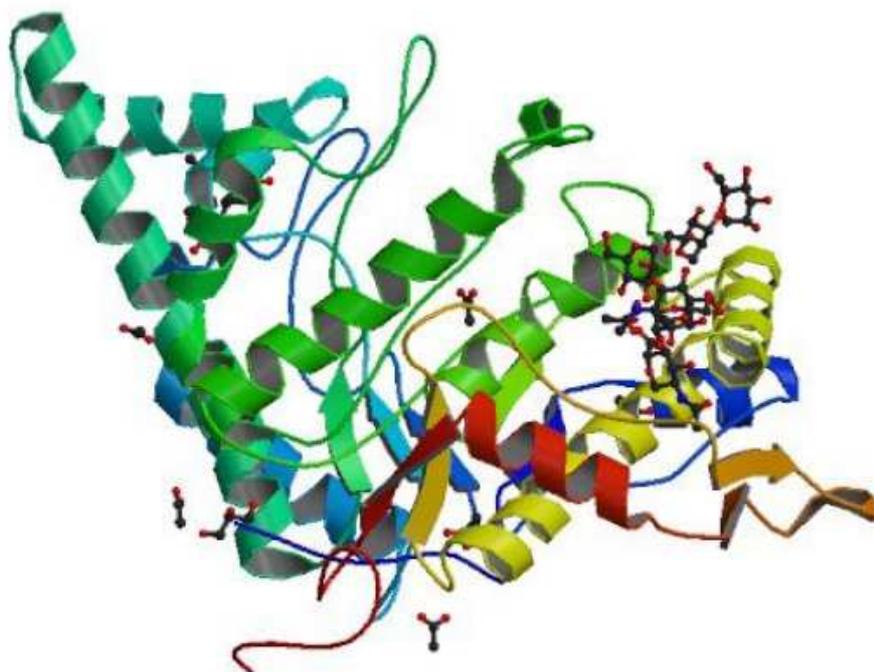


Figure 11 : Structure tridimensionnelle de la HYAL1 (Chao *et al.*, 2007)

La structure cristalline de la HYAL1 révèle qu'elle est composée d'un point de vue moléculaire de deux domaines : un domaine catalytique N-terminal et un plus petit domaine C-terminal.

Les glycosidases agissent en général via un mécanisme d'attaque nucléophile qui résulte en une rétention ou une inversion de configuration du carbone anomérique. Ce mécanisme implique un résidu glutamate comme donneur de proton et la fonction carbonyle de la N-acétyl-glucosamine du HA comme nucléophile. Le substrat participe au mécanisme de sa propre catalyse. La première étape consiste en la rupture de la liaison glycosidique $\beta(1-4)$ et au transfert d'un proton du résidu glutamate vers l'oxygène lié au carbone C4 du fragment de HA libéré. Par la suite, une molécule d'eau remplace le fragment de HA libéré. La localisation des sites actifs suggère que le glutamate et la tyrosine polarise la molécule d'eau pour une attaque nucléophile sur le C1 pour terminer l'hydrolyse (Chao *et al.*, 2007). Cependant l'activité catalytique des différentes HAases varient notamment en terme de pH et de masse molaire de HA hydrolysé. Ceci peut être expliqué par le fait que certains résidus à la périphérie des centres actifs sont différents (Jedrzejak et Stern, 2005 ; Chao *et al.*, 2007).

III.C. Fonctions biologiques et applications thérapeutiques

En catalysant l'hydrolyse du HA, la HAase permet tout d'abord d'augmenter la perméabilité au niveau des tissus, de diminuer la viscosité et d'améliorer la diffusion de fluides injectés. La HAase peut être utilisée de manière thérapeutique afin d'améliorer la diffusion et donc l'efficacité d'un anesthésiant (Menzel *et al.*, 1998).

La HAase joue un rôle très important dans la fécondation. La HAase PH-20 est exprimée sous deux formes. La première est une protéine membranaire présente à la surface de la tête acrosomale du spermatozoïde. Elle permet de traverser la matrice extracellulaire des cellules du cumulus riche en HA. La seconde forme, qui est une protéine soluble, est exprimée dans les vésicules acrosomales. Elle catalyse l'hydrolyse du HA dans la zone pellucide et permet au spermatozoïde d'accéder à la membrane de l'ovocyte (Lin *et al.*, 1994).

Lors d'une étude sur des rats, Borelli *et al.* (1986) démontrent que la HAase peut être utilisée combinée avec de l'urokinase pour diminuer l'infarctus du myocarde. La HAase est également utile dans des domaines médicaux tels que l'ophtalmologie, l'orthopédie et la chirurgie (Menzel et Farr, 1998).

Depuis plusieurs années, l'implication de la HAase dans le cancer est connue mais les différents rôles peuvent être antagonistes (Stern, 2005). Lors du cancer de la prostate, il est constaté une augmentation de la concentration en HYAL1 dans la vessie. HYAL1 est par conséquent utilisé comme marqueur de cette maladie (Posey *et al.*, 2003 ; Lokeshwar *et al.*, 2005 ; Aboughalia *et al.*, 2006). En bloquant l'expression de Hyal1, une diminution de la prolifération de cellules tumorales est observée (Lokeshwar *et al.*, 2005). Le virus JSRV (Jaagsiekte Sheep Retrovirus) favorise un cancer chez le mouton et est également pathogène chez l'homme (Wotton *et al.*, 2005). HYAL2 serait responsable du potentiel oncogène de ce rétrovirus (Rai *et al.*, 2001). Cependant de récentes études montrent que HYAL2 peut assurer la fonction de récepteur (Vigdorovich *et al.*, 2007). Le système HA/HAase est actif dans les tumeurs cancéreuses invasives de haut grade en produisant des fragments de HA angiogènes qui permettent aux tumeurs de se développer et de migrer (Stern, 2008).

La HAase peut aussi être utilisée comme suppresseur de tumeurs (Lokeshwar et Selzer, 2009). Des études montrent que son rôle de favoriser ou de réduire la croissance des tumeurs cancéreuses dépend de sa concentration dans les milieux étudiés. Shuster et al. (2002) montrent une diminution de 50% du cancer du sein en injectant de la HAase testiculaire bovine à une concentration très élevée.

III.D. Mesure de son activité enzymatique

De nombreuses méthodes de dosage de l'activité enzymatique de la HAase ont été mises au point au fil des années.

III.D.1. Méthodes chimiques

Une des méthodes de dosages la plus employée est la quantification des sucres réducteurs. L'activité de la HAase est déterminée de manière indirecte en quantifiant le nombre de sucres réducteurs issus des coupures des liaisons glycosidiques (Meyer, 1947). Les extrémités réductrices N-acétylglucosamine formées par la rupture des liaisons glycosidiques $\beta(1-4)$ peuvent être quantifiées par la méthode Morgan-Elson (1934). Il s'agit d'une méthode colorimétrique qui a été optimisée par Reissig *et al.* (Reissig *et al.*, 1955) et aussi modifiée afin d'estimer l'activité de la HAase dans le plasma humain (Gacesa *et al.*, 1981 ; Muckenschnabel *et al.*, 1998). Des modifications plus récentes de cette méthode en ont encore amélioré l'utilisation (Astériou *et al.*, 2001 ; Takahashi *et al.*, 2003).

En plus de ces méthodes plus classiques, il est possible de quantifier l'activité de la HAase par des méthodes de chromatographie liquide ou de perméation de gel (Cramer *et al.*, 1994 ; Vercruyse *et al.*, 1994), par l'électrophorèse capillaire (Pattanaargson et Roboz, 1996) ou sur gel de polyacrylamide (Ikegami-Kawai et Takahashi, 2001) ainsi que des méthodes zymographiques (Liëflander et Stegemann, 1968 ; Fiszler-Szafrz, 1984).

III.D.2. Méthodes physico-chimiques

Le HA en contact avec des protéines précipite en solution acide sous forme de caillot. Le but est d'observer la modification et la diminution du caillot lorsque ce mélange est en contact avec la HAase (Robertson *et al.*, 1940). Une unité de HAase correspond à la quantité d'enzyme nécessaire pour diminuer la masse du caillot de 0,4 mg de HA natif (Harris et Harris, 1950). Basé sur le même principe de précipitation, les mesures turbidimétriques sont ainsi possibles. Le trouble mesurable en solution diminue lorsque le HA est dépolymérisé. Le trouble disparaît lorsque la masse molaire du HA atteint 6 000 à 8 000 g.mol⁻¹ (Rapport *et al.*, 1950).

Il existe une technique de filage permettant de mesurer la longueur maximale de filament qui peut être tracté à une vitesse donnée. Ajouter de la HAase au milieu diminue la capacité du HA à former des filaments (Gunter, 1949). Chen *et al.* (2009) montrent que l'ajout de HAase dans le fluide synovial bovin détruit la capacité à former des filaments.

Des mesures viscosimétriques peuvent évaluer l'activité de la HAase. L'unité viscosimétrique de la HAase est définie comme la quantité de HAase capable de réduire de moitié la viscosité du HA (Meyer et Rapport, 1952).

III.D.3. Méthodes biologiques

La HAase est utilisée de manière thérapeutique pour permettre une meilleure diffusion et absorption de produits injectés. Une méthode a donc été développée pour évaluer la diffusion possible grâce à la HAase. Il s'agit d'injecter dans un même temps de la HAase et un colorant nécessaire pour observer l'étendu de la diffusion. Cette méthode (Jacques, 1953) apporte des résultats très proches des méthodes viscosimétriques et turbidimétriques (Humphrey et Jacques, 1953).

III.E. Composés inhibant l'activité de la HAase

Les propriétés biologiques de la HAase sont variées et lui confèrent des applications dans des phénomènes biologiques importants mais également dans certaines pathologies. Il est donc utile lors de certaines applications de la HAase d'identifier des inhibiteurs potentiels. Les inhibiteurs peuvent être développés pour avoir des applications comme contraceptifs, agents anti-microbien, anti-tumeur et anti-venin (Mio et Stern, 2002).

Un des premiers inhibiteurs a tout d'abord été identifié dans le sérum (Haas, 1946). Au cours des années suivantes, des études montrent une augmentation d'inhibiteurs dans le sérum en présence d'un cancer du foie (Snively et Glick, 1950), et de maladies dermatologiques (Grais et Glick, 1948). A partir de sérum de souris, une glycoprotéine de forte masse molaire a été finalement purifiée. Elle est capable d'inhiber la HAase testiculaire bovine et la HAase de venin d'abeille et de serpent. L'action de cette glycoprotéine dépend de la concentration en protéase ainsi qu'en magnésium et atteint un maximum d'inhibition entre pH 6 et 8 (Mio *et al.*, 2000).

Des composés inhibant l'activité catalytique de la HAase sont de différentes natures chimiques : des glycoprotéines et composés bioactifs issus de plantes (Girish et Kemparaju, 2005 ; Machiah *et al.*, 2006), des GAG et polysaccharides (Salmen *et al.*, 2005) et des composés organiques de synthèse (Khanum *et al.*, 2005). Parmi les polysaccharides et GAG, le plus connu et bien caractérisé est l'héparine qui est un GAG sulfaté et chargé négativement. En modifiant chimiquement la HAase, une étude montre que l'héparine ne se lie pas au site de la HAase mais est en interaction avec les groupements aminés à la surface de la HAase (Maksimenko *et al.*, 2001). Certains auteurs constatent que l'héparine est plus efficace sur la HAase de venin d'abeille que sur la HAase testiculaire bovine. L'héparane sulfate, le dermatane sulfate ainsi que les oligosaccharides de HA O-sulfatés peuvent également inhibé l'activité catalytique de la HAase dans le sérum humain et la HAase de venin (Girish et Kemparaju, 2005 ; Toida *et al.*, 1999).

L'acide ascorbique montre des propriétés inhibitrices envers la HAase (Botzki *et al.*, 2004). Une structure cristalline d'une HAase lyase en présence d'acide ascorbique montre qu'il se lie à la HAase au niveau du site actif mais interagit aussi avec sept autres résidus à la surface de la HAase.

Certains médicaments anti-inflammatoires tels que les salicylates, l'indométhacine et le dexamétasone peuvent exercer une activité inhibitrice envers la HAase (Moi et Stern, 2002).

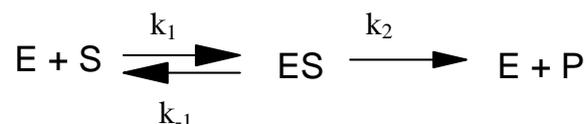
La HAase peut se trouver inactive lorsque son substrat, le HA, est soumis à des interactions de nature électrostatique. Le chitosane, homopolysaccharide de glucosamine chargé positivement peut interagir avec le HA chargé négativement et empêcher la HAase d'exercer son activité catalytique (Denuziere *et al.*, 2000). Selon les conditions enzymatiques choisies, le HA peut également être inhibiteur de sa réaction de dépolymérisation en interagissant de manière électrostatique avec des résidus de la HAase en dehors du site actif (Deschrevel *et al.*, 2008 ; Lenormand *et al.*, 2009 ; Vincent *et al.*, 2009).

IV. Le système enzymatique HA/HAase

IV.A. Rappel sur la cinétique enzymatique de Michaëlis Menten

IV.A.1. Principe de la réaction enzymatique

Considérons une réaction enzymatique au cours de laquelle une enzyme E, catalyse la conversion d'un substrat S, en un produit P. Selon le modèle décrit par Michaëlis et Menten (Michaëlis et Menten, 1913), cette réaction enzymatique s'écrit sous la forme :



où ES est le complexe catalytique enzyme-substrat et k_1 , k_{-1} et k_2 représentent les constantes de vitesse des étapes élémentaires. L'étape limitante qui contrôle l'ensemble de la réaction est souvent la deuxième étape. La mesure de la vitesse

initiale satisfait la condition d'irréversibilité et elle est définie par la mesure de v à $t = 0$. Pour une concentration d'enzyme donnée, nous calculons la vitesse initiale pour une concentration de substrat donnée en traçant la courbe $[P] = f(t)$ (figure 12)

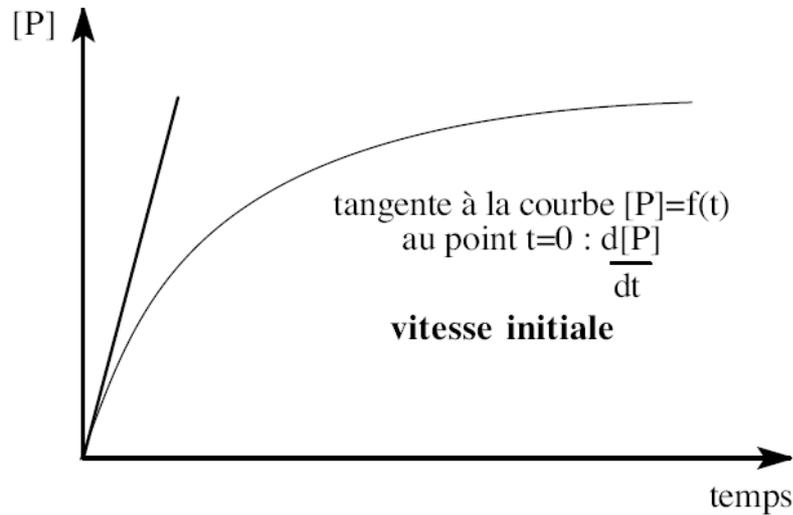


Figure 12 : Evolution de la concentration en produit de réaction en fonction du temps de réaction

La vitesse initiale de la réaction peut alors s'écrire sous la forme :

$$V_i = V_m \times \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

avec :

$$V_m = k_2 \times [E_0]$$

$$K_m = (k_{-1} + k_2) / k_1$$

où $[S]$ représente la concentration en substrat et $[E_0]$ la concentration totale en enzyme.

L'allure de la courbe donnant l'évolution de la vitesse initiale en fonction de la concentration en substrat, appelée substrat-dépendance, obtenue selon l'équation est représentée sur la figure 13.

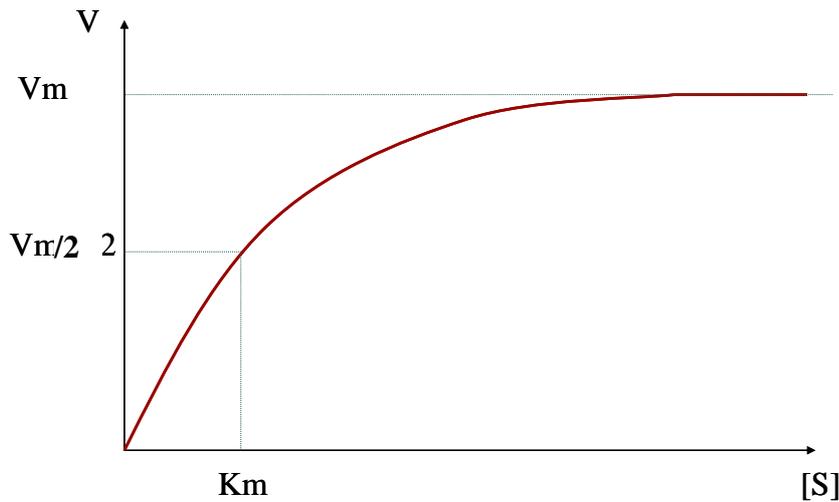


Figure 13 : Evolution de la vitesse initiale en fonction de la concentration en substrat selon le modèle de Michaëlis et Menten (1913)

La vitesse initiale augmente avec la concentration en substrat et tend vers une valeur limite notée V_m qui est la vitesse maximale. V_m est proportionnelle à la concentration en enzyme. Cette vitesse est atteinte lorsque tous les sites catalytiques sont occupés en même temps. La constante de Michaëlis, K_m , traduit la qualité des interactions enzyme-substrat et sa valeur est égale à la concentration de substrat pour laquelle la vitesse initiale est égale à $V_m/2$ (figure 13). La valeur du K_m varie avec les enzymes, la nature du substrat, l'origine de l'enzyme, le pH, la température. Une valeur de K_m élevée signifie une faible association entre l'enzyme et son substrat alors qu'un K_m faible indique une forte association.

IV.A.2. Méthodes de linéarisation

De nombreuses méthodes ont été publiées pour transformer les données de cinétique enzymatique de façon à produire une relation linéaire et faciliter ainsi l'estimation des paramètres de Michaëlis et Menten. La plus connue étant celle de Lineweaver et Burk (1935) (figure 14).

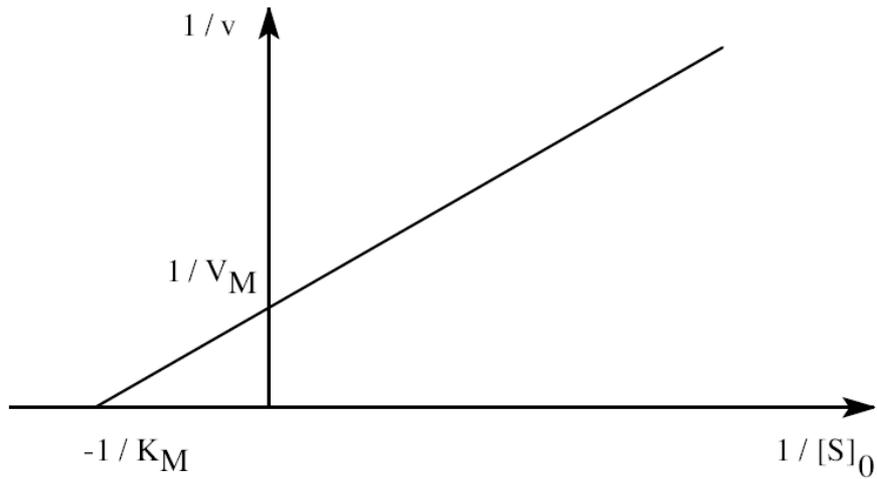


Figure 14 : Représentation de Lineweaver et Burk (1935)

Cette représentation modifie l'équation de la manière suivante :

$$V_i = V_m \times \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad \rightarrow \quad \frac{1}{V_i} = \frac{K_m + [S]_0}{V_m \times [S]_0} \quad \rightarrow \quad \frac{1}{V_i} = \frac{K_m}{V_m} \left(\frac{1}{[S]_0} \right) + \frac{1}{V_m}$$

Il s'agit d'une droite qui coupe l'axe des ordonnées au point $1/V_m$ et l'axe des abscisses au point $-1/K_m$.

Eadie (1942) et Hofstee (1959) publient respectivement la représentation suivante :

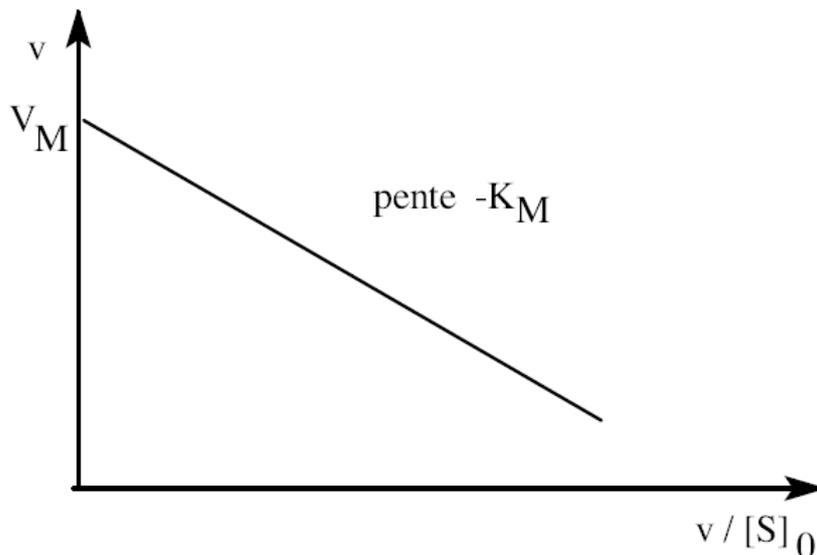


Figure 15 : Représentation de Eadie (1942) et Hofstee (1959)

Cette représentation modifie l'équation de la manière suivante :

$$V_i = V_m \times \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad \rightarrow \quad V_i(K_m + [S]_0) = V_m \times [S]_0 \quad \rightarrow \quad V_i = -K_m \left(\frac{V_i}{[S]_0} \right) + V_m$$

Il s'agit d'une droite de pente $-K_m$ qui coupe l'axe des ordonnées au point V_m .

Hanes et Woolf (1932) publient également une méthode pour linéariser les courbes de substrat-dépendances (figure 16)

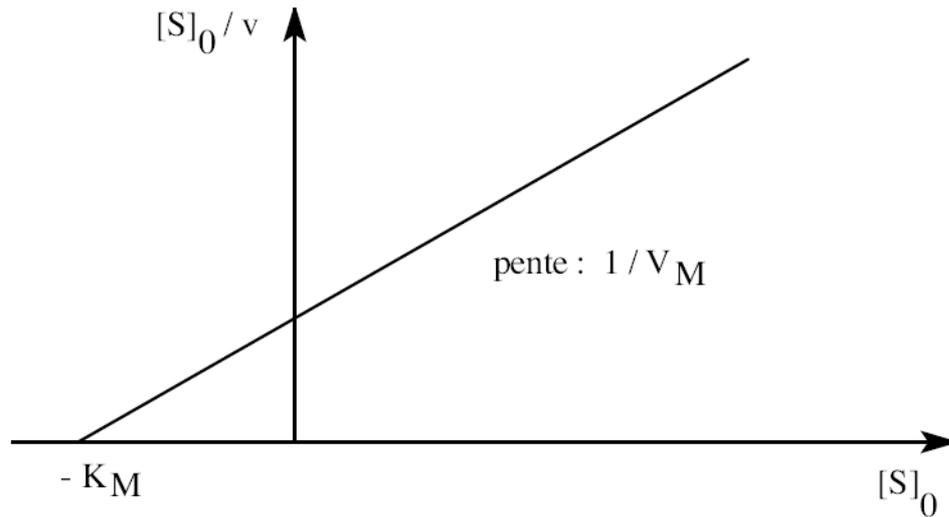


Figure 16 : Représentation de Hanes-Woolf (1932)

Cette représentation modifie l'équation de la manière suivante :

$$V_i = V_m \times \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad \rightarrow \quad V_i(K_m + [S]_0) = V_m \times [S]_0 \quad \rightarrow \quad K_m + [S]_0 = V_m \times \frac{[S]_0}{V_i}$$

$$\rightarrow \quad \frac{[S]_0}{V_i} = \frac{1}{V_m} \times ([S]_0) + \frac{K_m}{V_m}$$

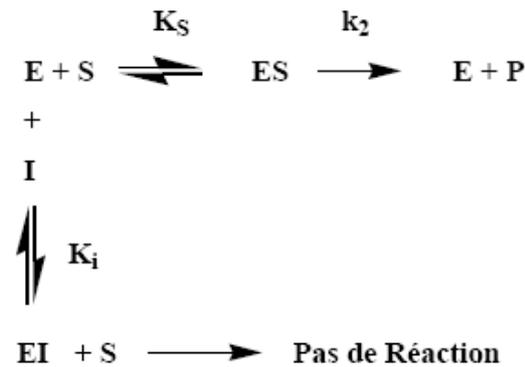
Il s'agit d'une droite de pente $1/V_m$ qui coupe l'axe des abscisses au point $-K_m$.

IV.B. Inhibition et évolution des paramètres de Michaëlis et Menten

Plusieurs substances peuvent moduler l'activité enzymatique de telle sorte qu'elles influencent la fixation du substrat au site actif ou son activité catalytique. Ces substances qui réduisent l'activité enzymatique sont appelées inhibiteurs. Il existe plusieurs mécanismes enzymatiques d'inhibition (Laidler, 1958 ; Dixon and Webb, 1979 ; Mikkelsen et Corton, 2004).

IV.B.1. Inhibition compétitive

Lorsque l'inhibition est compétitive, le substrat et l'inhibiteur sont en compétition lors de l'étape de fixation sur le site actif. L'inhibiteur compétitif a une structure semblable à celle du substrat et peut se fixer au site actif, empêchant ainsi la fixation du substrat. Cette inhibition donne le mécanisme suivant :



Concernant les paramètres de Michaëlis Menten, le V_m , activité quand toute l'enzyme est sous forme de complexe ES reste inchangé. Le K_m , en revanche est augmenté avec la force de l'inhibiteur, par un facteur $\alpha = (1 + [I]/K_i)$

$$K_{mapp} = K_m \times \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) = \alpha K_m$$

$$V_i = \frac{V_m \times [S]_0}{\alpha K_m + [S]_0}$$

L'analyse cinétique de l'inhibition compétitive dans une représentation de Lineweaver-Burk se présente de la manière suivante (figure 17) :

$$V_i = \frac{V_m}{\alpha'} \times \frac{[S]_0}{K_m/\alpha' + [S]_0}$$

L'analyse cinétique de l'inhibition incompétitive dans une représentation de Lineweaver-Burk se caractérise par des courbes d'inhibition qui ont des pentes identiques égale à K_m/V_m (figure18).

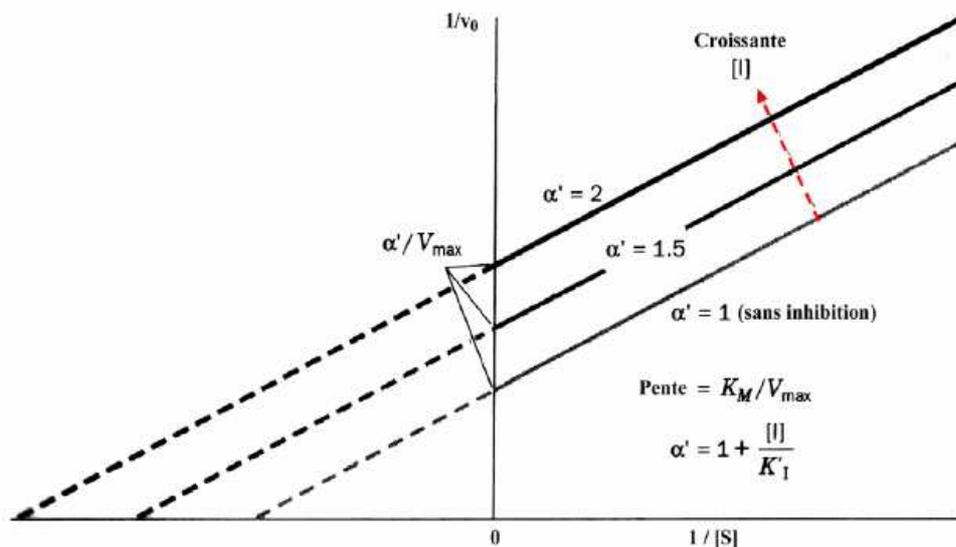
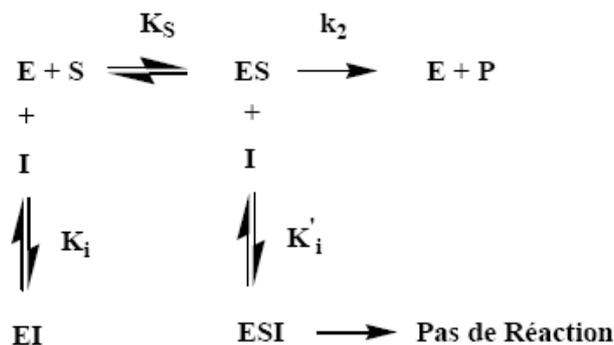


Figure 18 : Représentation de Lineweaver burk (1935) en présence d'un inhibiteur incompétitif

IV.B.3. Inhibition non compétitive

Dans le cas de l'inhibition non compétitive, l'inhibiteur peut se fixer sur l'enzyme libre et/ou sur le complexe ES. L'inhibiteur ne se lie pas sur le site catalytique mais ailleurs. Cette interaction avec l'enzyme engendre une déformation conformationnelle qui fait en sorte que, même si le substrat occupe le site catalytique, l'enzyme est beaucoup moins efficace pour catalyser la réaction. Le modèle cinétique de l'enzyme en présence de l'inhibiteur est :



Dans le cas le plus simple de ce type d'inhibition non compétitive, L'inhibiteur ne se fixe pas sur le site actif de l'enzyme donc l'interaction de l'inhibiteur avec l'enzyme ne change pas son affinité pour le substrat, donc son K_m reste inchangé. La vitesse maximale à laquelle l'enzyme peut opérer est cependant réduite.

$$V_{mapp} = \frac{V_m}{\alpha}$$

$$V_i = \frac{V_m}{\alpha} \times \frac{[S]_0}{K_m + [S]_0}$$

L'analyse cinétique de l'inhibition non compétitive dans une représentation de Lineweaver-burk est représentée sur la figure 19.

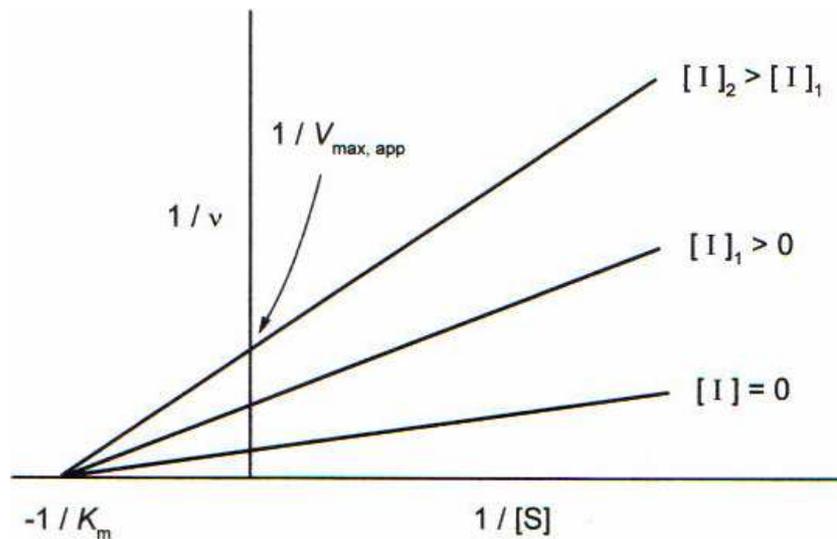


Figure 19 : Représentation de Lineweaver-Burk en présence d'un inhibiteur non compétitif

Des courbes de type Lineweaver-Burk faite à des concentrations variables en inhibiteur non compétitif donne des droites qui croisent l'axe des abscisses au même point, soit à K_m qui est indépendant de l'inhibiteur mais croisent l'axe des ordonnées à des endroits différents car la présence de l'inhibiteur réduit le V_m .

IV.B.4. Inhibition mixte

Un cas un peu plus complexe est l'inhibition mixte où un inhibiteur réduit l'affinité du substrat pour le site catalytique et réduit sa capacité de catalyser la réaction quand le substrat occupe le site actif. Le mécanisme réactionnel est le même

que dans le cas de l'inhibition non compétitive. Ce type d'inhibition modifie à la fois les paramètres K_m et V_m .

$$K_{mapp} = \frac{\alpha K_m}{\alpha'} \quad \text{et} \quad V_{mapp} = \frac{V_m}{\alpha'}$$

$$V_i = \frac{V_m}{\alpha'} \times \frac{[S]_0}{\frac{\alpha}{\alpha'} K_m + [S]_0}$$

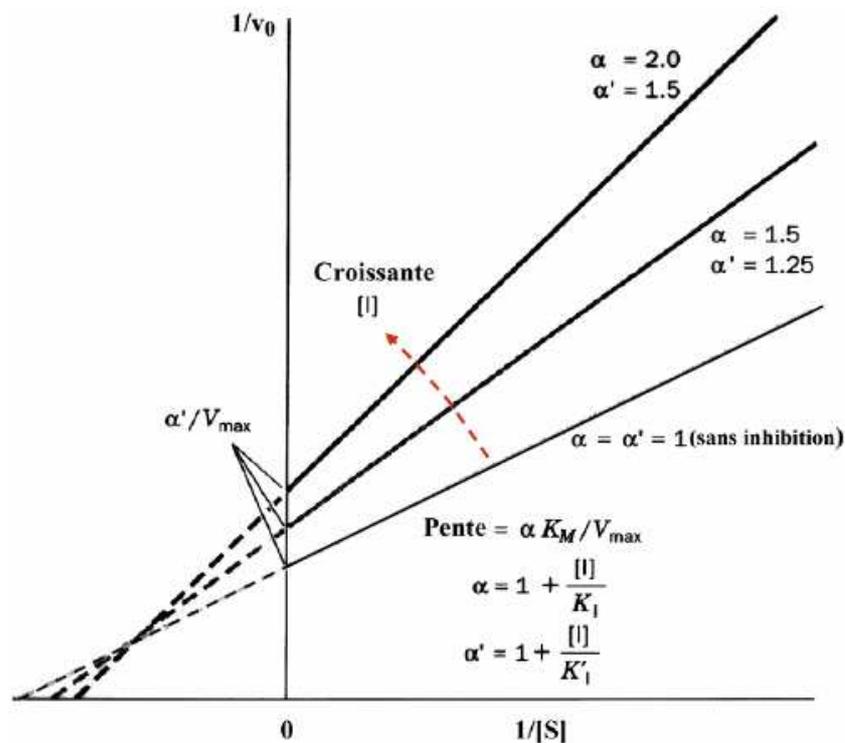


Figure 20 : Représentation de Lineweaver burk en présence d'un inhibiteur mixte

Une courbe de type Lineweaver-Burk (figure 20) tracées à différentes concentrations en inhibiteur mixte donne des droites qui se croisent entre elles entre l'abscisse ($1/S$) et l'ordonnée ($1/V$). Elles croisent cependant toutes l'abscisse et l'ordonnée à des points différents puisque, à la fois K_m et V_m , sont modifiés.

Pour identifier le type d'inhibition, nous pouvons donc comparer les paramètres K_m apparent et V_m apparent obtenus à diverses concentrations d'inhibiteurs. Si l'un ou l'autre ou les deux paramètres sont affectés, on pourra conclure s'il s'agit d'un inhibiteur compétitif, incompétitif, non compétitif ou mixte.

IV.C. Comportement atypique du système HA/HAase

IV.C.1. Premières études enzymatiques du système HA/HAase

Lors des premières études réalisées dans notre équipe sur la cinétique d'hydrolyse enzymatique du HA catalysée par la HAase testiculaire bovine, un phénomène atypique est observé lié au changement de force ionique (Astériou *et al.*, 2006).

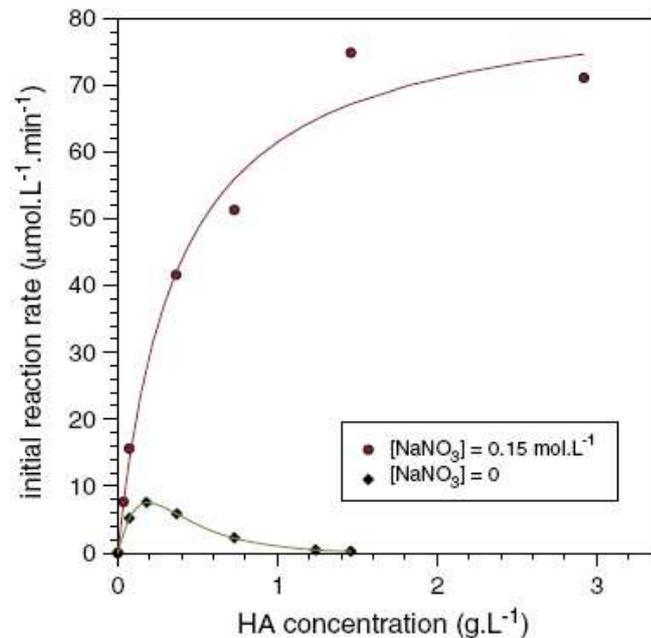


Figure 21 : Substrat-dépendance de HA catalysée par la HAase testiculaire bovine avec et sans ajout de NaNO₃.
[HAase] = 1g.L⁻¹ ; pH = 5 (Astériou *et al.*, 2006)

La figure 21 présente les évolutions de deux substrat-dépendances, l'une étant réalisée avec ajout de sel pour fixer la force ionique du milieu à 0,15 mol.L⁻¹ et l'autre sans ajout de sel afin d'avoir une force ionique la plus faible possible de l'ordre de 5 mmol.L⁻¹. Dans le premier cas (force ionique élevée), un comportement classique de type Michaelis-Menten est observé. Dans le cas d'une très faible valeur de force ionique, des vitesses initiales nettement plus faibles sont observées lorsque les deux courbes sont comparées. De plus, aux faibles concentrations de HA, la vitesse initiale augmente puis au-delà d'une certaine concentration en HA, la vitesse initiale chute et se stabilise à une valeur très proche de 0. Augmenter fortement la concentration en HA inhibe l'activité enzymatique de la HAase testiculaire bovine. Ces premières

études montrent l'importance de la concentration en HA et également en HAase pour obtenir ce phénomène d'inhibition.

Différentes hypothèses ont alors été émises pour tenter d'expliquer ce phénomène atypique observé uniquement lorsque la force ionique du milieu est très faible. Les phénomènes d'exclusion et d'inhibition par excès de substrat ne permettent pas de tenir compte des différences observées lors des changements de force ionique. Tenir compte de la viscosité de la solution importante dans le cas de HA natif, en raison de masses molaires très importantes, n'explique pas correctement l'ensemble des résultats (Astériou, 2002). Pour expliquer ce phénomène atypique, il a été nécessaire de considérer un phénomène où sont impliqués la force ionique, la concentration en HA ainsi que la concentration en HAase.

IV.C.2. Complexation non-spécifique HA-HAase

Notre équipe de recherche a alors émis l'hypothèse de la formation de complexes électrostatiques, non-spécifiques entre le HA et la HAase, complexe du type polysaccharide-protéine (Tranchepain, 2004 ; Lenormand, 2007). Le terme « non-spécifique » permet de préciser qu'il ne s'agit pas d'un complexe enzyme-substrat et que le site actif de l'enzyme n'intervient pas.

Une protéine modèle, l'albumine de sérum bovin (BSA) a été choisie pour tester la capacité de complexation du HA avec des protéines. Une fois montré que la formation de complexes est possible, de la BSA est ajouté directement au milieu réactionnel (figure 22) pour observer l'impact de cet ajout sur la réaction d'hydrolyse enzymatique catalysée par la HAase.

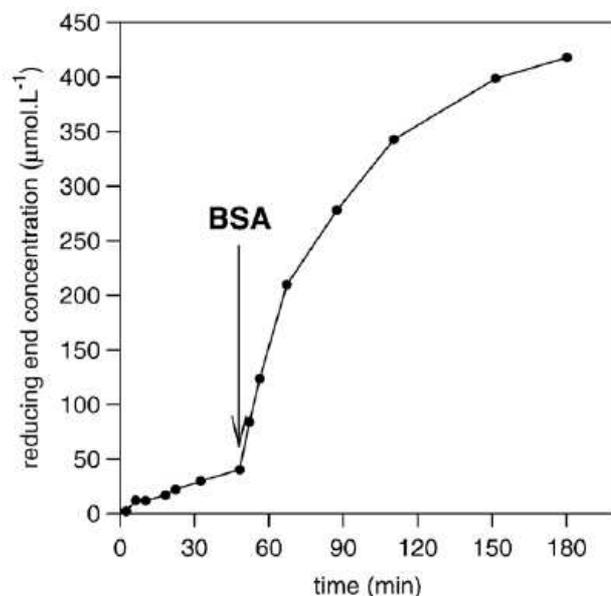


Figure 22 : Evolution de la concentration en extrémités réductrices N-acétyl-glucosamine en fonction du temps de réaction. Ajout à 50 min de BSA à 2g.L⁻¹.
 [HA] = 0,73g.L⁻¹ ; [HAase] = 0,5g.L⁻¹ ; pH = 4,85 (Deschrevel *et al.*,2008)

L'effet de l'ajout de cette protéine est immédiat et permet une augmentation de la vitesse initiale de la réaction. Lorsque le HA se complexe à la BSA, l'enzyme devient libre dans le milieu réactionnel et peut à nouveau exercer son activité catalytique (Deschrevel *et al.*, 2008). Des études plus détaillées du système HA-BSA-HAase montrent l'importance du rapport de concentration de HA et de BSA sur l'hydrolyse enzymatique (Lenormand *et al.*, 2009).

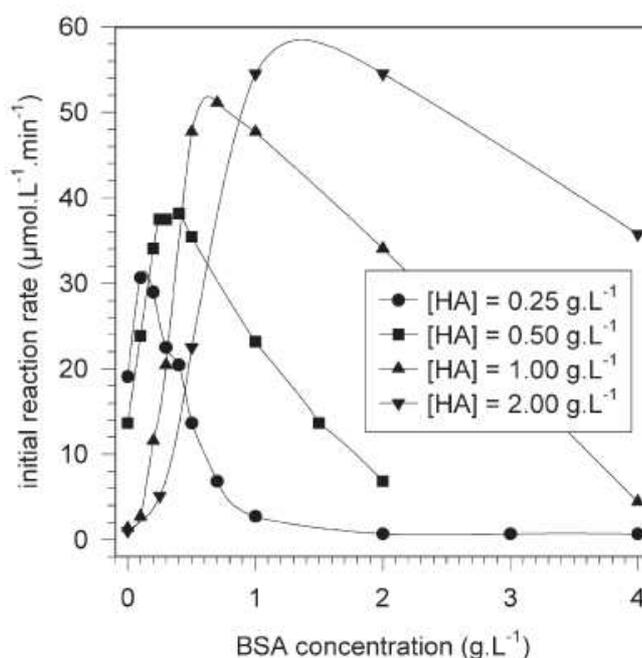


Figure 23 : Superposition de BSA-dépendances à différentes concentrations en HA
 [HAase] = 0,5 g.L⁻¹ ; pH = 4 (Lenormand *et al.*, 2009)

Il est possible d'observer sur la figure 23 que pour chaque substrat-dépendance, il existe un rapport de concentration HA sur BSA où la vitesse d'hydrolyse est maximale et donc la quantité d'enzyme libre est également maximale.

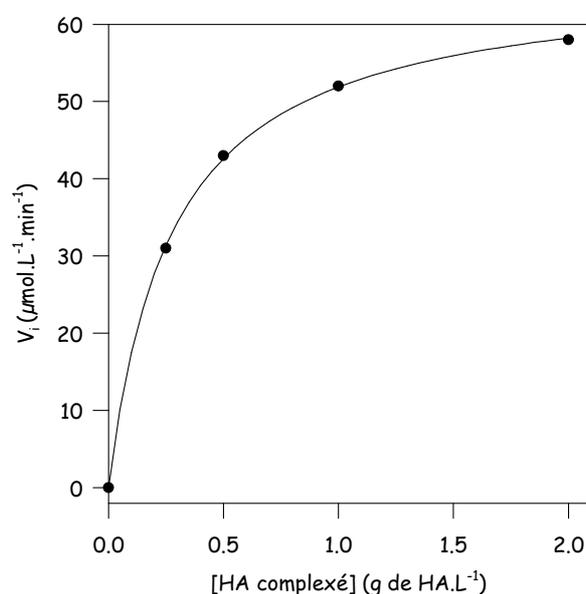


Figure 24 : Substrat-dépendance de l'hydrolyse du HA catalysée par la HAase quand le substrat est du HA complexé avec de la BSA au taux de complexation optimal (Lenormand *et al.*, 2009)

En traçant l'évolution des vitesses initiales en fonction des points correspondants aux rapports de concentrations en HA et en BSA optimaux, nous obtenons la figure 24 qui montre que le système HA/BSA/HAase est un système de type Michaëlis Menten. Cela signifie que le système HA/BSA/HAase se comporte comme un système enzymatique classique dès lors que nous considérons comme substrat le HA dans un même état de complexation avec la protéine.

IV.D. Etude enzymatique sur des HA modifiés

Les applications les plus fréquentes des dérivés de HA étant dans le domaine médical, certaines études se sont penchées sur l'effet de la modification chimique du HA sur sa biodégradabilité via l'action de la HAase. La HAase utilisée pour ces tests est le plus souvent la HAase testiculaire bovine. Beaucoup étudient cet effet en analysant le produit final après incubation de quelques heures à plusieurs jours avec la HAase. Hirano *et al.* (2005) montrent par électrophorèse capillaire, qu'en présence de HAase,

aucun produit n'a été obtenu à partir de substrat totalement méthylé. En revanche, le profil d'éluion chromatographique du HA hydrolysé par Lui et Cui (1996) montre une dégradation partielle. Sall *et al.* (2007) démontre par la méthode de Reissig (1955) que la sensibilité à la HAase des gels de HA réticulés dépend du degré de réticulation. Zhong *et al.* (1994) ainsi que Mlcochova *et al.* (2007) suivent la cinétique de dégradation enzymatique. Zhong *et al.* (1994) observent une cinétique de dégradation d'autant plus lente que le taux de fonctions carboxyl estérifiées augmente. Mlcolhova *et al.* (2007) montrent que des éthers alkylés de HA sont complètement dégradés par la HAase, avec une cinétique de dégradation d'autant plus lente que le degré de substitution augmente.

V. Les polymères associatifs

Les polymères associatifs sont généralement des polymères amphiphiles. Dans notre cas, ils sont constitués d'un squelette macromoléculaire hydrophile sur lequel sont greffés des groupements très hydrophobes dont l'hydrophobie et la teneur influencent les propriétés associatives (figure 25). Ces groupements hydrophobes sont souvent des chaînons alkyle (Shalaby *et al.*, 1991). En milieu aqueux, au delà d'une concentration d'agrégation critique, ces macromolécules vont donc s'associer pour former des agrégats. Ces polymères restent cependant hydrosolubles grâce à leur squelette hydrophile, c'est pourquoi le nombre de leurs applications (peintures, cosmétiques, composés pharmaceutiques, émulsifiants, stabilisants...) a fortement augmenté (Bock *et al.*, 1988).

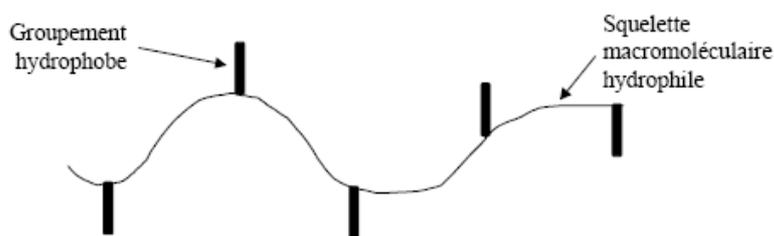


Figure 25 : Représentation schématique d'un polymère associatif

V.A. Associations hydrophobes

L'interaction entre l'eau et une substance hydrophobe, molécule généralement apolaire ou peu polaire, met en jeu une énergie correspondante à l'enthalpie libre de transfert ΔG_{tr} d'une petite molécule. D'après les lois thermodynamiques, nous avons :

$$\Delta G_{tr} = \Delta H_{tr} - T\Delta S_{tr}$$

Directement reliée à l'effet hydrophobe, l'interaction hydrophobe décrit la très forte interaction entre molécules non polaires en solution aqueuse (Thanford, 1980). La minimisation d'enthalpie libre correspond à une minimisation de la surface de contact entre les parties hydrophobes et l'eau. L'interaction entre deux segments hydrophobes est plus élevée que celle entre des molécules d'eau à l'état gazeux. L'interaction prépondérante en milieu aqueux entre deux parties hydrophobes n'est pas l'interaction de type Van der Waals mais est corrélée à une restructuration du réseau aqueux ($\Delta S < 0$). L'interaction hydrophobe est donc une propriété induite par les propriétés du solvant.

V.B. Paramètres influençant l'établissement d'associations hydrophobes

Le phénomène d'association qui existe dans le cas des polymères amphiphiles en solution aqueuse est provoqué par l'effet hydrophobe des segments apolaires qui ont tendance à l'agrégation avec expulsion des molécules d'eau qui les solvatent. Il a lieu soit entre macromolécules différentes (associations intermoléculaires) soit, au sein d'une même macromolécule (agrégations intramoléculaires). On obtient donc des solutions micro ou nano hétérogènes et les zones riches en groupements apolaires qui résultent de ces associations, sont considérés comme des micro ou nano domaines hydrophobes avec des tailles, des structures ou formes variées. De nombreux paramètres structuraux et physico-chimiques permettent de moduler ces interactions.

V.B.1. La concentration en polymère

D'une manière générale, dans une solution aqueuse fortement diluée, les associations hydrophobes de type intramoléculaires sont favorables, mais, avec l'augmentation de la concentration en polymère, les associations hydrophobes intermoléculaires tendent à apparaître. La concentration en polymère est donc la clé qui permet de favoriser les associations hydrophobes interchaînes (Shalaby *et al.*, 1991 ; Xie *et al.*, 1996). Les polymères ayant une forte tendance à former des associations intermoléculaires peuvent mener à une très forte croissance de la viscosité de la solution lorsque la concentration en polymère augmente. A plus forte concentration, on peut observer la formation d'un gel. La figure 26 montre l'évolution de la viscosité en fonction de la concentration en polymère C_p .

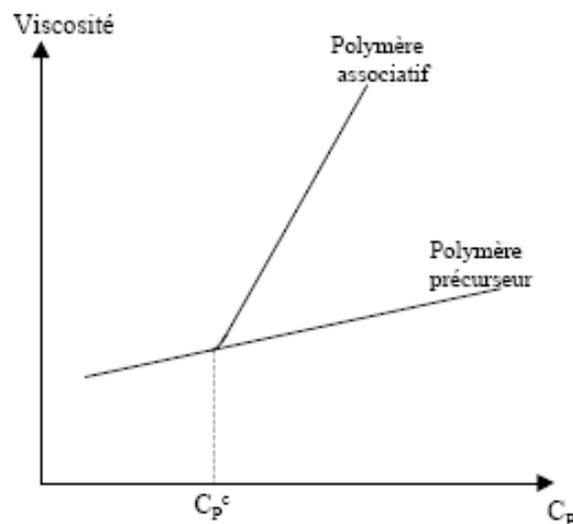


Figure 26 : Evolution de la viscosité en fonction de la concentration en polymère

A partir d'une concentration critique en polymère, la viscosité de la solution du polymère associatif devient très supérieure à celle du polymère précurseur. En effet, au dessus de cette concentration critique, les chaînons hydrophobes s'associent en microdomaines ce qui crée un réseau réversible entre les chaînes. Les domaines hydrophobes sont constitués par la réunion des chaînes alkyles du polymère (Magny *et al.*, 1992 ; Thuresson *et al.*, 1994 ; Yekta *et al.*, 1995 ; Simon *et al.*, 2003).

En régime dilué, la viscosité de la solution de polymère associatif peut être inférieure à celle du polymère précurseur. Ce phénomène est expliqué par la présence

de liaisons intramoléculaires qui entraînent une conformation plus compacte de la chaîne du polymère modifié. Il est à noter que, pour les polymères ayant une forte tendance pour les associations de type intrachaîne et pouvant conduire à la formation de polymères micelles constituées d'une simple chaîne macromoléculaire, la viscosité des solutions aqueuses est bien plus faible même pour des très fortes concentrations en polymère (Bock *et al.*, 1988 ; Aubry *et al.*, 1994).

V.B.2. La force ionique

Pour les polymères neutres, une légère augmentation de la viscosité est observée lors de l'ajout de sel (McCormick *et al.*, 1988 ; Picton, 1995). Les interactions hydrophobes sont en effet renforcées par les effets de " salting out " (diminution de la solubilité des chaînes hydrophobes en milieu salin).

Dans le cas où la chaîne hydrophile est un polyélectrolyte, les associations hydrophobes rentrent en compétition avec les répulsions électrostatiques. Le comportement des solutions de polyélectrolytes associatifs est donc très influencé par un changement de force ionique. Le comportement en milieu salin résulte d'un équilibre entre l'écrantage des répulsions électrostatiques lié à l'augmentation de la force ionique conduisant à une contraction des chaînes de polymères, et un renforcement des liaisons hydrophobes de type inter et intramoléculaire. Ainsi, l'association des parties hydrophobes est favorisée par la baisse de la densité de charge de la chaîne de polyélectrolyte (Briggs *et al.*, 1992 ; Binana-Limbele *et al.*, 1993), l'élévation de la force ionique de la solution (Pfeiffer, 1990 ; Magny *et al.*, 1994), l'augmentation du caractère hydrophobe du polyélectrolyte, l'augmentation de la flexibilité du polyélectrolyte (Gouanvé *et al.*, 2001).

En milieu dilué, il est généralement observé une diminution de la viscosité lorsque la force ionique augmente. En milieu semi-dilué, la viscosité croît en fonction de la force ionique en raison de la création d'interactions intermoléculaires. Kawakami *et al.* (2006) arrivent aux mêmes résultats en utilisant une autre technique la spectrométrie de fluorescence. Ils ont observé une diminution du rapport I_1/I_3 du pyrène (intensité relative de la première et de la troisième bande de vibration) avec l'augmentation de la concentration en sel.

V.B.3. Etude viscosimétrique

V.B.3.a. Rappel théorique

La viscosimétrie tient une place importante dans l'étude hydrodynamique des solutions macromoléculaires (Rotureau *et al.*, 2005). Elle est généralement étudiée en fonction des deux paramètres vus précédemment : la concentration en polymère et la force ionique du milieu. Elle est reconnue comme l'une des propriétés différenciant les composés macromoléculaires des autres molécules organiques. Dans une solution où les particules sont grandes par rapport aux molécules de solvant, l'écoulement de la suspension est perturbé. La présence de ces particules de grandes tailles provoque un accroissement de la viscosité par rapport au solvant pur ($\eta - \eta_0$) et donc du temps d'écoulement de la solution ($t - t_0$). Afin d'évaluer la perturbation liée aux particules, indépendamment du milieu dispersant, on définit les grandeurs suivantes :

la viscosité relative $\eta_{rel} = \frac{\eta}{\eta_0}$

la viscosité spécifique $\eta_{sp} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0}$

la viscosité réduite $\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{C}$

la viscosité intrinsèque $[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \left(\frac{\eta_{sp}}{C} \right)$

V.B.3.b. Détermination de la viscosité intrinsèque

De nombreuses études viscosimétriques sont réalisées sur les polymères associatifs et plus particulièrement les polyélectrolytes hydrophobisés (Pelletier *et al.*, 2000 ; Simon *et al.*, 2003 ; 2005 ; Rotureau *et al.*, 2006 ; 2007 ; Venter *et al.*, 2006 ; Souguir *et al.*, 2007 ; 2009 ; Colinet *et al.*, 2009). La détermination de la viscosité intrinsèque permet notamment d'identifier la nature intra et/ou intermoléculaire des interactions hydrophobes et ainsi de donner des informations sur l'organisation en solution des polyélectrolytes avant et après hydrophobisation.

Dans le cas des solutions diluées de polymères neutres ou de polyélectrolytes en présence de force ionique suffisante, la variation de la viscosité peut être exprimée par la relation d'Huggins (1942) :

$$\frac{\eta - \eta_0}{\eta_0 C_p} = \frac{\eta_{sp}}{C_p} = [\eta] + K_H [\eta]^2 C_p + \dots$$

En extrapolant la droite obtenue à concentration nulle, il est possible d'obtenir la viscosité intrinsèque ainsi que la constante d'Huggins K_H dépendant des interactions polymère-polymère et polymère-solvant.

Dans le cas de polyélectrolytes, lorsque les analyses sont réalisées dans l'eau pure, la détermination de la viscosité intrinsèque n'est plus possible par cette représentation car dans ces conditions de mesure, il ne s'agit plus d'une droite. Ceci est dû à l'effet polyélectrolyte. Le comportement hydrodynamique des polyélectrolytes diffère de celui des polymères neutres. La viscosité réduite des polyélectrolytes augmente rapidement avec la dilution (Lin *et al.*, 2000 ; Antonietti *et al.*, 1997). L'origine de l'effet polyélectrolyte est attribuée à l'expansion des chaînes de polymères liée aux forces électrostatiques répulsives intramoléculaires (Nishida *et al.*, 2001 ; Carvalho *et al.*, 2003). Aux faibles concentrations en polyélectrolyte, les contre-ions forment un nuage diffus autour de la macromolécule. Les forces coulombiennes entre les charges portées par la chaîne étant très fortes, il s'ensuit une dilatation de la chaîne qui se traduit qualitativement par une augmentation de la viscosité réduite.

Pour déterminer la viscosité intrinsèque, deux relations empiriques peuvent être utilisées, la relation de Fuoss (1948) et la relation de Fedors (1979).

La relation de Fuoss (1948) s'exprime de la manière suivante :

$$\frac{C_p}{\eta_{sp}} = \frac{1}{[\eta]} + B\sqrt{C_p}$$

la viscosité intrinsèque s'obtient par extrapolation de la droite représentant

$$\frac{C_p}{\eta_{sp}} = f(\sqrt{C_p}).$$

B dépend de la constante diélectrique du solvant et de la force électrostatique entre segments.

La relation de Fedors (1979) est obtenue par modification de la relation d'Eilers (1941) et s'exprime de la manière suivante :

$$\frac{1}{2(\sqrt{\eta_{rel}} - 1)} = \frac{1}{[\eta]} \times \left(\frac{1}{C_p} - \frac{1}{C_m} \right)$$

Une droite est obtenue en traçant $\frac{1}{2(\sqrt{\eta_{rel}} - 1)} = f\left(\frac{1}{C_p}\right)$. La pente est l'inverse de la viscosité intrinsèque. C_m est la concentration critique correspondant à un arrangement des sphères selon un réseau cubique centré. Pour les sphères dures, C_m a une valeur proche de 0,74 (Honek *et al.*, 2004).

V.B.4. La température

La formation des associations hydrophobes peut également dépendre de la température. Cependant l'effet de ce paramètre est difficile à prévoir et il semble dépendre du système étudié. Certaines études réalisées sur des dérivés hydrophobes d'acide polyacrylique et de copolymères de polyoxydes d'éthylène et de propylène (Padmanabha *et al.*, 2005) ainsi que sur des dérivés de polyacrylate et polyacrylamide (Podhajecka *et al.*, 2007) montrent que l'augmentation de la température favorise les associations hydrophobes. Ercelen *et al.* (2006) montrent que l'hydrophobisation du chitosane stabilise les interactions entre des vésicules mimant la membrane plasmique et le chitosane à des températures plus élevées. Dans d'autres cas, la diminution du nombre et de la durée de vie des associations hydrophobes est constaté lors d'études sur des dérivés de polyacrylamides (Volpart *et al.*, 1998 a).

V.B.5. La répartition des groupes hydrophobes

La répartition des groupes hydrophobes le long de la chaîne de polymère a une grande importance sur les propriétés des polymères amphiphiles. Certaines études ont montré que la répartition des groupements hydrophobes en blocs (Hill *et al.*, 1993 ; Volpert *et al.*, 1998) favorise les propriétés associatives de manière plus marquée qu'une répartition statistique le long de la chaîne de polymère.

V.C. Comportement en solution de HA hydrophobisés

L'influence des paramètres vus précédemment a été étudiée dans le cas de solution de HA hydrophobisé. Les groupements hydrophobes ont été greffés sur la fonction carboxyle du HA (Pelletier *et al.*, 2000 ; Creuzet *et al.*, 2006 ; Levasseur, 2006) ainsi que sur les fonctions hydroxyle (Zhang et James, 2005 ; Mravec *et al.*, 2008 ; Chytil et Pekar, 2009).

Pelletier *et al.* (2000) ont immobilisé de longues chaînes alkyle à 12 et 18 atomes de Carbone sur le HA et créent ainsi des dérivés amphiphiles dont le caractère hydrophobe a été mis en évidence en régime dilué par viscosité capillaire et par spectroscopie de fluorescence. Par rapport au polymère précurseur, des structures plus compactes sont obtenues par des interactions hydrophobes intramoléculaires. Ceci est indiqué par la diminution de la viscosité intrinsèque. Les liaisons hydrogène entre la fonction carboxyl et la fonction amide, rendant le HA plus rigide (Scott *et al.*, 1997) disparaissent avec le greffage de chaînes alkyle et permettent des interactions hydrophobes de type intramoléculaires. Ces interactions sont renforcées en présence de NaCl. Creuzet *et al.* (2006) ont greffé des chaînes alkyle de 8 à 16 carbones sur des dérivés de HA modifiés avec de l'acide adipique. Un comportement associatif important est constaté à partir des chaînes alkyle décyle et dodécyle. Des analyses rhéologiques montrent qu'en présence de sel, un comportement de type gel est observé avec des jonctions liées aux interactions hydrophobes peu stables dépendant de la température et de la contrainte appliquée. L'influence de la concentration en sel est importante pour contrôler la balance entre les répulsions électrostatiques et les interactions hydrophobes.

De nouveaux dérivés de HA synthétisés par une réaction de silylation (Zhang et James, 2005) permettent d'améliorer l'hydrophobie et améliorent sa solubilité dans les solvants organiques. Chytil et Pekar (2009) ont fait varier la masse molaire du HA précurseur, le degré de substitution ainsi que la longueur de la chaîne alkyle. L'étude des propriétés physico-chimiques des dérivés de HA de Chytil et Pekar (2009) montre une activité de surface pour tous les HA modifiés et leur auto association en agrégats de type micelle. Contrairement aux dérivés utilisant la fonction carboxyl, ces dérivés ont la même rigidité et la même conformation que le HA non modifié. En conservant

la fonction carboxyle intacte, les liaisons hydrogènes sont conservées. Les dérivés les plus substitués ont les conformations les plus compactes.

MATERIELS ET METHODES

I. Produits utilisés et préparation des solutions

I.A. Solutions mères de HA

Deux lots de HA natif d'origine bactérienne (HTL Fougères) ont été utilisés pour produire les fragments utilisés au cours de ce travail. Le lot PH1096SO3 ($\overline{M}_w = 2,0 \cdot 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$) a permis de produire les fragments de faibles masses molaires et le lot H1017 ($\overline{M}_w = 2,1 \cdot 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$) de produire les fragments de fortes masses molaires. Le HA natif lyophilisé est conservé à -20°C . Il est pesé et rapidement mis en solution, à cause de sa grande hygroscopie, dans un volume d'eau Milli-Q adéquat pour que sa concentration massique soit de 10 g.L^{-1} . Cette solution mère est placée sous agitation mécanique pendant plusieurs heures puis à 4°C pendant une nuit afin d'éliminer les bulles qui se sont formées au cours de la mise en solution. La solution mère est fractionnée et congelée à -20°C .

I.B. Solutions mères de HAase

Deux produits différents contenant les enzymes étudiées ont servi à la réalisation de ce travail. La poudre de venin d'abeille lyophilisé (Sigma V3375, lot 46H0399) contenant la HAase de venin d'abeille *Apis mellifera* (EC 3.2.1.35) a permis d'hydrolyser le HA natif et de produire les fragments de HA. La poudre lyophilisée contenant la HAase testiculaire bovine de type IV-S (EC 3.2.1.35) (Sigma H3884, lot 082K057) a permis de réaliser l'étude de l'hydrolyse enzymatique des fragments de HA estérifiés. Ces produits sont désignés par la suite sous le nom de HAase de venin d'abeille et HAase testiculaire bovine. Les poudres sont conservées à -20°C . Des tests effectués sur des solutions d'enzyme conservées à 4°C ou à -20°C montrent que l'activité enzymatique est significativement modifiée à l'issue des stockages. La solution d'enzyme est donc préparée juste avant son utilisation en dissolvant la HAase dans l'eau Milli-Q. La solution obtenue est placée sous agitation magnétique. Selon les conditions de l'étude, le pH de la solution est ajusté avec une solution d'acide chlorhydrique (HCl) (Sigma H7020) ou avec une solution

d'hydroxyde de sodium (NaOH) (SDS 1040517). Le pH-mètre utilisé (Metrohm 632) est muni d'une électrode de verre (Radiometer Analytical XC161).

I.C. Solutions mères de chlorure de sodium

Certaines études ont nécessité la présence de chlorure de sodium (NaCl) (Prolabo 27 810.295) afin d'imposer une force ionique au milieu. Pour ajuster la force ionique, des solutions mères de NaCl très concentrées sont préalablement préparées. Ces solutions sont conservées à 4°C.

II. Protocole d'estérification des fragments de HA

Pour modifier chimiquement les fragments de HA, la réaction choisie est une réaction de substitution nucléophile bimoléculaire (S_N2) faisant intervenir la macromolécule de HA et différents halogénoalcane ayant des longueurs de chaîne alkyle variables. Les différentes étapes de la modification chimique sont résumées sur la figure suivante.

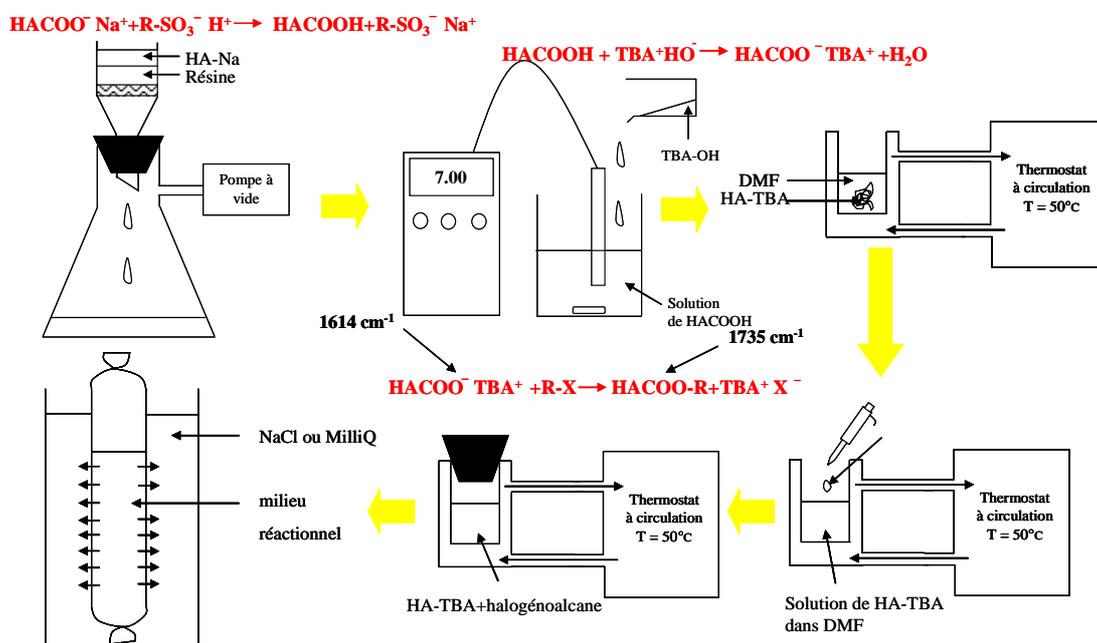


Figure 27 : Représentation schématique des différentes étapes de l'estérification des fragments de HA.

Avant l'étape de synthèse proprement dite, le HA doit subir plusieurs étapes de préparation. Sous forme de hyaluronate de sodium (HACOONa), le HA subit une première étape d'acidification (HACOOH) sur une résine acide échangeuse de cations (Bayer Lewatit OC 1211) de capacité totale de 2 équivalents molaires par litre. 150 mL de résine conditionnée sous forme acide sont déposés sur un fritté (XX1504702) placé sur une fiole à vide. Après avoir substitué les ions sodium par des protons, le HA est ensuite neutralisé par une solution aqueuse de base forte, l'hydroxyde de tétrabutylammonium (TBA-OH) (Sigma-Aldrich 17878-0) à 40% massique. Le hyaluronate de tétrabutylammonium (HATBA) est congelé puis lyophilisé.

Concernant l'étape de synthèse, le HATBA, désigné comme nucléophile, est dissous dans du diméthylformamide (DMF) à une concentration de 30 g.L⁻¹. Selon le taux d'estérification souhaité, une certaine quantité de l'halogénoalcane choisi est ensuite ajoutée. Le processus de substitution greffe la chaîne alkyle sur le nucléophile, le groupe partant étant l'halogénure. La réaction s'effectue sous hotte en réacteur double enveloppe fermé, thermorégulé à 60°C pendant 24h sous agitation magnétique. La solution est ensuite dialysée (Spectra/Por MWCO 6000-8000) contre une solution de NaCl de 0,2 mol.L⁻¹ pendant deux jours, de façon à remplacer les ions TBA⁺ par les ions Na⁺, puis contre de l'eau Milli-Q jusqu'à ce que l'eau de dialyse ait une conductivité inférieure à 3 µS.cm⁻¹. La solution est finalement congelée puis lyophilisée.

III. Caractérisation chimique et physico-chimique du HA et de ses esters

III.A. Spectroscopie infrarouge (IR)

Cette technique d'analyse est utilisée pour suivre la modification chimique des fragments de HA permettant de produire des esters de HA.

III.A.1. Principe

Dans les molécules organiques, les atomes sont liés entre eux par des énergies de liaisons caractéristiques de chaque type de liaison. Ces énergies sont sensibles aux

radiations électromagnétiques qui vont provoquer des mouvements entre les atomes et entraîner des vibrations dans la molécule : déformation, rotation, étirement ce qui traduira une absorption de l'énergie reçue. Le domaine IR où s'effectuent les analyses est l'IR moyen, de longueurs d'onde comprises entre 2,5 et 25 μm ce qui correspond à des nombres d'ondes compris entre 4000 et 400 cm^{-1} . Ces radiations sont absorbées par la molécule en tant qu'énergie de vibration moléculaire et ces absorptions sont quantifiées. La vibration des liens polarisés induit des bandes intenses, contrairement aux liens non polarisés qui sont peu ou pas visibles. La lumière est réfléchiée selon les lois classiques de l'optique géométrique.

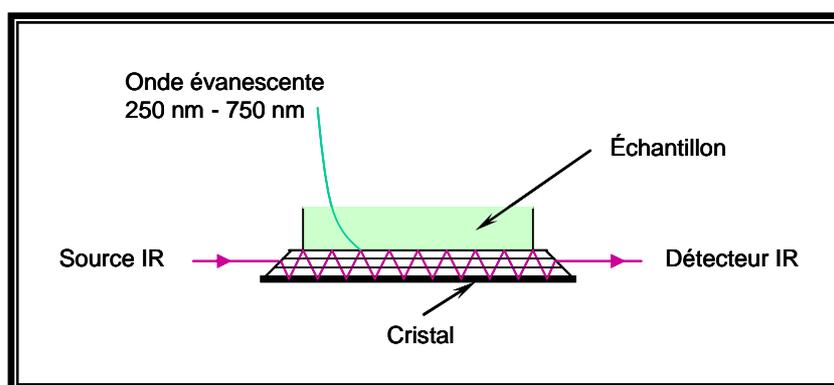


Figure 28 : Représentation schématique du principe de la réflexion totale atténuée en spectrophotométrie infrarouge

La figure 28 présente le mode de réflexion utilisé pour les analyses : le mode ATR (Attenuated Total Reflexion). Le phénomène de réflexion est perturbé par l'existence d'une onde transversale appelée « onde évanescente » qui pénètre de quelques micromètres dans l'échantillon qui se trouve en contact avec le cristal dans lequel se produit la réflexion interne. Lorsque l'échantillon absorbe la lumière, une partie de l'énergie lumineuse est retenue par celui-ci et la réflexion totale est atténuée. Ce système permet d'analyser l'échantillon tel qu'il est sans conditionnement préalable.

III.A.2. Protocole

L'appareil utilisé est un spectrophotomètre à transformée de Fourier (Perkin Elmer, 2000 FT-IR). Une petite quantité de HA lyophilisé est placée directement sur le cristal de germanium. Les paramètres choisis sont une résolution de 8 cm^{-1} et une accumulation de 64 spectres. Les spectres sont traités par le logiciel OMNICE 5.1.

III.B. Résonance Magnétique Nucléaire du proton (RMN)

Cette technique a été utilisée pour déterminer le taux d'estérification des fragments de HA estérifiés.

III.B.1. Principe

La résonance magnétique est une technique de spectroscopie applicable aux particules ou ensemble de particules atomiques ayant un spin non nul. Lorsque les noyaux de ces particules sont placés dans le champ magnétique d'un aimant très puissant, ils peuvent s'orienter dans ce champ soit dans le même sens que celui-ci soit dans le sens contraire avec une différence d'énergie. Le principe de résonance est le suivant : lorsqu'un noyau possédant un moment magnétique est situé dans un champ magnétique fixe et est soumis à une excitation magnétique périodique, son comportement est influencé par celle-ci à une fréquence bien déterminée. Ce comportement se manifeste par des effets de résonance nucléaire que l'on peut mesurer et dont la courbe de variation en fonction de la fréquence d'excitation est appelée raie de résonance.

III.B.2. Protocole

L'appareil utilisé un Bruker Advance 300 MHz. 5mg de HA lyophilisé sont mis en solution dans 1 mL de D₂O (Merck S4027028) et pour chacun il a été effectué une accumulation de 64 spectres, soit un temps d'acquisition de 8 minutes. Ces spectres sont ensuite traités informatiquement avec le logiciel 1D WINNMR.

III.C. Dosage conductimétrique

Les taux d'estérification des fragments de HA méthylés ont été déterminés selon la méthode d'Eyler (Eyler, 1947). Les dosages acido-basiques sont suivis à l'aide d'un conductimètre Radiomètre CD810 (Tacussel). 15 mg de HA estérifié sont dissout dans 50 mL d'eau Milli-Q. 46,5 mL de cette solution sont introduits dans un réacteur thermorégulé à 25°C et maintenus sous agitation magnétique et sous flux

d'azote constant. Dans ce réacteur est également ajouté 0,5 mL de solution de NaOH à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ rendant le milieu basique et permettant d'avoir toutes les fonctions carboxyl sous forme carboxylate. Le dosage s'effectue par ajouts successifs de volumes constants de $200 \mu\text{L}$ de solution de HCl $10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$.

Le dosage est répété deux fois afin de vérifier la reproductibilité des mesures.

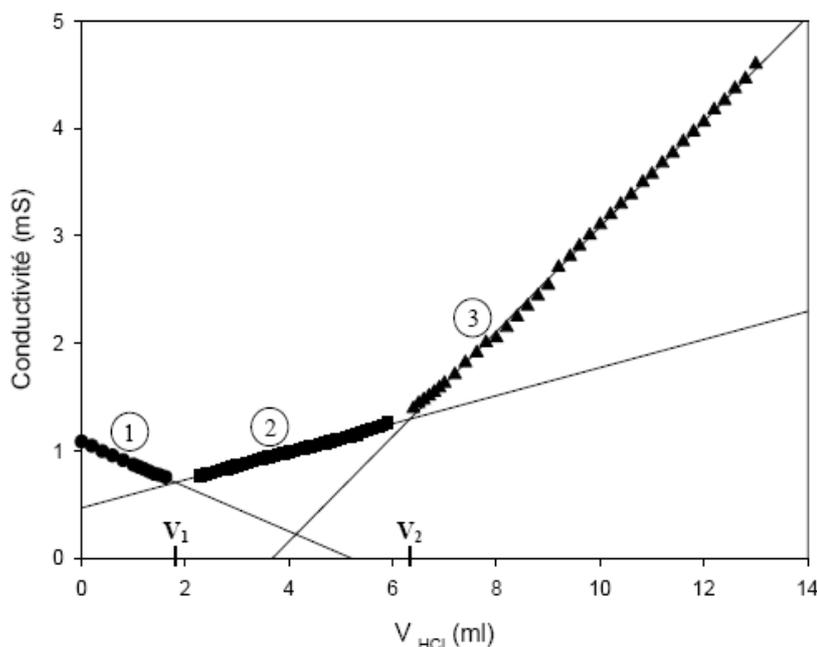


Figure 29 : Courbe de dosage conductimétrique de pullulane effectuée à 25°C.

La partie 1 correspond à la neutralisation de l'excès de soude, la partie 2 au dosage des fonctions carboxylate et enfin la partie 3 à l'excès de HCl.

Les intersections des trois droites obtenues permettent de déterminer le volume d'acide $\Delta V = V_2 - V_1$ nécessaire à la neutralisation des fonctions carboxylate et ainsi de

calculer le nombre de moles de fonction carboxylate : $n_{COO^-} = C_{HCl} \times \Delta V$

$$T = \frac{M_{diss} \times n_{COO^-}}{m + (n_{COO^-} (M_1 - M_{diss}))}$$

Avec T : taux d'estérification

m : la masse de HA estérifié à doser

M_{diss} : masse molaire d'une unité dissaccharidique de HA non estérifié (401 g.mol^{-1})

M_1 : masse molaire d'une unité dissaccharidique de HA estérifié

III.D. Analyse par couplage SEC ou AF4/MALLS

III.D.1. Chromatographie d'exclusion stérique (SEC)

III.D.1.a. Principe

La chromatographie d'exclusion stérique est une technique basée sur la séparation de macromolécules en fonction de leurs tailles. La phase stationnaire est constituée d'un gel de polymère réticulé et gonflé présentant des pores de taille variables. Les macromolécules qui migrent dans ce gel avec l'éluant vont être plus ou moins retenues en fonction de leurs dimensions ou volumes hydrodynamiques (V_H). Les plus volumineuses n'ayant pas accès aux pores, seront éluées rapidement alors que les molécules de taille plus petites seront retardées par le plus grand volume offert par les pores. Une détection appropriée (réfractomètre différentiel, UV, MALLS...) permet alors de visualiser et/ou de quantifier le fractionnement. Cette technique est donc basée sur les seuls effets stériques et le polymère doit être inerte vis-à-vis de la phase stationnaire, car toute interaction de nature chimique ou physique fausse la mesure du volume d'éluion et peut endommager la colonne.

III.D.1.b. Appareillage

Le dispositif expérimental comporte un dégazeur (ERC-413), une pompe (LC 10 AI Shimadzu) à un débit de $0,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, un préfiltre de porosité $0,45 \mu\text{m}$, une vanne d'injection Rhéodyne (boucle d'injection $100 \mu\text{L}$), deux colonnes TSK-gel PWxl G2500-G4000 (Interchim). Ce dispositif comprend également un réservoir d'éluant LiNO_3 $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

III.D.2. Fractionnement par flux force flux croisé (AF4)

III.D.2.a. Principe

Le système de fractionnement flux force, tout comme la chromatographie d'exclusion stérique, est une technique qui permet de séparer les macromolécules en fonction de leur taille ou volume hydrodynamique.

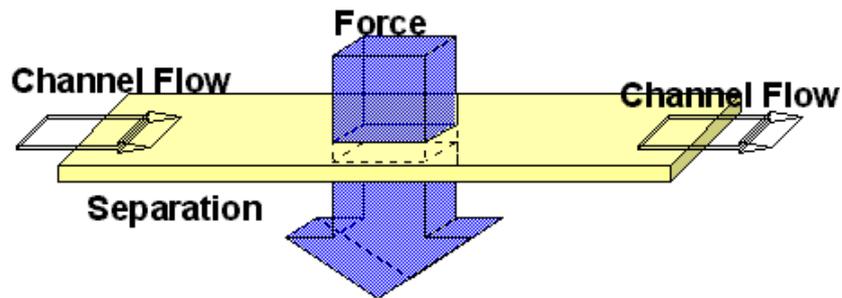


Figure 30 : Représentation schématique du principe de la séparation en fractionnement flux force.

Comme le montre la figure 30, la séparation s'effectue dans un canal fin dans lequel il y a une fuite d'éluant qui crée un champ de force transversale. Le flux laminaire transporte l'échantillon le long du canal. Le champ de force est appliqué perpendiculairement au sens d'écoulement et permet ainsi la séparation.

Le système que nous utilisons est une séparation AF4 car la forme du canal d'écoulement est asymétrique. Dans ce cas, la séparation s'effectue en trois phases : la phase d'injection où le champ de force est appliqué, la phase de relaxation où les molécules sont poussées vers la membrane tout en étant maintenues dans la zone d'injection induisant une séparation verticale des molécules selon un gradient de taille, et la phase d'éluion où le flux laminaire présentant un profil de vitesse parabolique est actif et le champ de force transversal est réduit. Les petites molécules se situant dans la zone où la vitesse d'éluion est la plus importante seront éluées en premier.

III.D.2.b. Appareillage

Le dispositif de séparation est le modèle Wyatt Eclipse 3 équipé d'une vanne d'injection Rhéodyne (boucle d'injection 100 μL). Les dimensions du canal sont 30 cm de long, 4 cm de large et 250 μm d'épaisseur. La membrane est constituée de cellulose (Nadir Reg) avec un seuil de coupure de 10 000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Le flux laminaire est régulé par une pompe LC 10 AI Shimadzu. Tout ceci est piloté par le logiciel Wyatt Eclipse 3 correspondant.

Afin de pouvoir comparer nos systèmes, nous avons réalisé le programme présenté dans le tableau suivant

Start time	Duration	Mode	X Start	X End
0.00	3.00	Elu	0.00	0.00
3.00	1.00	Elu	0.10	0.10
4.00	3.00	Elu	1.10	1.10
7.00	1.00	Foc		
8.00	2.00	Foc+Inj		
10.00	3.00	Foc		
13.00	3.00	Elu	1.10	1.10
16.00	10.00	Elu	1.10	0.10
26.00	3.00	Elu	0.10	0.10
29.00	10.00	Elu	0.10	0.00
39.00	10.00	Elu+Inj	0.00	0.00

Detector Flow: 1.00
Focus Flow: 2.20
Inject Flow: 0.20

Tableau 1 : Programmation des flux utilisés pour l'analyse de fragments de HA précurseur et esterifiés.

III.D.3. Diffusion statique de la lumière

La diffusion de la lumière est une technique particulièrement adaptée pour la caractérisation des polymères en solution diluée. Elle permet d'accéder à la masse molaire moyenne en masse, mais renseigne également sur la forme et la dimension des chaînes. Schématiquement, lorsque la lumière interagit avec la matière, il y a établissement d'un dipôle électrique temporaire. Le dipôle oscille à la fréquence incidente et réémet ainsi la lumière dans différentes directions de l'espace. Nous nous intéresserons ici uniquement au cas où la lumière ainsi émise possède la même fréquence que la lumière incidente.

Rappel théorique :

Une macromolécule, d'une solution suffisamment diluée pour qu'elle puisse être considérée comme isolée, diffuse dans toutes les directions de l'espace lorsqu'elle est soumise à un rayonnement lumineux. Par la prise en compte de la dépendance spatiale de l'intensité de lumière diffusée $I(\theta, r)$, la diffusion élastique permet la détermination des propriétés statiques des macromolécules telles que la masse molaire moyenne en masse (\overline{M}_w), le second coefficient du viriel (A_2) ou encore le rayon de giration moyen (R_g) (cf. figure VI-6).

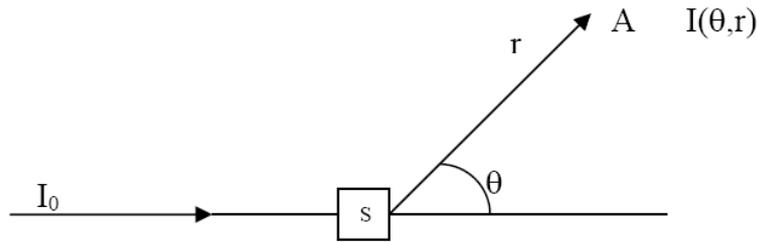


Figure 31 : Représentation schématique du principe de la diffusion de la lumière

L'intensité diffusée est en fait la somme de l'intensité diffusée par le solvant et par le polymère, soit :

$$\Delta I(\theta, r)_{\text{soluté}} = I(\theta, r)_{\text{solution}} - I(\theta, r)_{\text{solvant}}$$

On définit le rapport de Rayleigh, paramètre indépendant de la distance de mesure de l'intensité diffusée :

$$\Delta R_{\theta} = \frac{\Delta I(\theta, r).r^2}{I_0}$$

Avec I_0 : intensité du faisceau incident et r : distance d'observation

Dans les conditions précédemment définies, le rapport de Rayleigh s'écrit :

$$\Delta R_{\theta} = \frac{2\pi^2.n_0^2}{\lambda_0^4.N_a} \left(\frac{dn}{dCp} \right)^2 . Cp . \overline{Mw} . (1 + \cos^2\theta)$$

Avec n_0 : indice de réfraction du solvant

λ_0 : longueur d'onde du faisceau incident

N_a : nombre d'Avogadro

Cp : concentration en polymère

dn/dc : incrément d'indice de réfraction du polymère

\overline{Mw} : masse molaire moyenne en poids du polymère.

En absence de contribution horizontale à l'intensité diffusée et en considérant la présence d'interactions entre les molécules dissoutes (propriétés thermodynamiques de la solution), la théorie des fluctuations permet d'exprimer les caractéristiques des macromolécules. La relation donnant le rapport de Rayleigh s'écrit alors :

$$\Delta R_{\theta} = \frac{4\pi^2 \cdot n_0^2}{\lambda_0^4 \cdot N_a} \left(\frac{dn}{dCp} \right)^2 \cdot Cp \cdot \frac{Cp}{\frac{1}{\overline{Mw}} + 2A_2 \cdot Cp + 3A_3 \cdot Cp^2 + \dots}$$

Avec A_2 et A_3 les second et troisième coefficients du Viriel

On simplifie cette expression en intégrant les paramètres fixes dans une constante, ainsi :

$$\frac{K \cdot Cp}{\Delta R_{\theta}} = \frac{1}{\overline{Mw}} + 2A_2 \cdot Cp + 3A_3 \cdot Cp^2 + \dots$$

$$\text{Avec : } K = \frac{4\pi^2 \cdot n_0^2}{\lambda_0^4 \cdot N_a} \left(\frac{dn}{dCp} \right)^2$$

A dilution infinie, le terme en A_3 du développement du Viriel est négligeable et cette relation permet donc d'accéder à \overline{Mw} et A_2 .

Cette relation n'est valable que dans la mesure où les macromolécules diffusantes sont optiquement isotropes, c'est à dire lorsque leurs dimensions sont négligeables devant la longueur d'onde incidente (en pratique $R_{gz} < \lambda_0/20$). Les macromolécules ne diffusant pas la lumière symétriquement dans toutes les directions de l'espace, il faut introduire un facteur correctif, appelé aussi facteur de forme $P(\theta)$: pour un angle θ quelconque, le rapport de Rayleigh est réduit, par rapport à sa valeur théorique, du facteur de forme défini par :

$$P(\theta) = 1 - \frac{16\pi^2 \cdot n_0^2}{3\lambda_0^2} \cdot \overline{R_{gz}^2} \cdot \sin^2 \frac{\theta}{2}$$

Ainsi l'expression générale devient :

$$\frac{K Cp}{\Delta R_{\theta}} = \left(\frac{1}{\overline{Mw}} + 2A_2 \cdot Cp \right) \cdot \frac{1}{P(\theta)}$$

Pour de faibles valeurs de θ , $1/P(\theta)$ peut s'écrire :

$$\frac{1}{P(\theta)} = 1 + \frac{16\pi^2 \cdot n_0^2}{3\lambda_0^2} \cdot \overline{R_{gz}^2} \cdot \sin^2 \frac{\theta}{2}$$

On obtient ainsi la relation générale de la diffusion de lumière

$$\frac{KC_p}{\Delta R_\theta} = \frac{1}{Mw} + \frac{16\pi^2 \cdot n_0^2}{3\lambda_0^2} \cdot \frac{\overline{Rg_z^2}}{Mw} \cdot \sin^2 \frac{\theta}{2} + 2A_2 \cdot Cp + \dots$$

Ainsi, en traçant la fonction :

$$\frac{KCp}{\Delta R_\theta} = f\left(\sin^2 \frac{\theta}{2} + k \cdot Cp\right)$$

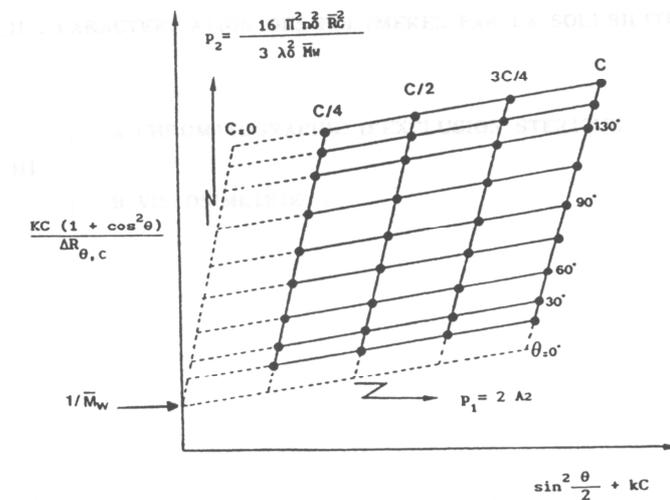


Figure 32 : Représentation du diagramme de Zimm (1956)

k étant une constante arbitraire, on obtient le diagramme de Zimm (1956) (figure 32). Une double extrapolation à concentration et à angle nuls permet d'accéder aux grandeurs \overline{Mw} , A_2 et $\overline{Rg_z^2}$.

Matériels :

Les mesures de diffusion de la lumière ont été réalisées avec un spectrophotomètre DAWN EOS (Wyatt Technology corp., Santa Barbara, Californie, États Unis). Ce système, équipé d'une source laser GaAs 30 mW ($\lambda_0=690$ nm) et d'une cellule K5 de 50 μ L, permet de mesurer simultanément l'intensité diffusée à 18 angles différents (diffusion de la lumière multi-angles-MALLS), dont 15 sont accessibles en milieu aqueux (compris entre 14 et 160°) grâce à des photodiodes installées à des angles fixes. Une valeur de dn/dc de 0,150 $\text{ml} \cdot \text{g}^{-1}$ a été utilisée pour tous nos échantillons.

III.D.4. Couplage SEC ou AF4/MALLS

Le spectrophotomètre DAWN EOS-MALLS, lié par une fibre optique (angle N° 11-110 $^{\circ}$) à un module de diffusion de la lumière quasi-élastique (QELS Wyatt) est placé en sortie des dispositifs SEC ou AF4 décrits précédemment, suivi d'un détecteur réfractométrique différentiel RID 10A Shimadzu (DRI).

La triple détection permet de déterminer en continu, pour chaque volume d'élution, la masse molaire, le rayon de giration (si $R_g > 30$ nm), le rayon hydrodynamique et la concentration de chaque fraction de polymère séparée dans les colonnes chromatographiques ou par le fractionnement par flux force. L'ensemble des acquisitions est collecté et exploité par le logiciel Astra 5. La masse molaire d'une espèce isomoléculaire de faible concentration est obtenue à tout moment par la droite d'exploitation à angle nul du diagramme de Zimm (Zimm, 1956), grâce aux photodiodes détectant simultanément l'intensité diffusée aux différents angles compris entre 14 $^{\circ}$ et 160 $^{\circ}$. La pente de cette droite permet d'accéder au rayon de giration quand la diffusion est anisotrope ($R_g > \lambda/20$). Il est possible d'atteindre les masses molaires moyennes en nombre et en poids ainsi que l'indice de polymolécularité de l'échantillon en intégrant la totalité du signal.

Cette technique de couplage permet donc de s'affranchir d'un étalonnage et d'obtenir des masses molaires absolues en ne connaissant que l'incrément d'indice de réfraction dn/dc .

III.D.5. Préparation des solutions

Les solutions sont préparées en dissolvant les fragments de HA précurseurs et estérifiés dans l'éluant $LiNO_3$ 0,1 mol.L $^{-1}$. Elles sont par la suite agitées doucement pendant 24h avant analyse. Toutes les solutions sont préalablement filtrées sur filtre 0,45 μm . En analyse par couplage SEC/MALLS, les concentrations sont de 1 g.L $^{-1}$ pour les fragments de faibles masses molaires et de 0,5 g.L $^{-1}$ pour les fragments de fortes masses molaires. En analyse par couplage AF4/MALLS, les concentrations sont de 0,75 g.L $^{-1}$.

III.E. Analyse par spectrométrie de masse

III.E.1. Electrospray

La spectrométrie de masse en mode électrospray peut s'appliquer à la détermination de la masse molaire des courts fragments de polysaccharides et à l'évaluation de leur pureté.

III.E.1.a. Principe

Un échantillon est introduit dans un capillaire placé dans un champ électrique. Le champ électrique intense appliqué à la sortie du capillaire provoque la formation d'un nuage de gouttelettes chargées qui traversent simultanément un gradient de champ électrique et un gradient de pression dans la direction de l'analyseur du spectromètre de masse. Pendant ce transport, la taille des gouttelettes diminue par évaporation du solvant due à des explosions « coulombiennes » successives (divisions spontanées de la gouttelette chargée, provoquées par une charge surfacique très élevée) (figure 33).

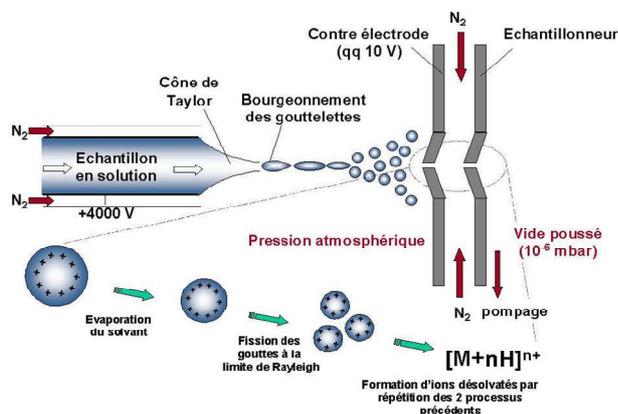


Figure 33 : Représentation schématique du principe du processus de l'électrospray (Gaskell *et al.*, 1997)

L'application d'une pression à l'entrée du capillaire peut faciliter la nébulisation, suivant le débit utilisé et la composition du solvant (Whitehouse *et al.*, 1985). De plus, un flux de gaz (de l'azote en général) est appliqué à l'interface du capillaire pour aider à l'évaporation du solvant. Les ions formés sous pression

atmosphérique sont alors canalisés par un ensemble d'échantillonneurs, c'est-à-dire un ensemble d'orifices sous pompage, vers l'analyseur où règne un vide poussé. Les ions formés en mode positif sont des espèces le plus souvent multiprotonées.

Les spectres présentent généralement un ensemble de pics correspondant aux ions multichargés de type $[M+nH]^{n+}$ où M est la masse molaire de la molécule analysée, n, le nombre de charges portées par cette molécule ionisée et H, le proton parfois remplacé par un autre cation. L'appareil utilisé est une source ESI (Esquire LC, Bruker Daltonics).

III.E.1.b. Protocole

Les solutions à analyser sont des milieux réactionnels prélevés en fin d'hydrolyse enzymatique catalysée par la HAase testiculaire bovine. 2 μ L de milieu réactionnel sont prélevés et ajoutés à un mélange de 100 μ L d'eau Milli-Q et 100 μ L de méthanol.

III.E.2. MALDI-TOF

III.E.2.a. Principe

Il s'agit de la désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI). Un faisceau laser (laser azote, λ 337 nm, impulsion 4 ns) vient frapper une matrice appropriée contenant la molécule à analyser afin d'ioniser le mélange matrice/échantillon cocrystallisé sur une surface métallique la cible. Les molécules de matrice absorbent l'énergie transmise par le laser sous forme de photons UV, s'excitent et s'ionisent. L'énergie absorbée par la matrice provoque sa dissociation et son passage en phase gazeuse. Les molécules de matrice ionisées transfèrent leur charge à l'échantillon. L'expansion de la matrice entraîne l'échantillon au sein de la phase gazeuse dense où il va finir de s'ioniser.

L'ionisation de l'échantillon a donc lieu soit dans la phase solide avant la désorption, soit par transfert de charge lors de collisions avec la matrice excitée après désorption. Elle conduit à la formation d'ions monochargés et multichargés de type $[M+nH]^{n+}$, avec une nette prépondérance pour les monochargés (figure 8). L'appareil utilisé est un tofSpec E (Micromass, Manchester)

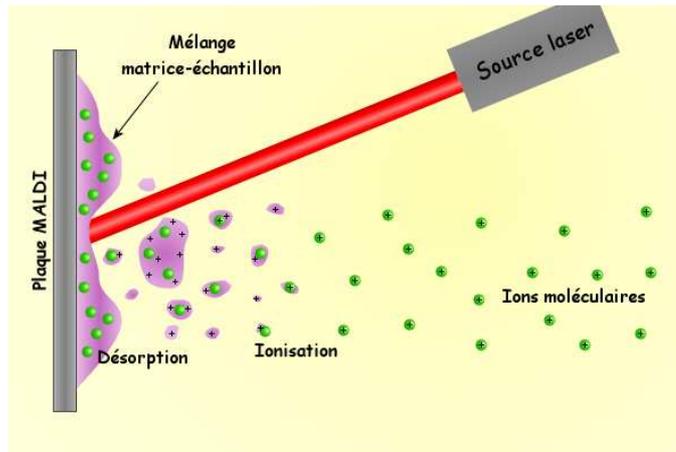


Figure 34 : Représentation schématique du principe du processus de MALDI

Cette technique est complétée par un analyseur à temps de vol (MALDI-TOF) qui consiste à mesurer le temps que met un ion, accéléré préalablement par une tension, à parcourir une distance donnée. Le rapport masse sur charge (m/z) est directement mesurable à partir du temps de vol.

III.E.2.b. Protocole

Les solutions analysées sont des prélèvements effectués en fin d'hydrolyse enzymatique catalysée par la HAase testiculaire bovine.

La matrice utilisée est préparée à partir de 2,5 mg d'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB) (sigma G 5254) dissous dans 175 μL d'eau Milli-Q (qualité HPLC, Carlo Erba France) et 75 μL d'acétonitrile (qualité HPLC, Carlo Erba France). Un mélange de 2 μL de prélèvement et de 2 μL de matrice est déposé sur une cible en acier et cristallisé sous vide.

Le mélange utilisé pour la calibration en mode réflectron est composé de leucine-enképhaline de neurotensine, du fragment 18-39 de l'ACTH (Adrénocorticotrope Hormone) et d'insuline (Sigma-aldrich). Chaque composé, dont la masse molaire est connue, a une concentration de $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

III.F. Analyse viscosimétrique

III.F.1. Principe du viscosimètre de type couette

Les mesures ont été effectuées sur un viscosimètre de type Couette (LowShear 30 - Contraves) composé de deux cylindres coaxiaux entre lesquels est disposée la solution. Le cylindre extérieur (godet), thermostaté, tourne de façon uniforme avec une vitesse angulaire (gradient de cisaillement) fixée au préalable. L'appareil mesure alors la valeur du couple résistant nécessaire pour maintenir immobile le cylindre intérieur qui tend à être entraîné par les forces de frottement. Ce couple est directement relié à la viscosité apparente de la solution par la formule suivante :

$$\eta = \frac{C}{8\pi^2 LN} \left(\frac{r_2^2 - r_1^2}{r_2^2 r_1^2} \right)$$

Avec η = viscosité apparente [Pa.s]; L = la longueur du cylindre immergée dans le liquide;

N = le nombre de tours par unité de temps du cylindre extérieur.

La géométrie utilisée a les dimensions suivantes ($r_1=5,5$ mm, $r_2=6$ mm et $L=20$ mm) (figure 35) :

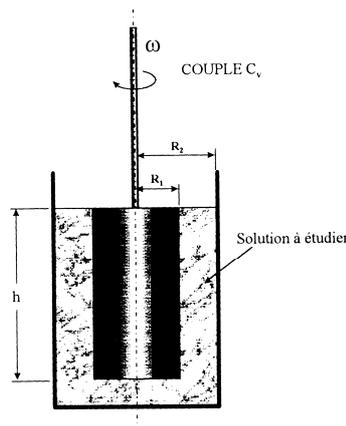


Figure 35 : Représentation schématique d'un viscosimètre de type couette.

III.F.2. Protocole

Les analyses sont effectuées à deux températures différentes (25°C et 37°C) régulées au moyen d'un bain thermostaté. Les mesures ont été effectuées, après environ 5 minutes de thermostatisation, sur le plateau newtonien. Avant chaque mesure, la géométrie ainsi que le godet sont rincés à l'eau Milli-Q filtrée sur 0,45 µm. Les solutions de fragments de HA estérifiés ou non sont préparées et agitées pendant 24h avant analyse. Le pH de ces solutions est ajusté à 4 par addition de HCl 0,1 mol.L⁻¹.

III.G. Analyse par spectrophotométrie de fluorescence

Cette technique permet de déterminer la présence de microdomaines hydrophobes dans les solutions de fragments de HA estérifiés en étudiant le spectre d'émission du pyrène.

III.G.1. Principe

En spectroscopie de fluorescence, les espèces sont tout d'abord excitées de leur état fondamental vers un des nombreux niveaux vibrationnels des niveaux électroniques, par absorption d'un photon. Les collisions avec les autres molécules induisent une perte d'énergie vibrationnelle pour la molécule excitée, jusqu'à atteindre le niveau vibrationnel le plus bas de l'état électronique excité. La molécule se relaxe ensuite dans un des états vibrationnels de l'état fondamental en émettant un photon. Lors de ce processus, les photons acquièrent différentes énergies, et par conséquent différentes fréquences. Par analyse de ces fréquences en spectroscopie de fluorescence, les différents niveaux de vibration peuvent être déterminés. Les différentes fréquences de lumière fluorescente émise par l'échantillon sont mesurées avec une lumière excitée gardée à longueur d'onde constante. Ceci permet d'obtenir le spectre d'émission de la molécule par l'enregistrement de la somme de la lumière de fluorescence émise à toutes les fréquences comme fonction de la fréquence d'une lumière incidente monochromatique. L'appareil utilisé est un spectrophotomètre fluoromax-4 (Horiba Jobin Yvon)

III.G.2. Protocole

Une solution de pyrène de concentration 10^{-3} mol.L⁻¹ est tout d'abord préparée dans l'acétone. 10 µL de solution sont placés dans un flacon pour évaporer l'acétone. 10 mL d'eau Milli-Q sont ensuite ajoutés permettant d'obtenir une solution de pyrène dans l'eau à une concentration de 10^{-6} mol.L⁻¹. Le spectre d'émission du pyrène dans l'eau est réalisé dans les conditions suivantes :

Excitation 332 nm ; fente 1,5

Emission 350-450 nm ; fente 1,5

Le spectre d'une solution de pyrène dans l'eau nous montre les 5 pics caractéristiques du pyrène (figure 36).

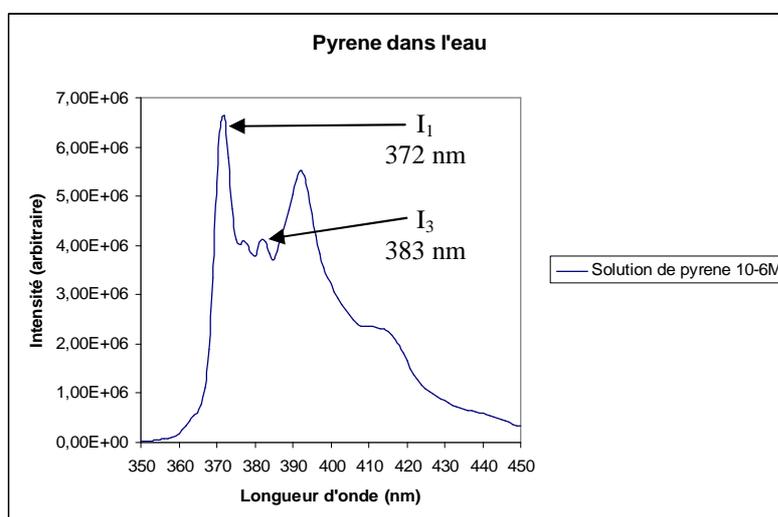


Figure 36 : Spectre d'émission du pyrène dans l'eau Milli-Q

Qualitativement, le rapport d'intensité des pics 1 et 3 (I_1/I_3) peut être utilisé comme une mesure de l'étendue des interactions entre les dipôles et les états excités singulets du pyrène. Lorsque la solubilité du pyrène est la plus faible, la valeur théorique du rapport est de 2 (Kalyanasundaram and Thomas 1977).

Des solutions de HA précurseurs et estérifiés, à différentes concentrations, sont préparées et agitées magnétiquement pendant 24h avant analyse en ajoutant du pyrène.

IV. Méthode d'étude de l'hydrolyse enzymatique

Les cinétiques d'hydrolyse du HA catalysée par la HAase sont suivies par deux méthodes : le dosage colorimétrique des extrémités réductrices N-acétylglucosamine (GlcNAc) et la chromatographie d'exclusion stérique avec détection réfractométrique (SEC/DRI). Les cinétiques sont suivies au minimum pendant trois heures et une douzaine de prélèvements sont effectués afin d'obtenir une grande précision sur la vitesse initiale d'hydrolyse, ainsi que des informations sur l'allure de la cinétique dans son ensemble.

IV.A. Dosage des extrémités réductrices N-acétylglucosamine

IV.A.1. Préparation du milieu réactionnel

Les réactions d'hydrolyse enzymatique du HA catalysées par la HAase se déroulent dans des réacteurs en verre munis d'une double paroi et thermostatés à 37°C par circulation d'eau.

Une solution de HA de concentration souhaitée est préparée par dilution de la solution mère de HA dans de l'eau Milli-Q. Un certain volume de solution mère de NaCl est ajouté pour obtenir une concentration de 0,15 mol.L⁻¹ dans le milieu réactionnel. Le pH de chaque solution est ajusté avec de l'acide chlorhydrique (Sigma H 7020) ou de l'hydroxyde de potassium (Merck 1.05033.0500) à différentes dilutions selon le pH que nous souhaitons obtenir, en utilisant un pH-mètre (Metrohm 632) équipé d'une électrode de verre (Radiometer Analytical; XC161). Ensuite, la solution diluée de HA est placée sous agitation magnétique (450 tours par minute) dans un réacteur thermostaté à 37°C, pendant une durée minimale de dix minutes. Le chronomètre est déclenché lorsqu'un aliquot de la solution concentrée d'enzyme ajustée au pH voulu est introduit, marquant ainsi le début de la cinétique.

IV.A.2. Protocole

Cette méthode, basée sur la réaction de Morgan-Elson (1933), autorise le suivi de la réaction d'hydrolyse du HA catalysée par la HAase en quantifiant, via une

intensité de coloration, les extrémités réductrices GlcNAc libérées après hydrolyse du HA dans le milieu réactionnel (Reissig *et al.*, 1955). Le tétraborate de potassium et le diméthylaminobenzaldéhyde (DMAB) en sont les réactifs. 100 mL de solution de tétraborate de potassium à $0,8 \text{ mol.L}^{-1}$ s'obtiennent en dissolvant 4,94 g d'acide borique (Sigma B-7660) et 1,98 g d'hydroxyde de potassium (Prolabo 26 657.298) dans de l'eau. Cette solution se conserve 15 jours à 4°C . Une solution mère de DMAB à 100 g.L^{-1} est obtenue à partir de 5 g de DMAB (Sigma D-8904) dissous dans 6,25 mL d'acide chlorhydrique à 12 mol.L^{-1} (Sigma H-7020) et complétée à 50 mL avec de l'acide acétique glacial (Sigma A 6283). Cette solution se conserve 1 mois à 4°C . Environ 15 minutes avant d'être utilisée, cette solution mère est diluée au $1/10^{\text{ème}}$ dans de l'acide acétique glacial, donnant la solution fille. Celle-ci se dégrade rapidement à température ambiante.

Le dosage s'effectue en prélevant un échantillon de 200 μL du milieu réactionnel et en le plaçant dans un tube à essai en verre contenant 50 μL de tétraborate de potassium. Le tube est alors agité 5 secondes à l'aide d'un vortex, puis placé exactement 3 minutes dans un bain-marie à 100°C , et enfin ramené à température ambiante par immersion dans de l'eau froide au moins 20 minutes. 1,5 mL de la solution fille de DMAB sont alors ajoutés. Le tube est agité au vortex pendant 5 secondes et placé à 37°C pendant 15 minutes. La solution est ensuite placée dans une cuve spectrophotométrique jetable, en plastique, de 1 cm de trajet optique et un spectre d'absorbance est réalisé entre 400 et 700 nm pour chaque échantillon traité. L'absorbance est lue, avec comme référence de l'eau, à l'aide d'un spectrophotomètre UV / visible (KONTRON, UVIKON 860) relié par une interface à un micro-ordinateur permettant la sauvegarde des données et leur traitement ultérieur.

Au cours du dosage, l'ajout de tétraborate de potassium amène l'échantillon à un pH alcalin (proche de 9), ce qui stoppe la réaction enzymatique d'hydrolyse. L'enzyme est ensuite dénaturée de façon irréversible par le chauffage à 100°C . Le pH alcalin permet également la formation d'un complexe entre le tétraborate de potassium et la N-acétyl-glucosamine de l'extrémité réductrice de la chaîne de HA (figure 37).

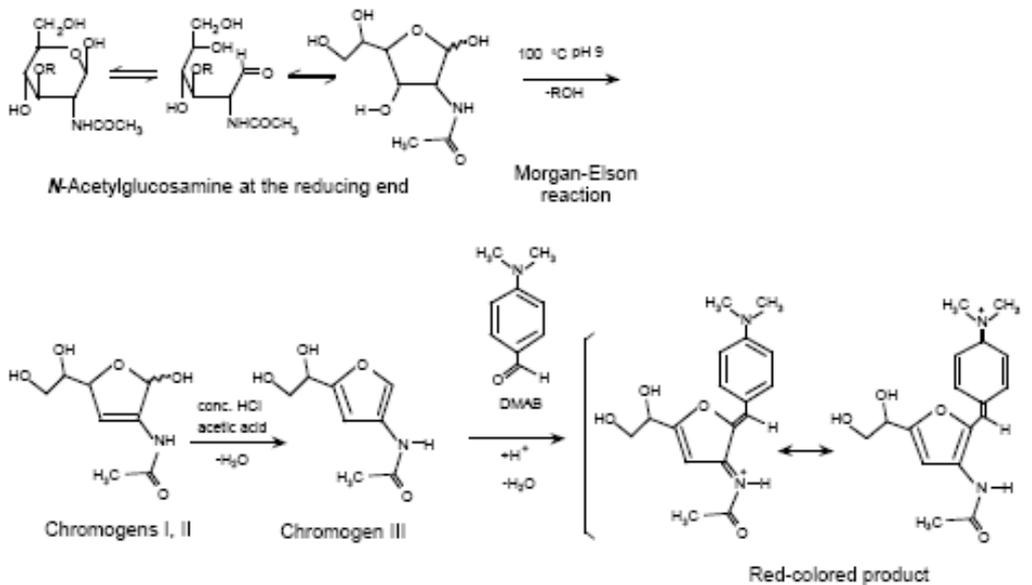


Figure 37 : Mécanisme de la réaction de Morgan-Ellison montrant les différentes étapes allant de la formation d'un dérivé furannose avec l'extrémité réductrice obtenue après coupure enzymatique de la chaîne de HA (Takahashi *et al.*, 2003)

Le DMAB réagit ensuite avec ce composé pour former un complexe coloré. Une température de 37°C et un milieu acide sont nécessaires au développement de la coloration. A la fin de la réaction d'hydrolyse, les longues chaînes de HA ont été hydrolysées en petits fragments. La concentration finale des extrémités réductrices de chaînes est potentiellement d'autant plus importante que la concentration initiale de HA est plus élevée. Il apparaît que pour une concentration en HA supérieure à 1 g.L⁻¹, l'absorbance mesurée pour les échantillons prélevés en fin de réaction d'hydrolyse lorsque la réaction est totale se situe en dehors du domaine de validité de la loi de Beer-Lambert. Il s'avère donc nécessaire de procéder à une dilution des 200 µL prélevés du milieu réactionnel dès lors que la concentration massique du HA dépasse 1 g.L⁻¹.

IV.A.3. Analyse du signal

Il a été montré par notre équipe (Astériou *et al.*, 2001) que l'absorbance à 585 nm résulte en fait de deux contributions distinctes : une première colorimétrique, directement liée à la concentration d'extrémités réductrices GlcNAc, et une seconde turbidimétrique indépendante de la concentration d'extrémités réductrices mais liée aux complexes HA-protéines qui se forment en milieu acide, lors de l'ajout de la solution acide de DMAB pendant le dosage. Pour quantifier cette part turbidimétrique du signal brut d'absorbance à 585 nm, des spectres d'absorbance entre 400 et 700 nm sont réalisés pour chaque échantillon prélevé au cours d'une cinétique d'hydrolyse du HA et traité selon le protocole de Reissig. Leur superposition (figure 38) montre la présence d'un double pic entre 450 nm et 650 nm dont les maxima se situent à 544 nm et 585 nm et qui correspond au complexe coloré formé avec les extrémités réductrices GlcNAc.

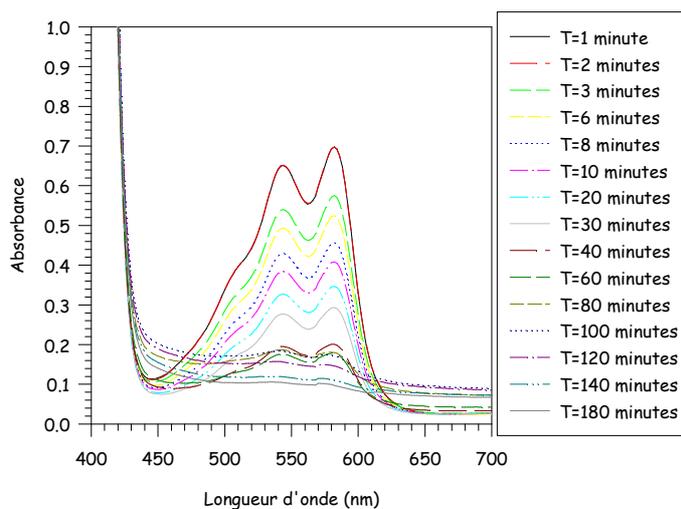


Figure 38 : Superposition des spectres d'absorbance des échantillons de milieu réactionnel traités par la méthode de Reissig à différents temps de réaction.

Au cours de l'hydrolyse enzymatique du HA, la concentration d'extrémités réductrices augmente, ce qui se traduit par une augmentation de l'intensité du double pic. En dehors du domaine [450-650] nm, l'absorbance évolue également au cours du temps et révèle de la turbidité. Cette turbidité existe sur tout le domaine de longueurs d'onde mais n'est clairement discernable qu'en dehors du domaine du double pic d'absorbance. Chacune des parts colorimétrique et turbidimétrique peut être estimée

(Astériou *et al.*, 2001) en linéarisant chaque spectre entre 450 nm et 650 nm (figure 39).

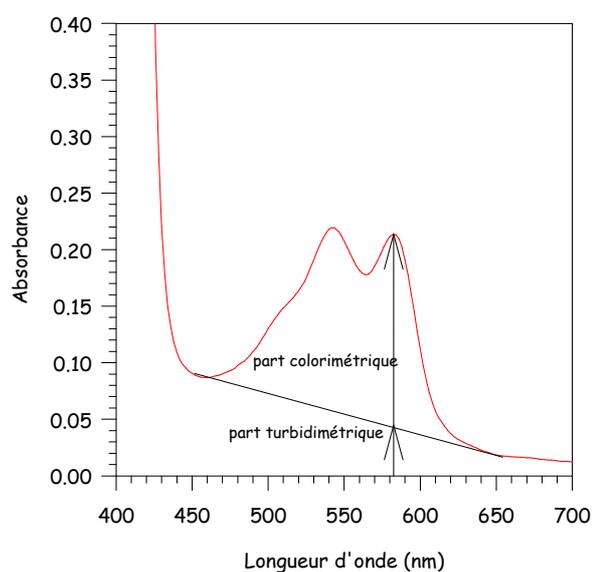


Figure 39 : Décomposition du signal de Reissig à 585 nm en parts colorimétrique et turbidimétrique.

L'équation de la droite ainsi obtenue permet de déterminer la valeur de l'absorbance à 585 nm imputable à la turbidité. La part colorimétrique est alors calculée en soustrayant cette absorbance de turbidité à l'absorbance brute mesurée à 585 nm. Chaque cinétique d'hydrolyse enzymatique du HA peut donc être suivie par colorimétrie, puisqu'une fois l'absorbance brute décomposée (figure 40), le signal colorimétrique est directement proportionnel à la concentration molaire des extrémités réductrices GlcNAc. Cette proportionnalité est déterminée grâce à un étalonnage approprié.

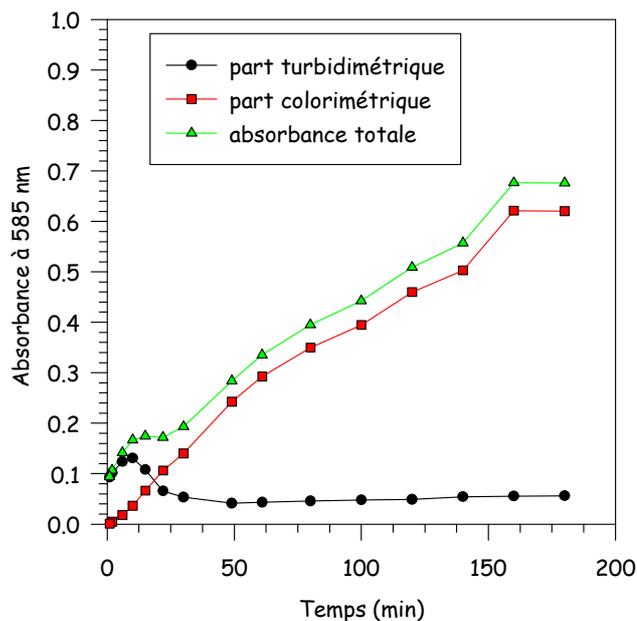


Figure 40 : Evolution de l'absorbance totale à 585 nm et de ses parts turbidimétrique et colorimétrique au cours de la cinétique d'hydrolyse du HA catalysée par la HAase suivie par la méthode de Reissig.

IV.A.4. Etalonnage de la méthode

L'étalonnage de la méthode est réalisé avec des solutions de GlcNAc, dont les concentrations massiques sont comprises entre 0 et 0,2 g.L⁻¹ soit, entre 0 et 9,04 10⁻⁴ mol.L⁻¹, préparées par dissolution de GlcNAc (Sigma A 8625) dans de l'eau. Les échantillons de 200 µL de chaque solution sont soumis au protocole de la méthode de Reissig décrit précédemment.

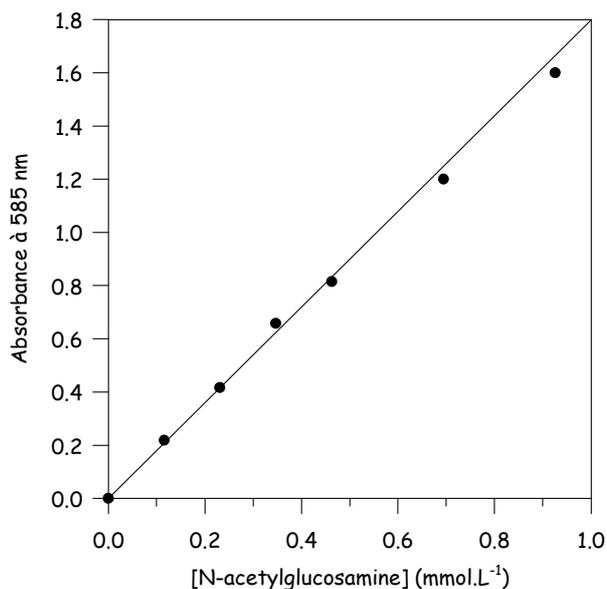


Figure 41 : Etalonnage de la méthode Reissig à l'aide de solutions de N-acétylglucosamine.

La droite de régression obtenue (figure 41) a pour équation :

$$A_{585} = 1,8 \cdot 10^3 \times [\text{GlcNAc}]$$

A_{585} étant l'absorbance colorimétrique à 585 nm et $[\text{GlcNAc}]$, la concentration molaire de GlcNAc.

Il a été observé qu'un tel étalonnage de cette méthode de dosage est biaisé du fait de l'utilisation de la GlcNAc en tant que molécule étalon (Levasseur, 2001; Shimada et Matsumura, 1980). En effet, dans la molécule de HA, la GlcNAc est liée en position 3 à du GlcUA. Cette substitution en position 3 fait que le signal colorimétrique obtenu avec de la GlcNAc d'une extrémité de chaîne de HA est plus intense que celui obtenu avec la GlcNAc libre : les coefficients d'extinction molaire sont différents ; il est donc nécessaire d'appliquer un facteur de correction de valeur 1,63. Ainsi, la concentration molaire d'extrémités réductrices GlcNAc, $[\text{ER}]$, qui correspond aussi à la concentration molaire de chaînes de HA, s'obtient par :

$$[\text{ER}] = \frac{A_{585}}{1,8 \times 10^3 \times 1,63}$$

La correspondance entre l'absorbance colorimétrique mesurée à 585 nm et la concentration molaire d'extrémités réductrices GlcNAc étant établie, il est alors possible de représenter toute cinétique en terme d'évolution soit de l'absorbance colorimétrique à 585 nm, soit de la concentration molaire d'extrémités réductrices (ou de chaînes de HA) en fonction du temps. En outre, connaissant la concentration massique de HA ($[\text{HA}]_m$) la masse molaire moyenne en nombre, \overline{M}_n , des chaînes de HA de chaque échantillon prélevé du milieu réactionnel peut être obtenue par :

$$\overline{M}_n = \frac{[\text{HA}]_m}{[\text{ER}]}$$

L'évolution de \overline{M}_n peut donc aussi être suivie en fonction du temps d'hydrolyse.

IV.A.5. Exploitation des données cinétiques : lissage des cinétiques d'hydrolyse enzymatiques

Cette partie présente un modèle permettant de lisser l'ensemble des points de la cinétique par une loi mathématique afin de déterminer la vitesse initiale d'hydrolyse à partir des données expérimentales recueillies au cours d'une hydrolyse enzymatique du HA, il est possible de construire. C'est en effet uniquement à l'instant initial de la réaction que les milieux réactionnels sont complètement caractérisés et ne diffèrent l'un de l'autre que par le paramètre étudié. La vitesse initiale permet de comparer des cinétiques entre elles. Une modélisation de la cinétique d'hydrolyse du HA a donc été proposée (Vincent *et al.*, 2003) dans le but de déterminer, de façon précise et reproductible, la vitesse initiale de chaque cinétique.

Lorsqu'il s'agit d'une réaction enzymatique, la vitesse de réaction est liée à la probabilité de rencontre entre l'enzyme et son substrat. Dans le cas du HA, les résultats expérimentaux montrent des cinétiques ayant une allure de type exponentielle démontrant que le substrat réel n'est pas la chaîne de HA mais la liaison $\beta(1-4)$ hydrolysable (Vincent *et al.*, 2003).

Selon une cinétique de premier ordre, la vitesse d'hydrolyse est proportionnelle à la concentration molaire des liaisons $\beta(1-4)$ des chaînes de HA potentiellement hydrolysables, [S], et s'exprime à chaque instant, t, selon :

$$\frac{d[S]}{dt} = -k \times [S]$$

k étant la constante de vitesse de la réaction.

Puisqu'à chaque fois qu'une liaison $\beta(1-4)$ est hydrolysée, une nouvelle chaîne de HA est produite, la vitesse de réaction peut aussi s'exprimer en terme de concentration molaire de chaînes de HA [Ch], selon :

$$\frac{d[Ch]}{dt} = -\frac{d[S]}{dt} = k \times [Ch] \times N_c$$

N_c étant le nombre de liaisons potentiellement hydrolysables par chaîne de HA.

Pour exprimer l'évolution de la concentration de chaînes de HA en fonction du temps, il convient d'exprimer N_c . Considérons qu'au temps t les chaînes de HA

possèdent un nombre moyen de disaccharides N. La valeur N peut se déduire du nombre total de disaccharides, N_0 , dans un milieu réactionnel de volume V, ainsi que de la concentration de chaînes de HA.

$$N = \frac{N_0}{[Ch] \times V}$$

Les interactions entre le HA et le site actif de la HAase de type testiculaire engagent cinq unités disaccharidiques (Ernst *et al.*, 1995). Ainsi, contrairement à l'enzymologie classique, l'hydrolyse d'une liaison $\beta(1-4)$ par cette enzyme conduit à la diminution de 5 unités substrat car les liaisons $\beta(1-4)$ localisées au niveau des extrémités des deux nouvelles chaînes de HA issues de l'hydrolyse ne sont plus hydrolysables (Vincent *et al.*, 2003). Il en résulte que le nombre N_c de liaisons $\beta(1-4)$ potentiellement hydrolysables par chaîne de HA est égale à $(N-4)$.

$$N_c = \frac{N_0}{[Ch] \times V} - 4$$

La vitesse de réaction d'hydrolyse s'exprime selon l'équation suivante :

$$\frac{d[Ch]}{dt} = k \times [Ch] \times \left(\frac{N_0}{[Ch] \times V} - 4 \right) = k \times \left(\frac{N_0}{V} - 4 \times [Ch] \right)$$

ou encore, en séparant les variables

$$\frac{d[Ch]}{\frac{N_0}{V} - 4 \times [Ch]} = k \times dt$$

En intégrant cette équation, l'expression de la concentration de chaînes de HA en fonction du temps fait apparaître l'aspect exponentiel de la cinétique :

$$[Ch]_t = \left(\frac{N_0}{4 \times V} - [Ch]_0 \right) \times (1 - e^{-4k \times t}) + [Ch]_0$$

$[Ch]_t$ et $[Ch]_0$ étant respectivement les concentrations de chaînes de HA à l'instant t et à l'instant initial. Cette dernière équation peut s'écrire de façon plus synthétique selon :

$$[Ch]_t = A_0 \times (1 - e^{-k_0 \times t}) + [Ch]_0$$

A_0 étant la concentration maximale de chaînes de HA qui peuvent être produites puisqu'il est possible d'assimiler cette concentration à la concentration

maximale de liaisons $\beta(1-4)$ hydrolysables par l'enzyme et k_0 , la constante de vitesse apparente de la réaction.

Des études menées au sein même de notre équipe (Tranchepain *et al.*, 2004) ainsi que d'autres rapportées dans la littérature (Ernst *et al.*, 1995 ; Payan *et al.*, 1993) indiquent que la vitesse d'hydrolyse enzymatique du HA catalysée par la HAase est plus faible pour les oligosaccharides. Par ailleurs, il a été montré (Cramer, 1994 ; Tranchepain *et al.*, 2004) que le K_m (constante de Michaelis) diminue lorsque la taille des oligosaccharides de HA augmente, indiquant que la constante d'association HAase-HA augmente. La modélisation des cinétiques par une somme de deux exponentielles traduit l'existence de deux contributions, l'une prédominante en début de réaction lorsque le HA est constitué de longues chaînes, et l'autre retrouvée tout au long de la cinétique quelle que soit la longueur des chaînes du HA.

$$[Ch]_t = A_1 \times (1 - e^{-k_1 \times t}) + A_2 \times (1 - e^{-k_2 \times t}) + [Ch]_0$$

A_1 et k_1 étant respectivement la concentration maximale de chaînes de HA produite par hydrolyse enzymatique et la constante de vitesse pour la première contribution, A_2 et k_2 , leurs équivalents pour la seconde contribution. Considérant cette dernière équation, le lissage des points expérimentaux (figure 42) apparaît pleinement satisfaisant.

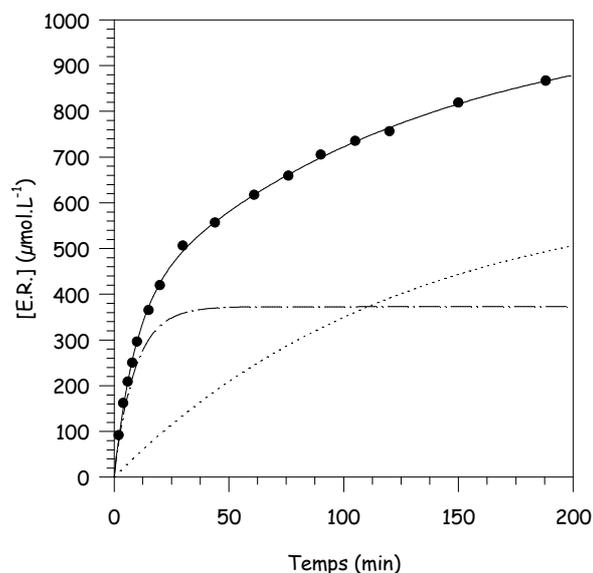


Figure 42 : Lissage bi-exponentiel d'une cinétique d'hydrolyse du HA natif catalysée par la HAase.

Ce modèle bi-exponentiel a donc été retenu et utilisé pour lisser chaque cinétique d'hydrolyse afin d'en extraire, par dérivation à l'instant initial, la vitesse initiale d'hydrolyse (Vincent *et al.*, 2003).

IV.B. Suivi cinétique par couplage SEC/DRI

IV.B.1. Principe

Fondée sur le principe de séparation de molécules en fonction de leur volume hydrodynamique au travers d'un gel chromatographique décrit précédemment (III.D.1.a), la chromatographie d'exclusion stérique permet de séparer un mélange de molécules de HA différentes par leur taille. Ainsi, à l'aide d'un détecteur approprié, dans notre cas un détecteur réfractométrique, un profil de répartition des masses molaires du HA est obtenu en fonction du volume d'élution. En effet, grâce à plusieurs échantillons standards de HA préparés au laboratoire (Tranchepain *et al.*, 2006), dont la masse molaire a été déterminée par les techniques de spectrométrie de masse et d'analyse SEC/MALLS/DRI décrites dans les précédents paragraphes, un étalonnage spécifique au HA des colonnes chromatographiques de notre système SEC/DRI a pu être effectué. Cet étalonnage permet de relier le volume d'élution du HA à sa masse molaire.

IV.B.2. Appareillage

La chaîne de chromatographie est constituée en série d'un réservoir d'éluant, d'une pompe HPLC (Kontron, HPLC pump 420) dont le débit est fixé à $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, d'une vanne d'injection (Rhéodyne) dont la boucle d'injection est de $100 \mu\text{L}$, de 2 colonnes chromatographiques en série Tosoh-Haas, TSK-gel PW_{XL} G2500-G4000 maintenues à $37 \text{ }^\circ\text{C}$ dans un four (Cro-cil) et d'un détecteur réfractométrique (ERC inc. ERC-7515A) relié à un micro-ordinateur pour l'acquisition et la sauvegarde des données qui peuvent être ainsi traitées numériquement par la suite.

L'éluant chromatographique, une solution de nitrate de sodium à $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, est préparé par dissolution de $8,5 \text{ g}$ de NaNO_3 (Prolabo 27 950.298) dans de l'eau avec un volume final de 1 litre . Son pH est ajusté à 9 à l'aide d'une solution

d'hydroxyde de potassium (Merck 1.05033.0500) de concentration égale à 1 mol.L^{-1} . L'éluant est ensuite filtré sur une membrane de porosité $0,22 \mu\text{m}$ (Nalge Company, DSO215-4020) puis dégazé sous vide.

Les échantillons de HA à injecter ont une concentration massique maximale de $0,2 \text{ g.L}^{-1}$. Les dilutions éventuelles sont réalisées avec l'éluant décrit précédemment.

IV.B.3. Préparation des solutions

Nous savons que pour stopper la réaction enzymatique, le pH du mélange réactionnel doit rapidement être amené à un pH basique. Jusqu'à présent, pour les analyses chromatographiques, un échantillon de $200 \mu\text{L}$ du mélange réactionnel était prélevé et ajouté à $50 \mu\text{L}$ d'ammoniaque et placé au bain-marie à 100°C pendant 3 minutes afin de stopper quasi-instantanément la réaction d'hydrolyse enzymatique. La concentration du HA était ensuite amenée à $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ par dilution de l'échantillon dans l'éluant chromatographique, puis une injection en SEC-DRI était effectuée pour l'analyse. Nous avons souhaité simplifier le protocole et avons injecté des prélèvements de milieu réactionnel qui ont subi les étapes décrites précédemment excepté l'ajout d'ammoniaque.

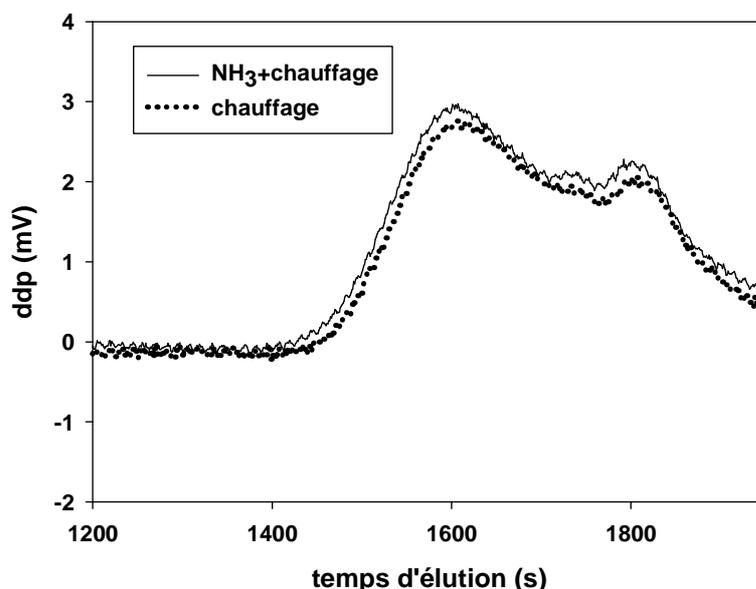


Figure 43 : prélèvement de milieu réactionnel de HA estérifié hydrolysé pendant 2h et de HAase effectué avec et sans ajout d'ammoniaque

La figure 43 montre qu'avec et sans ajout d'ammoniaque, les profils chromatographiques obtenus sont identiques. Il est donc possible d'arrêter la réaction enzymatique uniquement par chauffage à 100°C pendant 3 min.

IV.B.4. Etalonnage du dispositif

Dans la chromatographie d'exclusion stérique, la conformation de la macromolécule est un paramètre important à prendre en compte. Ainsi, deux molécules de même masse molaire mais présentant des conformations différentes auront des temps d'élution différents. Pour obtenir de manière fiable et précise la masse molaire du HA dans nos échantillons, il est nécessaire de calibrer notre dispositif de chromatographie avec quelques échantillons standards de HA de différentes masses molaires. Les masses molaires des échantillons étalons sont déterminées par couplage SEC/MALLS/DRI. Les échantillons de HA sont ensuite injectés en SEC/DRI afin de connaître leur temps d'élution chromatographiques. Les temps d'élution au sommet de pic sont relevés et ainsi, la corrélation entre le temps d'élution par SEC/DRI et la masse molaire correspondant aux sommets de pics peut être effectuée. L'étalonnage suivant est obtenu (figure 44) :

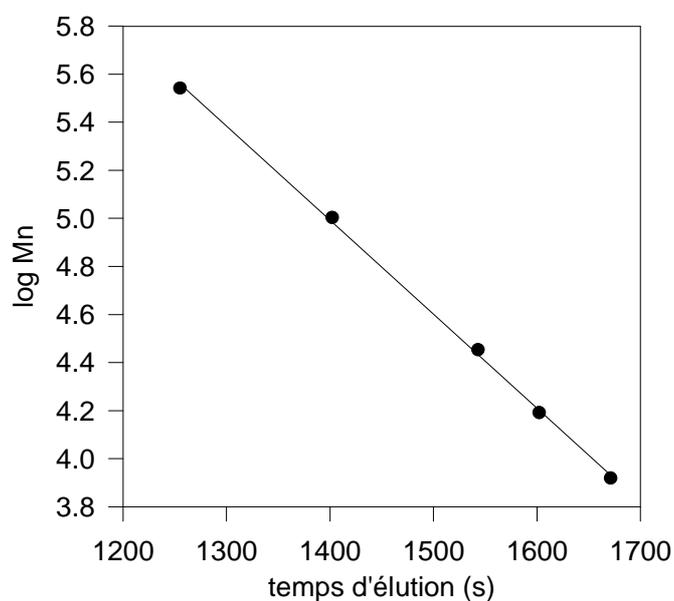


Figure 44 : Etalonnage du dispositif de chromatographie SEC/DRI

Cette droite a pour coefficient de corrélation de 0,999 et pour équation :

$$\log \overline{M}_n = -3,9110^{-3} \times \text{temps d'élution} + 10,47$$

PARTIE RESULTATS

I. Production de fragments de hyaluronane par voie enzymatique

Cette première partie détaille, tout d'abord, la stratégie employée afin d'obtenir à partir de HA natif des fragments de HA de masse molaire souhaitée. La réaction enzymatique HA/HAase étant bien maîtrisée à présent dans notre laboratoire (Tranchepain, 2004) (Levasseur, 2006), nous choisissons de réduire la masse molaire du HA par hydrolyse enzymatique catalysée par la HAase. Nous détaillerons les principaux paramètres influençant cette réaction ainsi que les conditions expérimentales que nous avons choisies pour produire les fragments qui serviront à nos études. Ces fragments seront par la suite analysés, pour mettre en évidence les avantages du procédé enzymatique et pour avoir leur caractéristique physico-chimique.

I.A. Paramètres influençant la réaction enzymatique

Les différentes études fondamentales réalisées au laboratoire ont montré l'importance de certains paramètres expérimentaux tels que le choix de la HAase ainsi que sa concentration, la concentration en HA, le pH et la force ionique. La meilleure combinaison de ces paramètres nous a permis d'obtenir en quelques heures des fragments de HA de taille souhaitée.

I.A.1. Choix de l'enzyme

Les études menées jusqu'à présent au laboratoire ont été réalisées en utilisant la HAase testiculaire bovine. Le phénomène de complexation entre le HA et la HAase testiculaire bovine a déjà été mis en évidence lors de ces différentes études et de façon très marquée (Asteriou, 2006 ; Deschrevel, 2008 ; Lenormand, 2008).

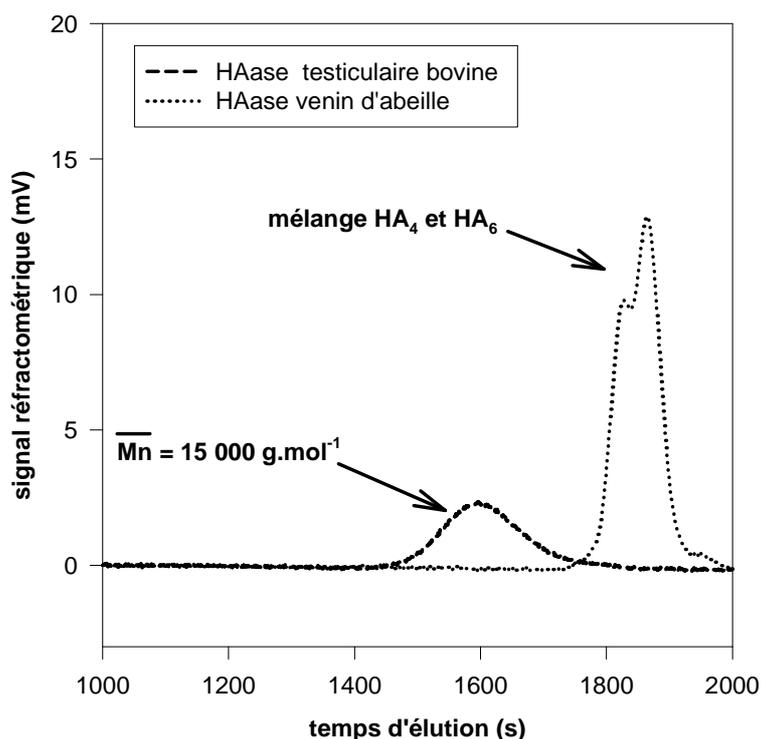


Figure 45 : Profil chromatographique de HA natif bactérien après 48h d'hydrolyse enzymatique catalysée par deux HAase : testiculaire bovine et venin d'abeille. Conditions enzymatiques choisies $[HA] = 3,5 \text{ g.L}^{-1}$; $[HAase] = 0,25 \text{ g.L}^{-1}$; $\text{pH} = 4$

La figure 45 présente des résultats obtenus après 48 h d'hydrolyse enzymatique avec deux types de HAase. Nous nous plaçons dans des conditions qui favorisent la complexation électrostatique, c'est-à-dire une concentration élevée en HA et faible en HAase ou encore un rapport HA/HAase élevé ainsi qu'une faible force ionique. Nous allons ainsi pouvoir étudier l'influence de la provenance de la HAase sur la complexation électrostatique. Nous observons qu'en utilisant la HAase testiculaire bovine, la masse molaire obtenue en fin d'hydrolyse est de $15\,000 \text{ g.mol}^{-1}$, alors que si nous utilisons la HAase de venin d'abeille, la masse molaire obtenue est de 1000 g.mol^{-1} . Cette dernière valeur de masse molaire indique, d'après la littérature, la fin de la réaction d'hydrolyse enzymatique, c'est-à-dire un mélange de tétra- et hexasacharides de HA (Meyer et Rapport, 1952). Dans ces conditions expérimentales, le HA n'a pas pu être totalement hydrolysé lorsque nous utilisons la HAase testiculaire bovine. La complexation électrostatique empêche d'hydrolyser totalement le HA. Nous remarquons que dans ces conditions expérimentales, la réaction d'hydrolyse est prédominante sur la réaction de complexation dans le cas de la HAase de venin d'abeille. Le choix de cette enzyme est plus approprié lorsque la masse

molaire que nous souhaitons obtenir est faible ou lorsque nous sommes dans des conditions où la force ionique est faible.

I.A.2. Influence de la concentration en HA et en Haase

Les deux figures nous permettent d'observer l'influence de la concentration en HA (Figure 46) et en HAase (Figure 47) sur l'hydrolyse enzymatique.

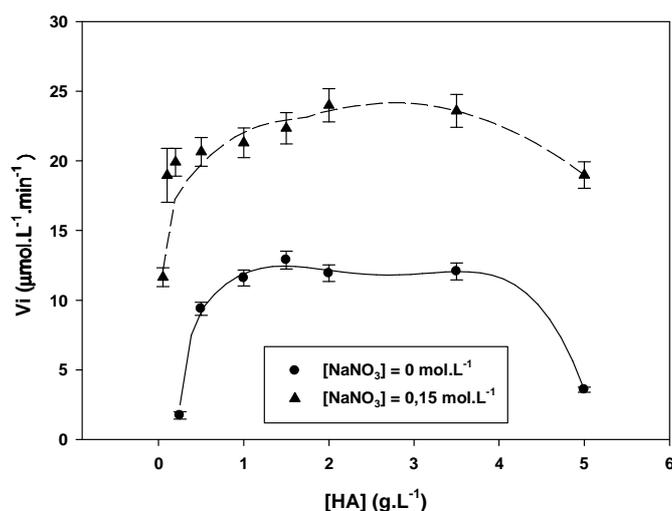


Figure 46 : Substrat-dépendance de la réaction d'hydrolyse du hyaluronane catalysée par la hyaluronidase de venin d'abeille 0,2 g.L⁻¹ dans du tampon phosphate 5 mmol.L⁻¹, avec la concentration de NaNO₃ nulle ou égale à 0,15 mol.L⁻¹, à pH 4.

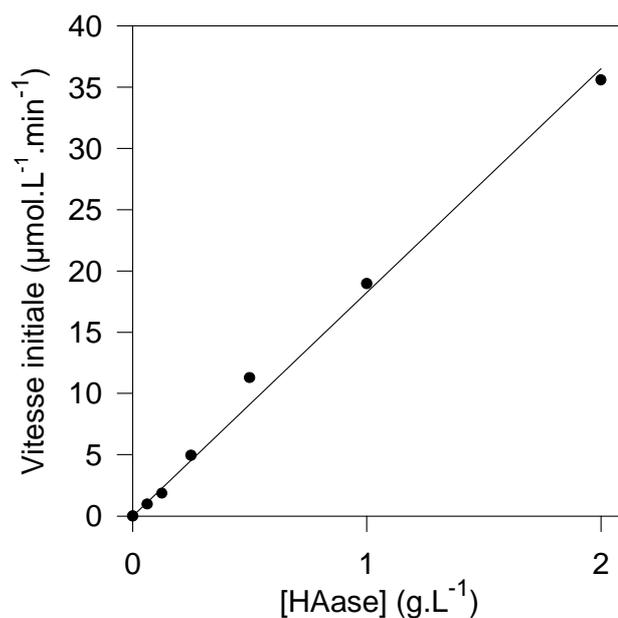


Figure 47 : Enzyme-dépendance à pH 4 et en présence de force ionique pour une concentration de HA de 3,5 g.L⁻¹ (Tranchepain, 2004)

Ces essais sont réalisés avec du HA natif bactérien dont la masse molaire moyenne en poids avoisine $2.10^6 \text{ g.mol}^{-1}$ et de la HAase de venin d'abeille. Lorsque la force ionique est fixée à 0.15 mol.L^{-1} , la substrat-dépendance (Figure 45) est de type Michaëlis-Menten jusqu'à une concentration en HA de 2 g.L^{-1} et l'enzyme-dépendance (Figure 46) présente une évolution de vitesses initiale linéaire en fonction de la concentration. En revanche, en absence de sel, un comportement atypique est observé. Tout d'abord, sur toute la gamme de concentration en HA utilisée, nous observons une vitesse initiale de réaction plus faible qu'avec une force ionique de $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$. De plus, lorsque nous augmentons la concentration en HA, la vitesse initiale de réaction augmente jusqu'à atteindre un maximum et diminue. Le même type de courbe est observé pour une force ionique fixée à $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$. Ce phénomène est attribué à de la complexation électrostatique existant entre le HA, qui est un polyanion à ce pH, et la HAase chargée positivement. Avec ajout de sel, ce phénomène est également observé mais de façon moindre au-delà de $3,5 \text{ g.L}^{-1}$. L'ajout de sel n'est probablement pas suffisant pour écranter les charges négatives du HA ainsi que les charges positives de la HAase.

I.A.3. Influence de la force ionique

Nous avons vu l'importance de la force ionique lors de la réaction et des phénomènes qui lui sont associés. Il est donc également important d'étudier l'évolution de la vitesse initiale de réaction en fonction de la force ionique.

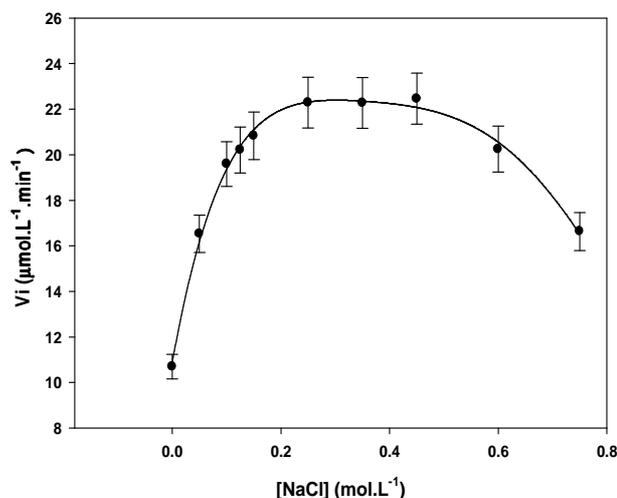


Figure 48 : force ionique-dépendance de la réaction d'hydrolyse du HA à 1 g.L^{-1} catalysée par la HAase de venin d'abeille à $0,2 \text{ g.L}^{-1}$. (Levasseur, 2006)

La figure 48 montre un effet significatif de la force ionique sur la réaction d'hydrolyse avec une activité enzymatique maximale pour des concentrations en sel comprises entre 0,15 et 0,45 mol.L⁻¹. Au-delà de ce domaine, nous observons qu'une augmentation de la force ionique tend à diminuer la vitesse initiale d'hydrolyse. Un excès de force ionique ne semble pas favoriser l'hydrolyse enzymatique du HA.

I.A.4. Influence du pH

La figure 49, présentant la pH-dépendance de la HAase avec une force ionique fixée à 0,15 mol.L⁻¹, montre que la vitesse initiale d'hydrolyse est maximale pour une gamme de pH acide centrée autour de 4.

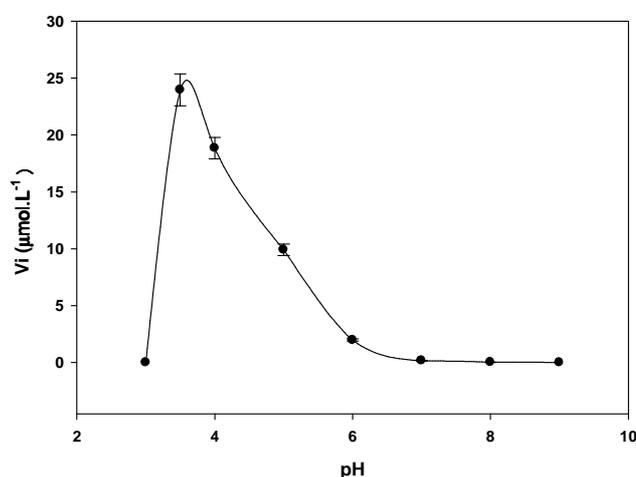


Figure 49 : pH-dépendance de la réaction d'hydrolyse du HA 1 g.L⁻¹ catalysée par la HAase de venin d'abeille 0,2 g.L⁻¹ avec une concentration en NaNO₃ égale à 0,15 mol.L⁻¹ (Levasseur, 2006)

Dans cette gamme de pH, la complexation électrostatique peut cependant exister car le pH est au-dessus du pKa de la fonction carboxyl qui est de 2,9 dans le cas du HA (Berriaud 1998). Cette valeur est beaucoup plus faible que celles des acides carboxyliques classiques (pKa entre 4 et 5). Le HA est donc sous forme carboxylate. Nous sommes également en dessous du pI estimé à 6,8 de la HAase (Astériou, 2002), donc sous forme de sel d'ammonium chargée positivement. Ceci montre l'importance de fixer la force ionique si nous souhaitons minimiser le phénomène de complexation lors de l'étape de production de fragments de HA. Il est également intéressant de noter qu'en dessous de pH 3 et au dessus de pH 6, la vitesse initiale est très faible.

I.B. Procédé d'arrêt de la réaction enzymatique

Pour mettre au point une méthode de production de fragments de HA de masse molaire souhaitée aussi précise et reproductible que possible, il est nécessaire que l'arrêt de la réaction soit rapide et total. Lorsque nous réalisons nos tests cinétiques, c'est-à-dire que nous sommes à l'échelle du millilitre, les prélèvements de milieu réactionnel sont chauffés à 100°C quelques minutes afin de stopper la réaction. Le chauffage n'est plus envisageable pour des volumes plus importants. C'est pourquoi une étude a été réalisée afin de déterminer une méthode rapide permettant l'arrêt de la réaction.

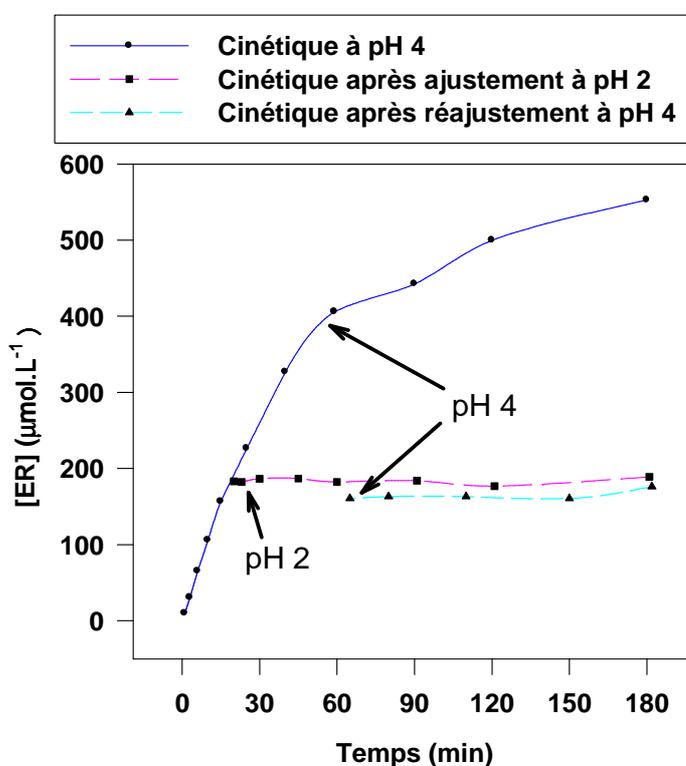


Figure 50 : Test de dénaturation à pH 2 de la HAase de venin d'abeille. $[HA] = 1 \text{ g.L}^{-1}$, $[HAase] = 0,2 \text{ g.L}^{-1}$. Superposition de 3 cinétiques : cinétique suivie à pH 4 ; après 20 minutes de réaction à pH 4, pH ajusté à 2 ; après 20 minutes de réaction à pH 4, puis 40 minutes à pH 2, pH réajusté à 4 (Levasseur, 2006).

L'étude de la pH-dépendance nous a montré qu'en dessous de pH 3, la vitesse initiale de la réaction d'hydrolyse est quasi nulle. L'objectif de l'étude présentée sur la figure 50 est de se placer à pH 2 lorsque nous souhaitons stopper la réaction enzymatique. Cette figure nous montre qu'à pH 2, la réaction est stoppée et de façon irréversible car même en réajustant le pH à 4, la réaction ne redémarre pas. La HAase

est irréversiblement dénaturée entraînant une perte de son activité enzymatique. En acidifiant notre milieu réactionnel pour atteindre un pH de 2, nous avons un moyen instantané de stopper de manière définitive la réaction d'hydrolyse enzymatique sans modifier le HA.

I.C. Récupération des fragments de HA par précipitation alcoolique

Il est à présent nécessaire de récupérer les fragments de HA du milieu réactionnel et de les purifier en les séparant de la HAase. Le procédé utilisé est un procédé d'extraction alcoolique en milieu aqueux (éthanol/eau : 80/20) contenant du NaCl à $0,15 \text{ mol}^{-1}$ afin de faciliter la précipitation des fragments de HA par « salting out ». Le rapport éthanol/eau choisi est le rapport optimal, c'est-à-dire qu'il permet la précipitation maximale des fragments. Cependant, il est important de noter que plus la masse molaire des fragments de HA est faible, plus la précipitation est difficile.



Figure 51 : Précipitation de HA hydrolysé par réaction enzymatique. Conditions de précipitation : éthanol/eau (80/20) (v/v) avec $[\text{NaCl}] = 0,15 \text{ mol.L}^{-1}$ dans la phase aqueuse.

Après inactivation de la HAase par acidification du milieu réactionnel, une quantité de NaCl est ajoutée pour ajuster la force ionique à $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$ dans le milieu réactionnel. Le volume nécessaire d'éthanol est ajouté par la suite. Le mélange

représenté par la figure 51 est laissé une nuit à 4°C puis filtré sur büchner afin de récupérer les fragments de HA, sous forme de gel, séparés de la HAase qui est soluble dans le mélange eau/éthanol. Le précipité est remis en solution dans un minimum d'eau milli-Q pour être par la suite dialysé afin d'éliminer le sel en excès utilisé pour la précipitation.

I.D. Production de fragments de faible masse molaire ($20\ 000\ \text{g.mol}^{-1} < Mn < 50\ 000\ \text{g.mol}^{-1}$)

I.D.1. Conditions enzymatiques choisies

A partir des connaissances obtenues au cours des études antérieures menées au laboratoire sur des systèmes HA/HAase, nous devons déterminer les conditions d'hydrolyse permettant d'utiliser le HA natif à une concentration la plus élevée possible afin de produire des fragments en grande quantité, d'utiliser une concentration en HAase aussi faible que possible, à cause d'une part du coût élevé de l'enzyme et d'autre part afin de faciliter l'élimination de l'enzyme. Il est également nécessaire d'avoir une cinétique où la vitesse d'hydrolyse est assez faible au moment de stopper la réaction afin d'obtenir une masse molaire de HA la plus reproductible possible.

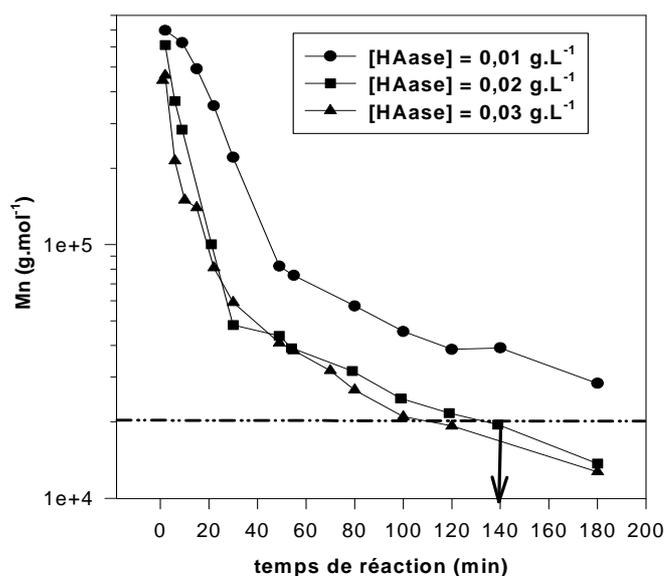


Figure 52 : Evolution de la Mn du HA déterminée par la méthode de Reissig, lors de l'hydrolyse du HA natif à $5\ \text{g.L}^{-1}$ catalysée par la HAase de venin d'abeille à différentes concentrations, avec une concentration de NaCl à $0,15\ \text{mol.L}^{-1}$ et à pH 4.

La masse molaire des fragments de HA que nous souhaitons obtenir étant faible, nous choisissons de nous placer à pH 4 qui est, comme nous l'avons vu précédemment (partie I. A. 4.), proche du pH optimum et une concentration en NaCl de $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$ pour fixer une force ionique permettant une gamme de vitesse initiale de réaction optimale (partie I. A. 2.). Pour respecter les critères en termes de concentration du substrat et de l'enzyme, nous avons choisi une concentration en HA égale à 5 g.L^{-1} . Au delà de cette concentration, la viscosité des solutions initiales de HA devient trop importante et des problèmes d'homogénéité et d'agitation peuvent apparaître. La figure 8 présente des cinétiques tests réalisées pendant trois heures pour choisir la concentration de HAase la mieux appropriée. A une concentration de $0,01 \text{ g.L}^{-1}$, nous n'obtenons pas la masse molaire souhaitée au départ dans le temps de l'étude. En augmentant la concentration à $0,02$ et $0,03 \text{ g.L}^{-1}$, nous atteignons la masse molaire souhaitée au bout de deux heures. De plus, la vitesse d'hydrolyse atteinte est très faible. Nous conservons donc la concentration la plus faible des deux nous permettant d'atteindre $20\ 000 \text{ g.mol}^{-1}$. Les conditions de l'hydrolyse enzymatique pour la production de fragments de HA dont la masse molaire est centrée sur $20\ 000 \text{ g.mol}^{-1}$ ont donc été définies ainsi :

$$[\text{HA}] = 5 \text{ g.L}^{-1} ; [\text{HAase}] = 0,02 \text{ g.L}^{-1} ; [\text{NaCl}] = 0,15 \text{ mol.L}^{-1} ; \text{pH} = 4$$

Pour confirmer les résultats obtenus par la méthode de Reissig, des prélèvements de milieu réactionnel ont été analysés par couplage SEC/RI.

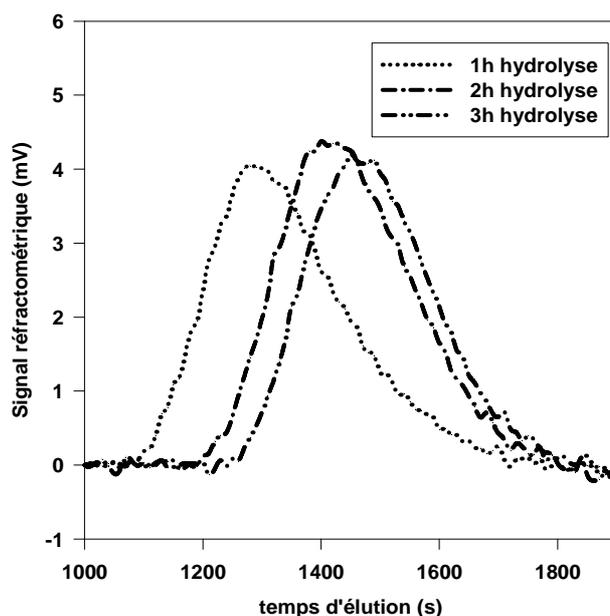


Figure 53 : Profils réfractométriques du HA déterminée par SEC/RI, lors de l'hydrolyse du HA natif à 5 g.L^{-1} catalysée par la HAase de venin d'abeille à $0,02 \text{ g.L}^{-1}$, avec une concentration de NaCl à $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$ et à pH 4.

La figure 53 présente les signaux réfractométriques obtenus à partir de prélèvements de milieu réactionnel effectués toutes les heures de la réaction d'hydrolyse dans les conditions choisies précédemment. Ces signaux nous montrent qu'après 2 heures de réaction, la vitesse d'hydrolyse diminue de façon importante car l'écart entre les signaux à 2 et 3 heures de réaction est faible. Ceci confirme les résultats obtenus par la méthode de Reissig.

Temps d'hydrolyse	1h	2h	3h
Mn par SEC/RI (g.mol ⁻¹)	46 000	21 700	19 600
Ip	3,4	2,5	1,7
Mn par Reissig (g.mol ⁻¹)	41 000	19 500	17 000

Tableau 1 : Evolution de la \overline{Mn} du HA déterminée par SEC/RI et par la méthode de Reissig, lors de l'hydrolyse du HA natif à 5 g.L⁻¹ catalysée par la HAase de venin d'abeille à 0,02 g.L⁻¹, avec une concentration de NaCl à 0,15 mol.L⁻¹ et à pH 4.

Le tableau 1 montre que les valeurs de \overline{Mn} obtenues par couplage SEC/RI sont très proches de celles obtenues par la méthode de Reissig. La faible différence de masse molaire entre les prélèvements effectués à 2h et 3h de réaction confirme également la faible vitesse de réaction.

Dans l'étape de production destinée à obtenir une quantité importante de fragments pour les études suivantes, nous avons utilisé 1,25 g de HA natif soit 125 mL de solution mère à 10 g.L⁻¹, 7,5 mL de solution de NaCl à 5 mol.L⁻¹, 5 ml de solution de HAase à 1 g.L⁻¹ et 112,5 mL d'eau milli-Q à pH 4. La réaction est ensuite stoppée en ajoutant 6 mL d'acide chlorhydrique à 1 mol.L⁻¹ nous permettant d'atteindre un pH égal à 2, puis nous ajoutons 1,024 L d'éthanol pour obtenir le précipité précédemment décrit.

I.D.2. Analyse des fragments de HA obtenus

Deux productions de fragments de HA ont été réalisées et des analyses par SEC/MALLS ont été effectuées après purification par précipitation alcoolique. Une solution de 1 g.L^{-1} de chaque production de HA a été injectée en milieu LiNO_3 $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$.

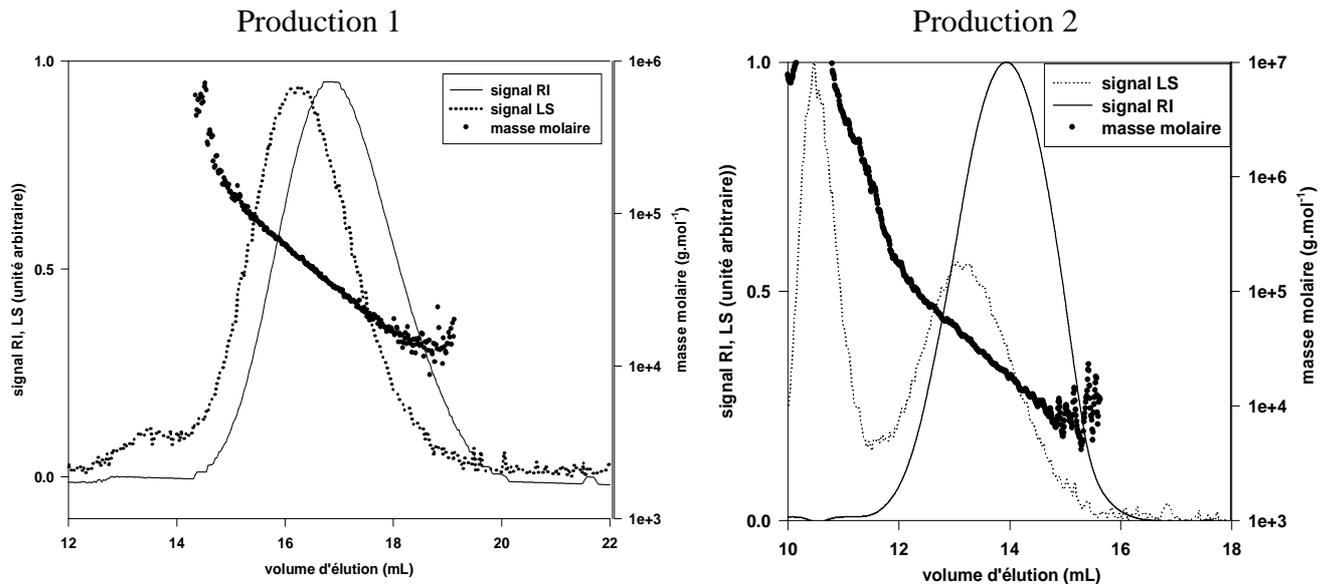


Figure 54 : Profils d'élution réfractométrique (proportionnel à la concentration) et de diffusion de lumière (90°) (proportionnel à la concentration et à la masse molaire) de fragments de HA produits par hydrolyse enzymatique $[\text{HA}] = 1 \text{ g.L}^{-1}$ en milieu LiNO_3 $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$

Le signal LS observé par la figure 54 indique la présence dans les deux échantillons analysés de deux populations. La présence de la première population située vers les plus faibles volumes d'élution est très peu marquée pour la production 1 et davantage visible pour la production 2. Cette première population n'apparaît pas sur le signal RI de chacune des productions. Il y a donc présence d'une très faible quantité d'agrégats. La deuxième population élue vers les volumes d'élution les plus forts, est visible sur les signaux LS et RI. La deuxième population constitue la majorité du produit pour les deux productions analysées. L'analyse du signal RI permet de vérifier que 85% du produit injecté a été caractérisé. De telles pertes sont classiques dans des analyses de ce type et ne témoignent pas d'une rétention particulière du produit.

	Production 1	Production 2
Mn (g.mol ⁻¹)	28 200	22 600
Mw (g.mol ⁻¹)	40 900	39 900
Ip	1,5	1,8

Tableau 2 : Détermination de la Mn, Mw et Ip obtenues par analyse SEC/MALLS des productions de fragments de HA de faibles masses molaires
Intégration de la population majoritaire : production 1 entre 11,5 et 14,6 mL ; production 2 entre 14,1 et 18,9 mL

La \overline{Mn} est légèrement plus élevée que celle déterminée lors des analyses des prélèvements des cinétiques test et l'indice de polymolécularité est plus faible. Cet écart de \overline{Mn} s'explique très probablement par le fait que la précipitation alcoolique ne permet pas de précipiter les chaînes de HA les plus petites. La \overline{Mn} obtenue est donc très proche de celle souhaitée au départ.

Une fois les fragments de HA purifiés et caractérisés, ils seront utilisés pour être modifiés chimiquement par un procédé d'estérification.

I.E. Production de fragments de Mn forte > 300 000 g.mol⁻¹

I.E.1. Conditions enzymatiques choisies

Nous avons réalisé des cinétiques tests afin de déterminer les conditions enzymatiques adéquates pour obtenir des fragments de HA de masse molaire élevée proche de 300 000 g.mol⁻¹. Ces essais sont résumés dans la figure 55.

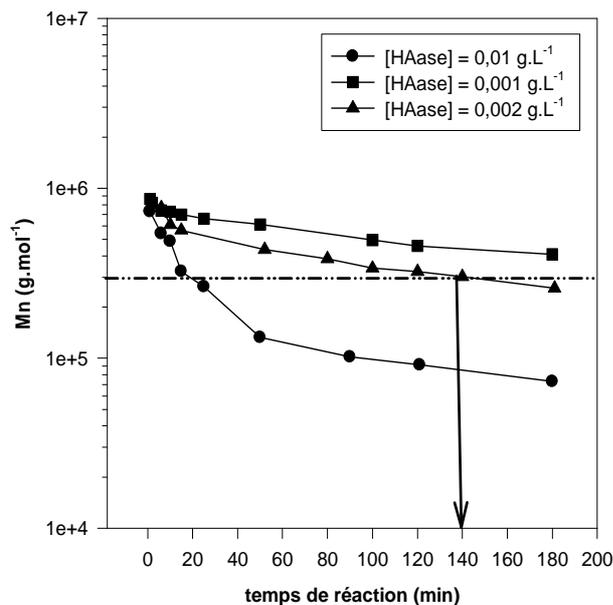


Figure 55 : Evolution de la Mn du HA déterminée par la méthode de Reissig, lors de l'hydrolyse du HA natif à 5 g.L⁻¹ catalysée par la HAase de venin d'abeille à différentes concentrations et à pH 4.

La concentration de HA reste la même que précédemment car elle doit toujours être la plus élevée possible pour augmenter au maximum la production. Le pH est également conservé proche du pH optimum c'est-à-dire à 4. Il nous reste donc à fixer la concentration en sel et en HAase. Nous avons, tout d'abord, choisi de ne pas ajouter de sel au milieu réactionnel afin de diminuer le plus possible la vitesse de réaction car la masse molaire que nous souhaitons implique une très faible dégradation du HA natif. La figure 55 nous montre qu'il est également nécessaire de diminuer de façon importante la concentration en HAase. A une concentration de 2.10⁻³ g.L⁻¹ en HAase, la masse molaire souhaitée est obtenue au bout d'environ deux heures de réaction. La vitesse de réaction d'hydrolyse est faible mais il est cependant difficile d'atteindre un palier avec des masses molaires aussi importantes. Les conditions de l'hydrolyse enzymatique pour la production de fragments de HA dont la masse molaire est centrée sur 300 000 g.mol⁻¹ ont donc été définies ainsi :

$$[HA] = 5 \text{ g.L}^{-1} ; [HAase] = 0.002 \text{ g.L}^{-1} ; [NaCl] = 0 ; \text{pH} = 4$$

Lorsque nous passons à l'étape de production, nous avons utilisé, pour obtenir une quantité importante de fragments pour les études suivantes, 1,25 g de HA natif soit 125 ml de solution mère à 10 g.L⁻¹, 5 ml de solution de HAase à 0,1 g.L⁻¹ et 120

ml d'eau milli-Q à pH 4. La réaction est donc stoppée en ajoutant 6 mL d'acide chlorhydrique à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ nous permettant d'atteindre un pH de 2, puis nous ajoutons 2,19 g de NaCl pour atteindre une concentration de $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$ nécessaire pour l'étape de précipitation. Enfin, nous ajoutons 1,06 L d'éthanol pour obtenir le précipité précédemment décrit.

I.E.2. Analyse des fragments de HA obtenus

Des analyses par SEC/MALLS/RI ont été effectuées après purification par précipitation alcoolique des fragments de HA. Une solution de $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de HA a été injectée en milieu LiNO_3 $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$.

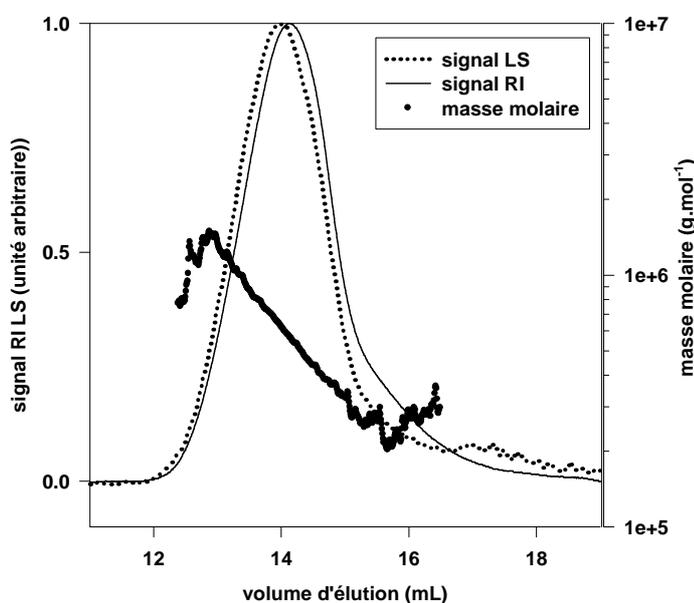


Figure 56 : Profil d'éluion réfractométrique et de diffusion de lumière (90°) de fragments de HA obtenus par hydrolyse enzymatique $[\text{HA}] = 0,5 \text{ g.L}^{-1}$ en milieu LiNO_3 $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ Intégration entre 12,5 et 15 mL

La figure 56 montre une seule population. Comme précédemment l'analyse du signal RI permet de vérifier que 85% du produit injecté a été caractérisé. Les valeurs obtenues en terme de masse molaire sont les suivantes : $\overline{Mn} = 494\,000 \text{ g.mol}^{-1}$; $\overline{Mw} = 618\,000 \text{ g.mol}^{-1}$; $I_p = 1,3$. La \overline{Mn} obtenue est plus élevée que celle souhaitée déterminée lors des cinétiques test. Cet écart est plus important que l'écart observé lors de la production des fragments de $30\,000 \text{ g.mol}^{-1}$. Il peut être expliqué par le fait que la vitesse de réaction d'hydrolyse était trop importante pour obtenir une bonne reproductibilité de masse molaire au moment de stopper la réaction d'hydrolyse.

Ces fragments de HA purifiés et caractérisés seront modifiés chimiquement par une méthode d'estérification.

II. Synthèse et caractérisation chimique des esters de hyaluronane

II.A. Conditions de synthèse des esters de hyaluronane

Des études précédemment menées au laboratoire, ont concerné l'estérification de la fonction acide carboxylique de fragments de HA de 30 000 g.mol⁻¹ (Levasseur, 2006). Les premiers résultats étant intéressants, il nous est apparu important de poursuivre dans cette voie et d'estérifier également des fragments de HA de masse molaire plus élevée pour étudier l'influence de cette \overline{Mn} . Nous avons donc choisi d'estérifier nos fragments de 30 000 g.mol⁻¹ et de 500 000 g.mol⁻¹, que nous nommerons respectivement dans la suite de ce manuscrit HA 30 et HA 500, avec des chaînes alkyle allant du méthyle l'octyle et en faisant varier le taux d'estérification. La voie de synthèse utilisée est décrite en détail dans la partie Matériels et Méthodes. Les principales étapes de cette synthèse sont suivies par spectrométrie infra rouge.

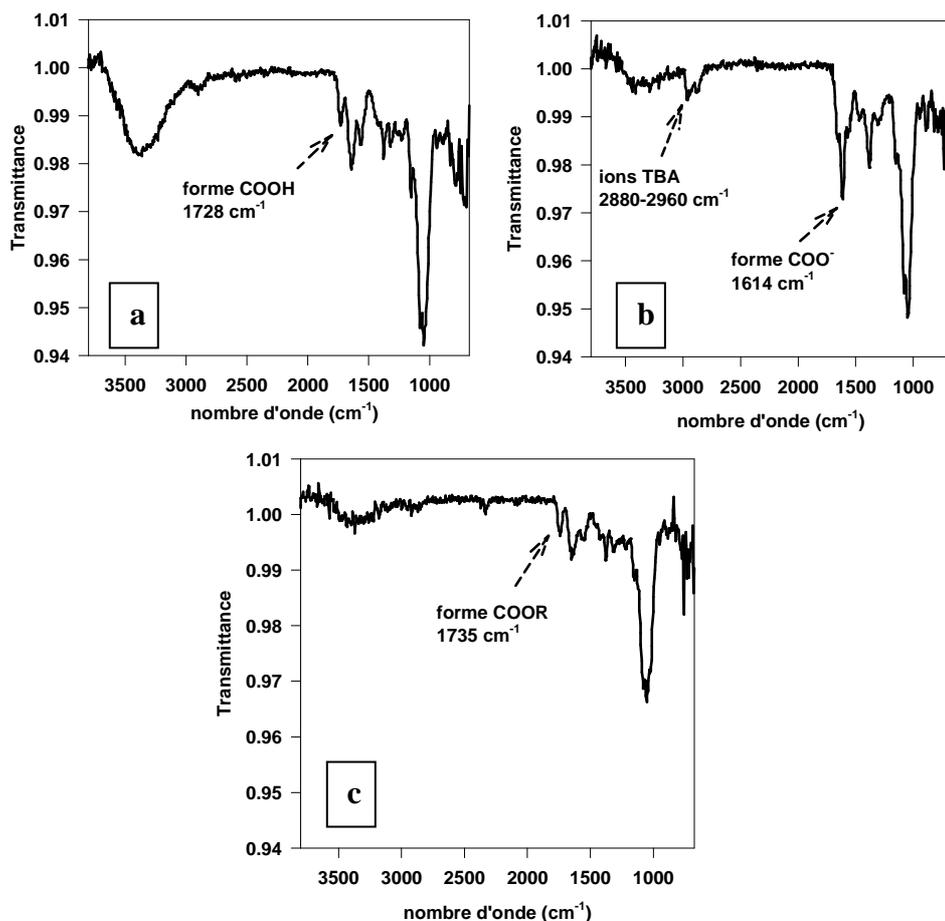


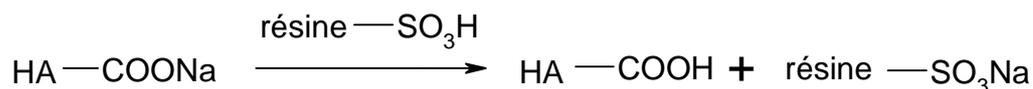
Figure 57 : Spectres FT-IR de fragments de HA sous forme solide résumant les principales étapes de la méthode d'estérification

a : précurseur sous forme acide

b : précurseur sous forme de sel de tétrabutylammonium (TBA)

c : forme estérifiée

La figure 57 présente les spectres FT-IR du HA lors des trois grandes étapes de la méthode d'estérification utilisée. Nous vérifions tout d'abord, la présence de la fonction acide carboxylique en observant un pic caractéristique situé à 1728 cm^{-1} (spectre A). Après passage des fragments de HA 30 et de HA 500 sodique sur une résine échangeuse de cations :



La neutralisation par hydroxyde de tétrabutylammonium est également vérifiée par la présence d'une bande caractéristique de la fonction carboxylate située à 1614 cm^{-1} (spectre B) et par la disparition de la bande de 1728 cm^{-1} :



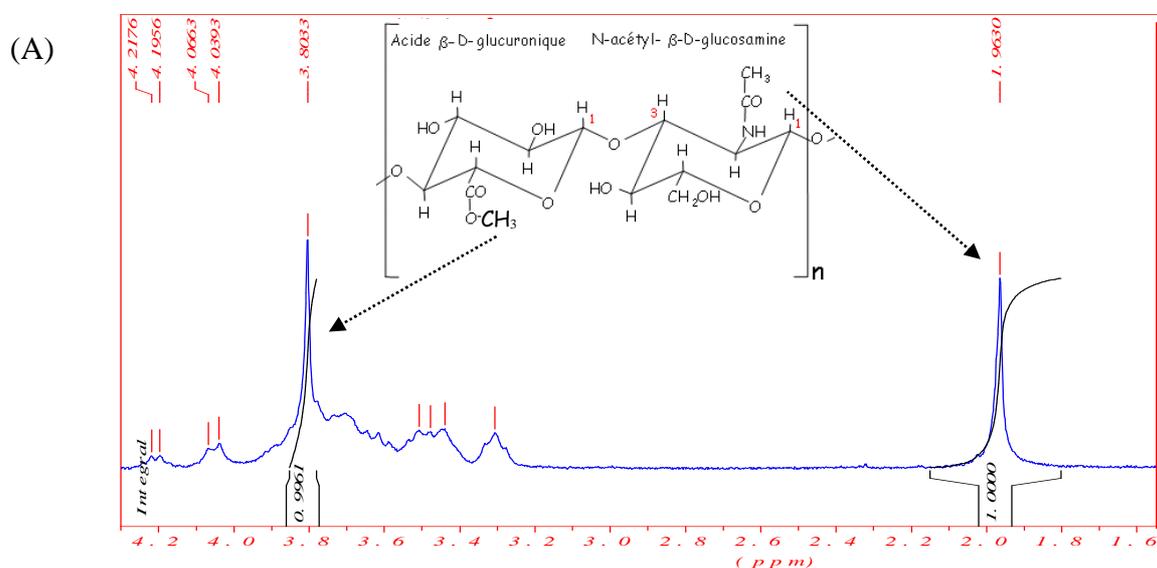
De plus, nous constatons la présence des cations tétrabutylammonium en observant des bandes caractéristiques du CH alkyle entre 2880 et 2960 cm^{-1} . Enfin, la dernière étape, c'est-à-dire l'étape d'estérification est visualisée par la présence de la bande caractéristique de la fonction ester située à 1735 cm^{-1} (spectre C) :



Enfin nous constatons aussi l'efficacité de la dialyse puisque nous observons la disparition des bandes correspondant aux ions tétrabutyl ammonium. Cette méthode nous a permis d'évaluer qualitativement la réussite de l'estérification des fragments de HA.

II.B. Détermination du taux d'estérification des fragments de HA

Pour déterminer les taux d'estérification des fragments de HA 30 et HA 500, nous avons privilégié des méthodes n'utilisant que peu de produit car les quantités d'esters synthétisés sont assez faibles. Elles sont comprises entre 100 et 150 mg selon les esters. Nous envisageons donc de déterminer le taux d'estérification par RMN. Cette méthode non destructible ne nous fait utiliser que 5 mg d'échantillon. Des spectres RMN ^1H ont été réalisés sur chacun des esters et présentent les pics caractéristiques du HA estérifié. Un exemple de spectre de chaque chaîne alkyle greffée, est présenté sur la figure 58.



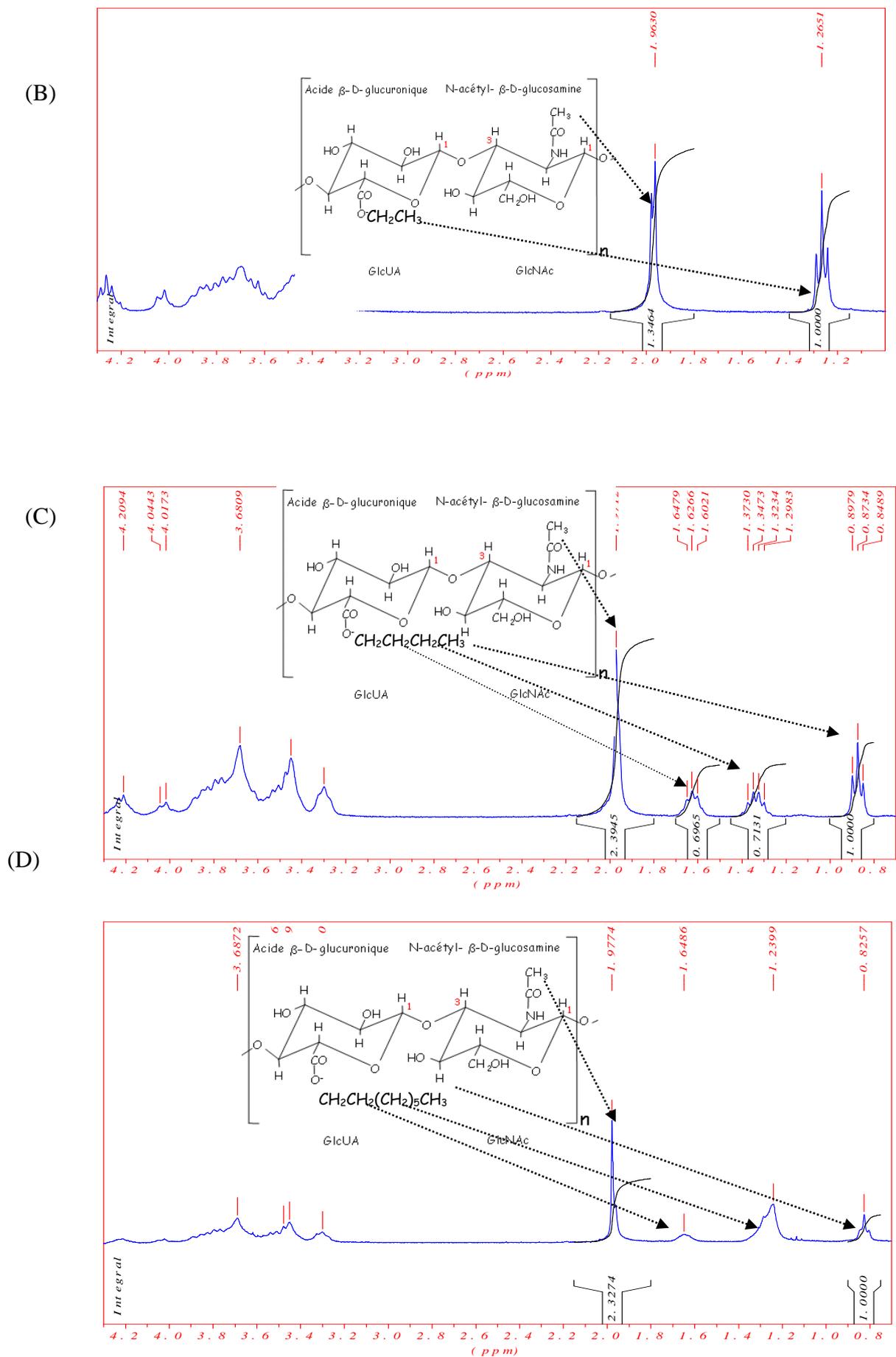


Figure 58 : Spectres ^1H -RMN dans le D_2O d'esters de HA méthylé (A), éthylé (B), butylé (C) et octylé (D), $[\text{HA}] = 5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

A partir de ces spectres, il est possible de déterminer le taux d'estérification des esters de HA par étalonnage interne en effectuant le rapport entre l'intégration d'un pic de référence du HA et celle d'un pic dû à la formation de l'ester. Le pic de référence choisi est le singulet situé à 2 ppm correspondant au groupement CH₃ de la fonction N-acétyl glucosamine car cette fonction n'est pas modifiée par la réaction d'estérification. Le pic dû à la formation de l'ester est le triplet correspondant au groupement CH₃ situé pour la chaîne éthyle à 1,3 ppm, pour la chaîne butyle à 0,9 ppm et pour la chaîne octyle à 0,8 ppm. Concernant la chaîne méthyle, le singulet correspondant au groupement CH₃ est très déblindé par rapport à ceux des autres chaînes alkyle puisqu'il est directement lié à l'oxygène. Il est situé vers 3,8 ppm dans la zone des protons polysaccharidiques. Il n'est pas parfaitement isolé et cela rend l'intégration de ce singulet très imprécise. D'autres chercheurs (Hirano *et al.* 2005) ont utilisé cette méthode pour déterminer le taux d'estérification d'esters de HA fortement méthylés allant jusqu'à 100%. Cependant il ne peut s'agir que de taux d'estérification approximatifs puisqu'il est apparu difficile d'obtenir une intégration correcte du singulet. Les taux d'estérification pour les deux esters méthylés seront donc déterminés par un dosage conductimétrique en suivant la méthode d'Eyler (Eyler *et al.* 1947), méthode de routine employée au laboratoire. Elle nécessite trois fois plus de produit que la RMN soit environ 15 mg par dosage. Cette méthode nous permet de doser, par ajout d'acide chlorhydrique, les fonctions carboxylates non estérifiées et donc d'obtenir indirectement le taux des fonctions estérifiées. Les taux d'estérification obtenus pour l'ensemble des esters préparés sont résumés dans le tableau 1

Fragments de HA	Type de chaîne greffée	Taux d'estérification souhaité	Taux d'estérification obtenu ($\pm 5\%$)
HA 23	méthyle*	40%	44%
	éthyle	40%	41%
		60%	54%
		80%	67%
		95%	75%
	butyle	40%	41%
	octyle	40%	40%
HA 28	octyle	5%	4%
		10%	13%
		20%	18%
		40%	38%
HA 500	méthyle*	40%	41%
	éthyle	40%	42%
	butyle	40%	41%
	octyle	5%	3%
		10%	13%
		20%	20%
		40%	insoluble

Tableau 3 : Taux d'estérification des esters de HA obtenus par RMN et par conductimétrie (*) pour la chaîne méthyleet comparaison avec les valeurs souhaitées.

Pour les valeurs de taux d'estérification souhaitées entre 10 et 40%, les valeurs obtenues expérimentalement sont très proches de celles souhaitées. Pour les taux les plus faibles, les valeurs obtenues sont plus faibles. Ceci peut être expliqué par les faibles volumes de solution d'halogénure d'alkyle induits par la faible valeur de taux d'estérification souhaitée. L'incertitude associée à ces faibles volumes est importante. Nous observons également que pour les taux supérieurs à 40%, les valeurs sont inférieures à celles souhaitées probablement dû à une hydrolyse partielle pendant la dialyse.

Concernant la masse molaire des fragments de HA utilisés pour l'estérification, nous constatons qu'il est possible d'estérifier des chaînes de HA 500 à des taux importants proches de ceux souhaités. Pour obtenir des spectres RMN ^1H de qualité comparable à ceux obtenus pour les fragments plus courts, nous avons dû augmenter le temps d'accumulation. Nous remarquons que jusqu'à un taux d'estérification de 20% en chaîne octyle, l'ester obtenu est soluble dans l'eau, ce qui

est nécessaire pour effectuer l'étude de la réaction d'hydrolyse enzymatique catalysée par la HAase. Tous les esters synthétisés à partir du HA 500 sont solubles dans l'eau excepté le HA 500 C8 40% que nous avons synthétisé mais pas utilisé pour la réaction enzymatique.

III. Caractérisation physico-chimique des esters de HA

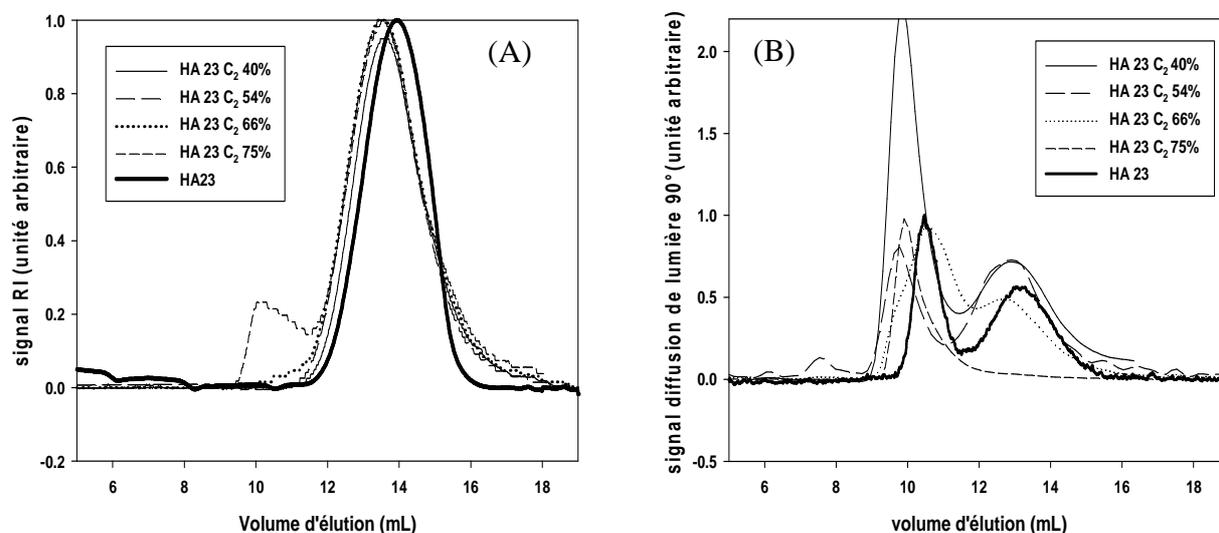
Dans cette troisième partie, nous allons caractériser les différents échantillons présentés dans le chapitre précédent par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) ou par flux-force couplé à deux détecteurs de diffusion de la lumière multi angle (MALLS) et réfractométrie différentiel (DRI).

III.A. Analyse par couplage SEC/MALLS

III.A.1. Esters obtenus à partir de HA 23 et HA 28

Les analyses sont effectuées sur colonne TSK-Gel PWxl. Les résultats vont être étudiés en fonction du taux d'estérification et de la longueur de la chaîne alkyle pour les différents esters.

III.A.1.a. Influence du taux d'estérification (chaîne éthyle)



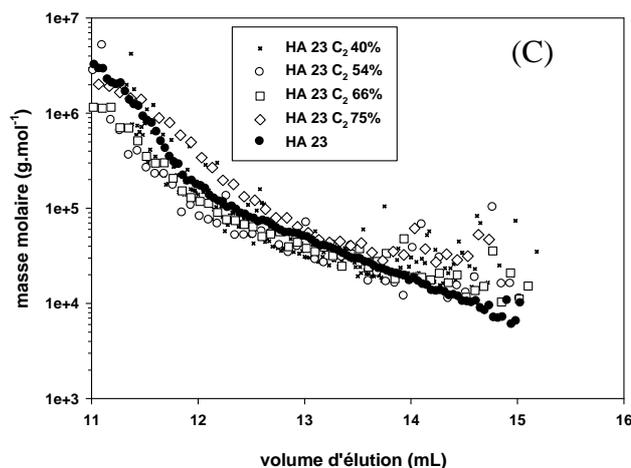


Figure 59 : Profils d'élution réfractométriques (A) de diffusion de lumière (90°) (B) distribution des masses molaires (C) déterminés par SEC/MALLS/RI, $[HA] = 1 \text{ g.L}^{-1}$, en solution dans l'eau milliQ filtration $0,45 \mu\text{m}$

La figure 59 est décomposée en trois parties. La partie A présente les signaux réfractométriques (DRI) proportionnels à la concentration en esters de HA. La partie B présente les signaux de diffusion de lumière (LS) proportionnels à la masse molaire et à la concentration. La partie C présente l'évolution des masses molaires déterminées pour chaque fraction préalablement séparée par chromatographie. Les signaux LS mettent en évidence dans tous les échantillons l'existence de deux populations. Ceci nous permet de comparer les profils chromatographiques des esters de HA éthylés à 41 ; 54 ; 66 et 75% avec celui du fragment précurseur HA 23. Pour les taux d'estérification allant de 40% à 66%, la population 1 est située entre 9 et 12 mL et la population 2 est située entre 12 et 16 mL sur le signal de LS (figure 59 B). La réponse du signal DRI (figure 59 A) présente une seule population entre 12 et 16 mL. La population 2 représente donc la majorité de l'échantillon injecté. La présence de la population 1 indique une quantité négligeable d'agrégats pour le HA 23 ainsi que pour les esters comparés. Les calculs de masses molaires ont été effectués uniquement sur la population 2 entre 12 et 16 mL (tableau 4 discuté page suivante).

Pour les taux d'estérification inférieurs à 75%, les profils DRI sont quasiment superposables au HA 23 précurseur avec une légère translation de la réponse vers les volumes d'élution plus faibles. L'analyse du signal DRI nous permet de vérifier qu'entre 80 et 83% du produit est analysé ce qui montre que ces analyses sont représentatives des échantillons.

La réponse DRI du HA 23 C₂ 75% diffère de façon importante de ceux des autres esters éthylés puisque la population 1 apparaît sur le signal RI. Ce signal a été analysé et les résultats sont les suivants : $\overline{Mn} = 3,2 \cdot 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$ ($\pm 10\%$) ; $\overline{Mw} = 5,2 \cdot 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$ ($\pm 15\%$) ; $I_p = 1,6$ ($\pm 18\%$). Ce signal représente 8% du produit analysé. Nous attribuons cela à la présence d'agrégats formés par des associations hydrophobes de type intermoléculaire en quantité assez importante pour apparaître sur la réponse DRI. De plus, l'évolution de la masse molaire ne se superpose pas parfaitement avec celles des autres esters et du précurseur. Elle est légèrement supérieure ce qui montre une structure plus compacte. Les populations 1 et 2 n'étant pas parfaitement séparées, il est possible qu'une faible quantité des agrégats soient analysée dans la population 2 ce qui engendrerait donc une augmentation importante de la Mn et de la Mw. Nous observons également que, comme pour les autres échantillons, l'évolution de masses molaires n'est pas linéaire en fin d'éluion en raison des très faibles réponses des détecteurs.

Fragments de HA	Mn (g.mol⁻¹)	Mw (g.mol⁻¹)	I_p	DP_n apparent
HA 23	22 600	39 900	1,8	56
HA 23 C₂ 41%	25 000	37 900	1,5	62
HA 23 C₂ 54%	25 600	36 700	1,5	64
HA 23 C₂ 66%	29 000	37 500	1,3	72
HA 23 C₂ 75%	43 000	81 100	1,9	107

Tableau 4 : Détermination de la Mn, Mw et I_p des populations 2 obtenues par analyse SEC/MALLS des fragments d'esters de HA de faibles masses molaires

Les masses molaires reportées dans le tableau 4 montrent que la méthode d'estérification n'est pas dégradante puisque les DP_n ne sont pas inférieurs à celui du fragment précurseur de HA. L'augmentation des valeurs expérimentales de \overline{Mn} et de DP_n provient de la tendance de ces esters à l'agrégation. Concernant les \overline{Mw} , les valeurs expérimentales obtenues sont identiques de la valeur du précurseur excepté l'échantillon le plus substitué. Ces résultats montrent que d'augmenter le taux d'estérification en chaînes éthyle n'induit pas de changement important de comportement du HA en solution jusqu'à 66%.

Dans le cas du HA 23 C₂ 75%, les masses molaires moyennes sont surestimées de façon importante en raison de la présence d'agrégats. Il est donc difficile, dans ce cas d'accéder à la masse molaire de la chaîne isolée.

Cette étude permet de conclure que pour observer un changement de comportement en solution, il est nécessaire d'atteindre un taux d'estérification de 75% en chaînes éthyle. La présence d'associations hydrophobes devient très importante et induit la formation d'agrégats volumineux.

III.A.1.b. Influence du taux d'estérification (chaîne octyle)

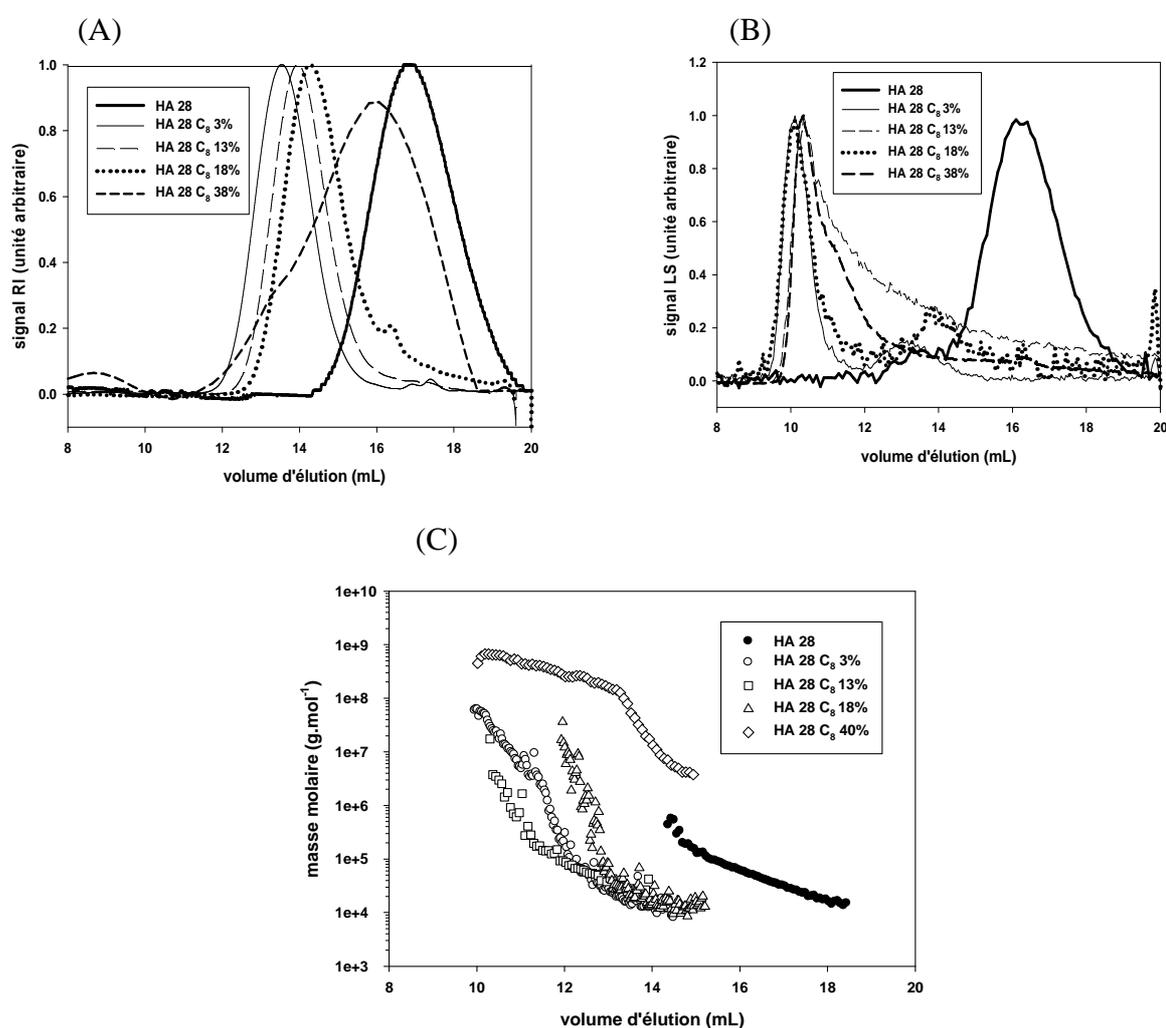


Figure 60 : Profils d'éluion réfractométriques (A) et de diffusion de lumière (90°) (B) avec la distribution des masses molaires (C) déterminés par SEC/MALLS/DRI, [HA] = 1 g.L⁻¹, en solution dans l'eau milliQ filtration 0,45 μm

La figure 60 est décomposée de la même manière que précédemment. Nous pouvons comparer les profils chromatographiques du fragment HA 28 précurseur et

ceux estérifiés en chaînes octyle à 3% ; 13% ; 18% où nous récupérons environ 80% de l'échantillon et 38% en chaînes octyle où nous récupérons 35% de l'échantillon. Les signaux LS (figure 60 B) des esters sont translatés de 5 mL vers les faibles volumes d'élution indiquant l'augmentation des volumes hydrodynamiques. Nous observons le même phénomène de translation sur les réponses DRI des esters (figure 60 A) avec un comportement très proche pour les trois taux d'estérification de 3%, 13% et 18%. Ceci montre que la formation d'agrégats volumineux (figure 60 C).

Le HA 28 C₈ 38% a un comportement différent. Son signal RI possède un pic majoritaire situé à un volume d'élution plus élevé que pour les autres esters. Nous observons également un épaulement à des volumes d'élution plus faibles. En parallèle, nous observons que les valeurs données par la distribution des masses molaires sont très supérieures non seulement à celles du précurseur mais également à celles des autres esters. Ceci suggère la formation d'agrégats de masse molaire élevée mais très compactes.

Les calculs de masses molaires ont donc été réalisés entre 12 et 15 mL pour les HA octylés et entre 15 et 18 mL pour le HA 28 précurseur et sont résumés dans le tableau 5.

Fragments de HA	Mn (g.mol ⁻¹)	Mw (g.mol ⁻¹)	Ip	DP _n apparent
HA 28	28 200 (8%)	40 200 (7%)	1,4 (10%)	70
HA 28 C₈ 3%	27 500 (20%)	45 000 (18%)	1,6 (27%)	68
HA 28 C₈ 13%	38 800 (21%)	50 100 (11%)	1,3 (22%)	94
HA 28 C₈ 18%	38 500 (29%)	52 400 (29%)	1,4 (41%)	92
HA 28 C₈ 38%	4 200 000 (2%)	4 600 000 (2%)	1,1 (3%)	9 611

Tableau 5 : Détermination de la Mn, Mw et Ip obtenues par analyse SEC/MALLS des fragments d'esters de HA de faibles masses molaires

Jusqu'à 18% d'estérification en chaînes octyle, les valeurs de \overline{Mn} et \overline{Mw} augmentent légèrement lorsque le taux d'estérification augmente mais restent proches de la valeur obtenue pour le précurseur.

Cependant, lorsque le taux d'estérification devient important comme dans le cas du HA 28 C₈ 38%, les \overline{Mn} et \overline{Mw} obtenues sont surestimées de façon importante. Il est donc impossible, dans ce cas d'accéder à la masse molaire de la chaîne isolée. Il

apparaît qu'en augmentant le taux d'estérification en chaîne octyle les interactions hydrophobes de type interchaînes soient prédominantes.

III.A.1.c. Influence de la longueur de la chaîne alkyle

Les figures 17 A, B et C permettent de comparer de la même manière que précédemment les esters de HA C₁, C₂, C₄ et C₈ greffés à 40% avec le précurseur.

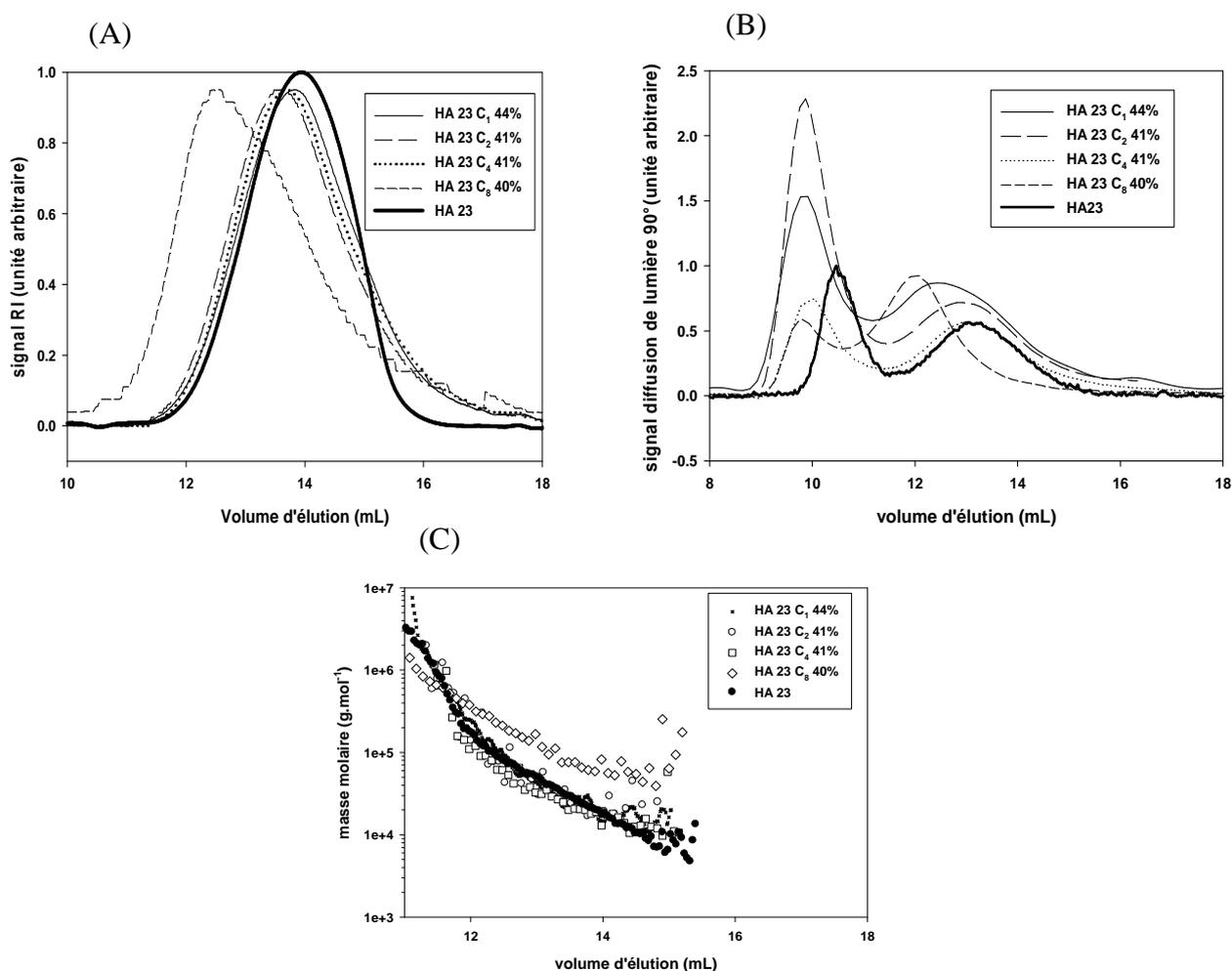


Figure 61 : Profils d'élution réfractométriques (DRI) (A) et de diffusion de lumière (LS) 90° (B) avec la distribution des masses molaires (C) déterminés par SEC/MALLS/RI, [HA] = 1 g.L⁻¹, en solution dans l'eau milliQ filtration 0,45 µm

Les signaux LS (figure 61 B) mettent en évidence, dans tous les échantillons, l'existence de deux populations. La population 1 (entre 9 et 12 mL) sur le signal LS n'apparaît pas sur le profil DRI (figure 61 A). En revanche, la population 2 (entre 12 et 16 mL) sur le signal LS présente un signal DRI bien identifié. La population 2 représente donc la majorité de l'échantillon injecté. La population 1 montre une

quantité négligeable d'agrégats pour le HA 23 ainsi que pour les esters. Les calculs de masses molaires ont été effectués uniquement entre 12 et 15 mL.

Concernant les esters méthyle, éthyle et butyle, les profils RI sont quasiment superposables au HA 23 précurseur avec une très légère translation du signal vers les volumes d'élution les plus faibles. L'analyse du signal RI nous permet de vérifier que comme pour le précurseur plus de 85% du produit est analysé excepté dans le cas du HA 23 C₈ 40% où seulement 33% du produit est analysé. La majorité de l'échantillon a donc été retenu à la filtration et correspond à des objets de très grandes tailles (> 0,45µm)

Les profils RI et LS du HA 23 C₈ 40 diffèrent de façon importante de ceux des autres esters. Ils sont translatés d'environ 2 mL vers les faibles volumes d'élution. L'évolution de la masse molaire ne se superpose pas avec celles des autres esters et du précurseur. Les valeurs obtenues sont donc beaucoup plus élevées que celle des autres échantillons. L'augmentation très importante de la Mn ainsi que la Mw est attribuée à des associations hydrophobes. Ces associations probablement de type intermoléculaire a engendré des agrégats en quantité importante. Il est donc impossible dans le cas de cet ester d'obtenir la \overline{Mn} et \overline{Mw} de la chaîne isolée.

Fragments de HA	Mn (g.mol⁻¹)	Mw (g.mol⁻¹)	Ip	DPn_{apparent}
HA 23	22 600	39 900	1,8	56
HA 23 C₁ 44%	22 800	40 400	1,8	57
HA 23 C₂ 41%	25 000	37 900	1,5	62
HA 23 C₄ 41%	21 000	29 900	1,4	51
HA 23 C₈ 40%	123 000	199 700	1,6	282

Tableau 6 : Détermination de la \overline{Mn} , \overline{Mw} et Ip des populations 2 obtenues par analyse SEC/MALLS des fragments d'esters de HA de faibles masses molaires

Les valeurs expérimentales de \overline{Mn} et \overline{Mw} obtenues sont proches de la valeur du précurseur. Ces résultats montrent que d'estérifier le HA avec des chaînes C₁, C₂ et C₄ à un taux d'estérification proche de 40% n'induit pas de changement important de comportement en solution.

Nous constatons une différence importante de résultats pour le HA 23 C₈ 38% et le HA 28 C₈ 40%. Pour ces systèmes très agrégatifs, les résultats dépendent très fortement des conditions de mise en solution et/ou de filtration.

III.A.1.d. Bilan

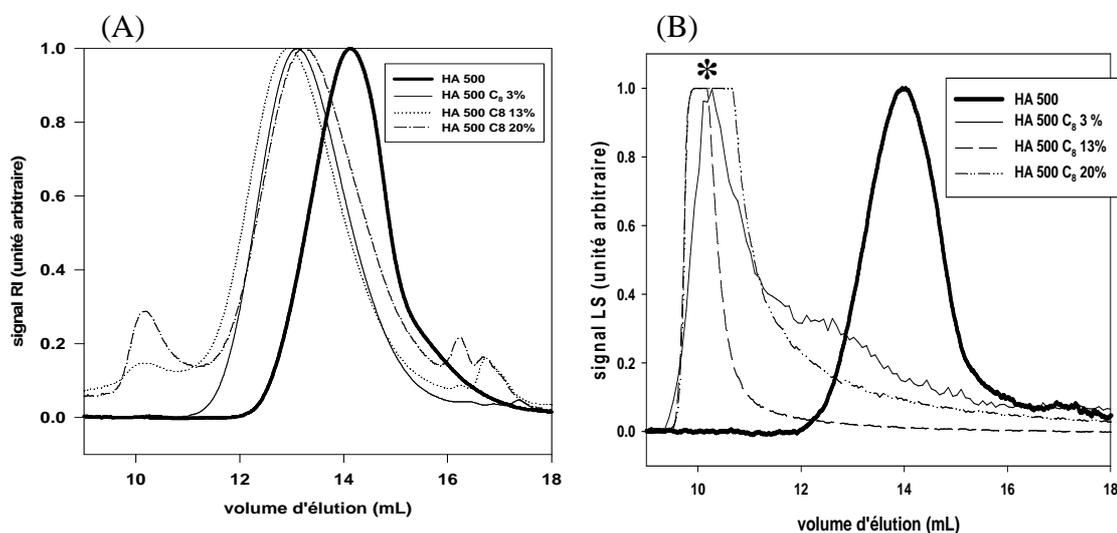
Cette étude a mis en évidence l'influence de la longueur de la chaîne alkyle ainsi que celle du taux d'estérification. Il semble qu'un changement de comportement soit induit par la valeur de la balance hydrophile lipophile. Dans le cas d'un fragment de HA d'environ $30\ 000\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, les interactions hydrophobes interchaînes amènent la formation d'agrégats en quantité non négligeable à partir de 40% en chaîne octyle ou pour 75% en chaîne éthyle. L'estérification avec une chaîne octyle engendre des agrégats de masse molaire plus importante que les autres chaînes alkyle utilisées. La chaîne octyle favorisant davantage les associations hydrophobes, les conformations obtenues semblent plus compactes.

Les agrégats n'ayant pu être séparés des chaînes isolées, les masses molaires de celle-ci n'ont pu être déterminées avec précision.

III.A.2. Esters obtenus à partir de HA 500

Des analyses par couplage SEC/MALLS similaires à celles effectuées avec les esters de faibles masses molaires ont été réalisées sur les esters préparés à partir du précurseur de HA 500 en utilisant les colonnes TSK-Gel PWxl. L'influence de la longueur de la chaîne alkyle et du taux d'estérification en chaînes octyle est étudiée en analysant les profils chromatographiques.

III.A.2.a. Influence du taux d'estérification (chaîne octyle)



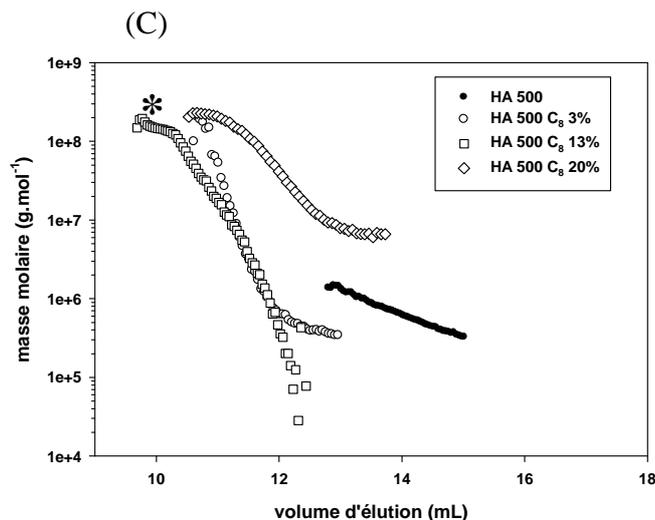


Figure 62 : Profils d'élution réfractométriques (A) et de diffusion de lumière (90°) (B) avec la distribution des masses molaires (C) déterminés par SEC/MALLS/RI , [HA] = 0,5 g.L⁻¹, en solution dans l'eau milliQ filtration 0,45 µm

* problème de saturation du signal LS

Sur la figure 62 B, nous observons une importante réponse en LS aux faibles volumes d'élution pour les trois échantillons modifiés montrant la présence d'agrégats volumineux. Si nous observons la réponse DRI associée (figure 62 A), nous constatons l'apparition d'une réponse lorsque le taux d'estérification augmente. Les masses molaires correspondantes (figure 62 C) sont très importantes mais ne peuvent pas être calculées en raison de la saturation des signaux LS.

Si nous observons à présent la réponse DRI des espèces éluées après 11 mL, nous constatons une translation vers les plus faibles volumes d'élution donc vers les plus forts volumes hydrodynamiques. Cette translation s'accompagne d'une augmentation des masses molaires. Nous avons donc très peu de chaînes isolées dans ces systèmes où l'auto association est prédominante.

Nous avons choisi, pour tous les esters octylés de déterminer les masses molaires entre 11 et 13 mL de volume d'élution en raison de la saturation du signal LS. Ces résultats sont présentés dans le tableau 7.

Fragments de HA	Mn (g.mol ⁻¹)	Mw (g.mol ⁻¹)	Ip	DPn _{apparent}	quantité détectée par le réfractomètre
HA 500	494 000 (9%)	618 000 (7%)	1,3 (11%)	1232	87%
HA 500 C₈ 3%	485 000 (25%)	532 000 (18%)	1,1 (30%)	1200	73%
HA 500 C₈ 13%	510 000 (35%)	874 000 (37%)	1,7 (40%)	1235	61%
HA 500 C₈ 20%	9 700 000 (2%)	15 200 000 (3%)	1,6 (4%)	23261	46%

Tableau 7 : Détermination de la Mn, Mw et Ip des HA 500 octylés obtenues par analyse SEC/MALLS des fragments d'esters de HA de fortes masses molaires entre 11 et 13 mL

L'analyse des fragments de HA 500 C₈ 3% et HA 500 C₈ 13% montrent des valeurs de \overline{Mn} identiques à celle du précurseur HA 500. Les valeurs obtenues pour les \overline{Mw} augmentent avec le taux d'estérification. Concernant le HA 500 C₈ 20%, la \overline{Mn} est très élevée par rapport au précurseur HA 500 indique la capacité à l'auto association interchaînes pour cet échantillon. Il paraît impossible d'obtenir les masses molaires des chaînes isolées dans le cas de l'ester HA 500 C₈ 20%.

La taille des agrégats étant de plus en plus élevée, la quantité d'échantillon détectée diminue avec l'augmentation du taux d'estérification. Ces agrégats volumineux sont retenus lors de l'étape de filtration.

III.A.2.b. Influence de la chaîne alkyle ajoutée

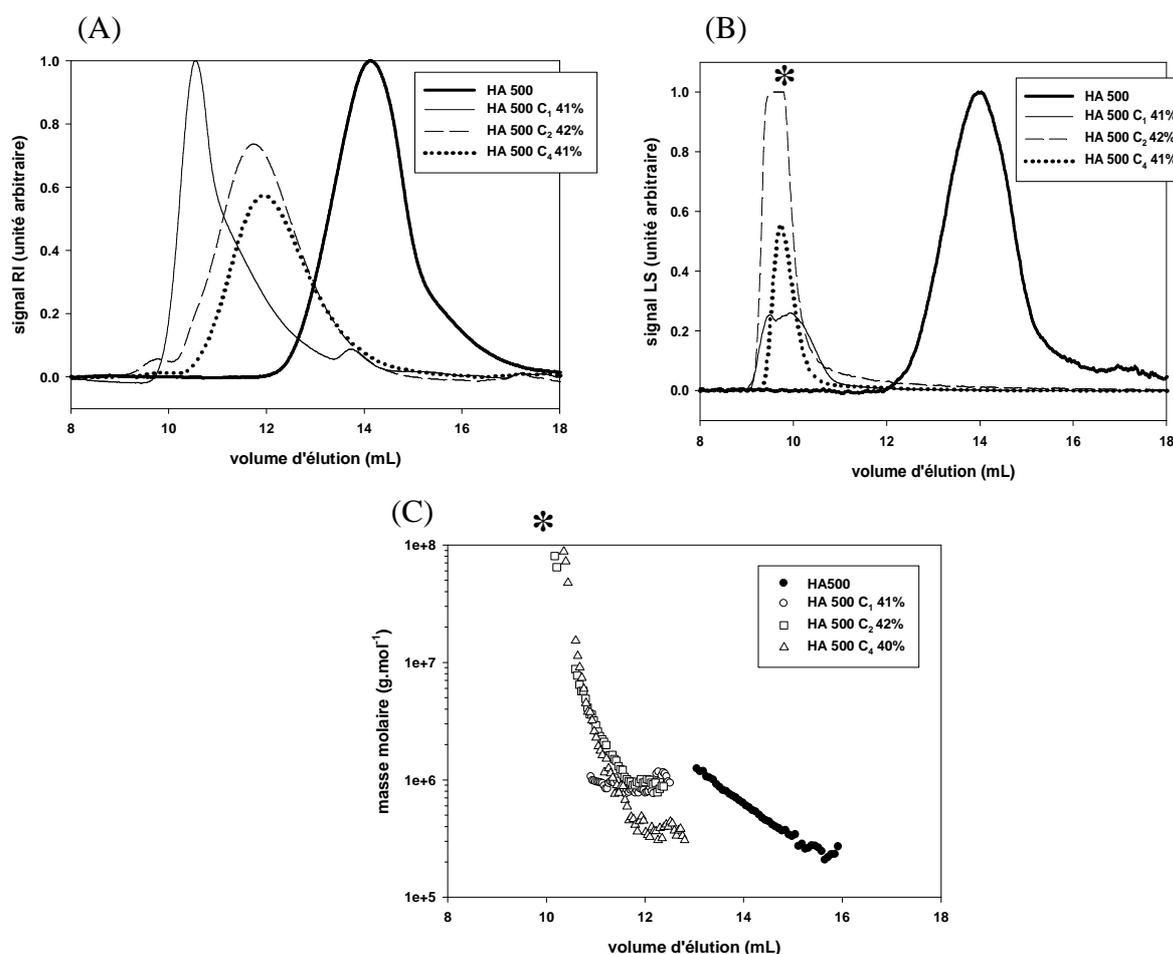


Figure 63 : Profils d'élution RI (A) et LS (90°) (B) avec la distribution des masses molaires (C) déterminés par SEC/MALLS/RI , $[HA] = 0,5 \text{ g.L}^{-1}$, en solution dans l'eau milliQ filtration $0,45 \mu\text{m}$

* problème de saturation du signal LS

Les signaux LS (figure 63 B) observés pour les échantillons estérifiés sont traduits par rapport au HA 500 précurseur à des volumes d'élution plus faibles. Nous observons le même phénomène de translation en analysant les signaux DRI (figure 63 A). En parallèle, les masses molaires obtenues (figure 63 C) sont plus importantes que celles du HA 500 précurseur. Tout ceci indique la formation d'agrégats volumineux. Les profils DRI indiquent que ces agrégats se compactent puisque lorsque la longueur de la chaîne alkyle augmente, le profil DRI se déplace vers les volumes d'élution plus élevés. Nous avons déterminé les masses molaires entre 10 et 13 mL en raison de la saturation des réponses LS. Les résultats sont résumés dans le tableau 8.

Fragments de HA	Mn (g.mol ⁻¹)	Mw (g.mol ⁻¹)	Ip	DPn _{apparent}	quantité détectée par le réfractomètre
HA 500	494 000	618 000	1,3	1232	87%
HA 500 C ₁ 41%	900 300	920 000	1,0	2262	70%
HA 500 C ₂ 42%	1 200 000	1 700 000	1,4	2978	63%
HA 500 C ₄ 41%	517 000	842 000	1,6	1246	42%

Tableau 8 : Détermination de la Mn, Mw et Ip obtenues par analyse SEC/MALLS des fragments d'esters de HA de fortes masses molaires (entre 10 et 13 mL)

Les valeurs de \overline{Mn} et \overline{Mw} obtenues des HA 500 C₁ 41% et HA 500 C₂ 42% sont beaucoup plus élevées que pour le précurseur. Nous observons également que les quantités d'échantillon détectées par le réfractomètre diminuent lorsque la longueur de la chaîne alkyle augmente. Ces deux phénomènes indiquent donc la présence de plus en plus importante d'agrégats provenant d'associations hydrophobes interchaînes. En revanche, pour le HA 500 C₄ 41%, la taille des agrégats étant trop importante, la majorité d'entre eux a été retenue par le filtre.

III.A.2.c. Bilan

Ces résultats nous montrent qu'avec des HA de plus forte masse molaire, la tendance à l'agrégation est favorisée. Les interactions hydrophobes apportées par l'ajout de chaînes alkyle sont de type intermoléculaire puisque les masses molaires obtenues sont nettement supérieures au HA précurseur. Contrairement aux esters préparés à partir des HA 23 et HA 28, des changements de comportement induits par les interactions hydrophobes se produisent dès la plus courte chaîne alkyle et dès les plus faibles taux d'estérification. De plus, augmenter le taux d'estérification ou la longueur de la chaîne alkyle semble donner des structures plus agrégées.

Les agrégats étant difficilement séparables des chaînes isolées, les masses molaires de celles-ci n'ont pu être déterminées avec précision.

III.B. Analyse par couplage AF4/MALLS

Pour certains esters de HA, notamment ceux préparés à partir du précurseur HA 500, l'importante présence des agrégats ne nous a pas permis d'obtenir une séparation correcte des différentes populations présentes en solution. Pour tenter une séparation entre les agrégats et les chaînes isolées ainsi qu'une caractérisation de ces différentes espèces, nous avons choisi d'analyser ces systèmes en utilisant un système de séparation flux-force dont les capacités de séparation des polymères amphiphiles sont reconnues (Simon *et al.*, 2003). Il est important de rappeler que l'ordre de séparation est inversé par rapport à la SEC. Les espèces les moins volumineuses sortent en premier. Les résultats obtenus sont résumés sur la figure suivante.

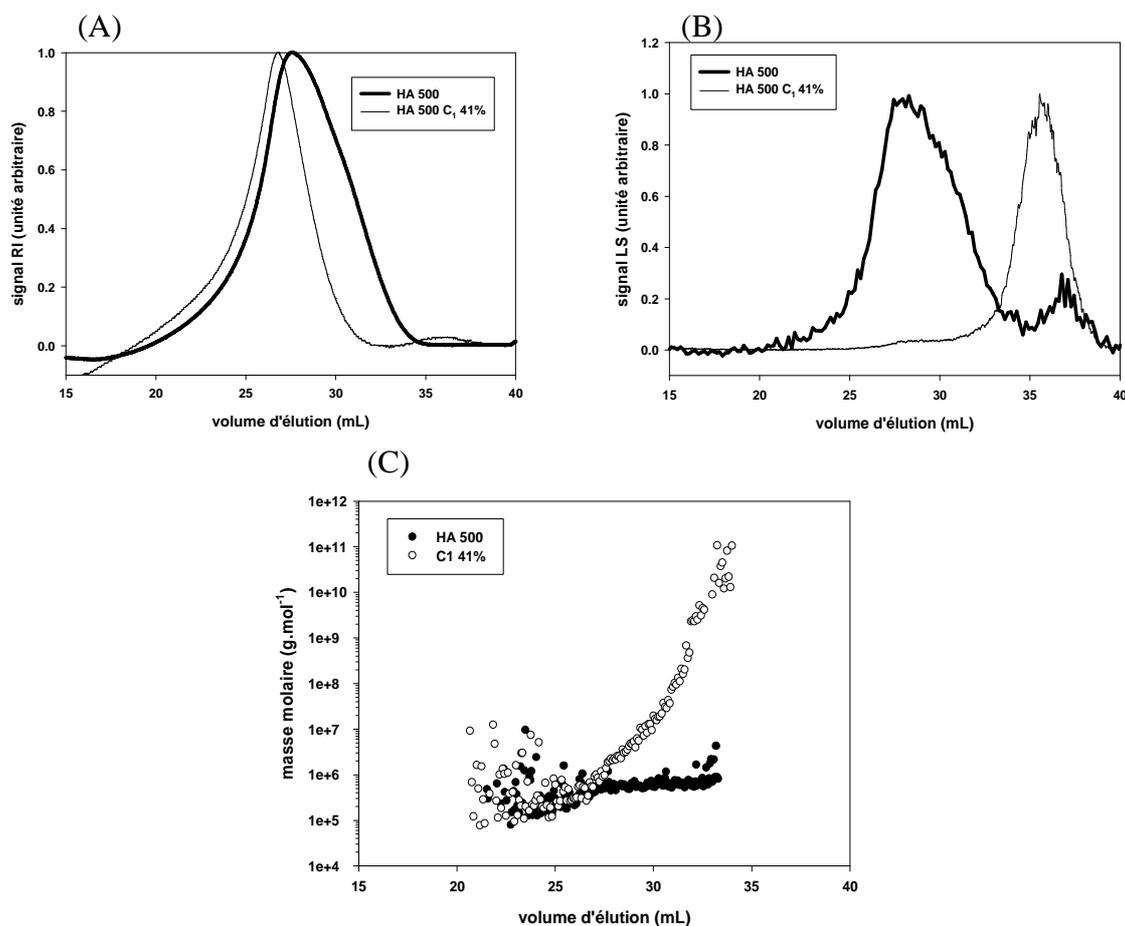


Figure 64 : Profils d'élution réfractométriques (A) et de diffusion de lumière (90°) (B) avec la distribution des masses molaires (C) déterminés par AF4/MALLS/RI , [HA] = 0,75 g.L⁻¹, en solution dans l'eau milliQ filtration 0,45 µm

La figure 64 présente, comme précédemment dans le cas du couplage SEC/MALLS, les profils réfractométriques (figure 64 A) les profils de diffusion de lumière à 90° (figure 64 B) et l'évolution de la masse molaire en fonction du volume d'élution (figure 64 C). Nous observons deux populations : avant 32 mL, les chaînes de HA ou de HA estérifiés isolées et après 32 mL les chaînes de HA ou de HA estérifiés agrégées. La tendance à l'agrégation est conforme aux données précédentes, c'est-à-dire d'après les signaux LS, faible pour le HA 500 précurseur et fort pour le HA 500 C₁ 41%.

Les masses molaires obtenues avant 27 mL sont superposées pour les deux échantillons. Ceci indique la présence de chaînes isolées. La forte déviation observée ensuite confirme la présence d'agrégats comme le montre le tableau suivant.

Fragments de HA	Mn (g.mol ⁻¹)	Mw (g.mol ⁻¹)	Ip	DPn _{apparent}	quantité détectée par le réfractomètre
HA 500	476 000 (15%)	535 000 (16%)	1,1 (22%)	1187	85%
HA 500 C ₁ 41%	502 000 (47%)	1 300 000 (29%)	2,7 (56%)	1261	55%
	19 000 000 (29%)	41 000 000 (41%)	2,2 (50%)	47 382	1%

Tableau 9 : Détermination de la Mn, Mw et Ip des populations 1 et 2 obtenues par analyse AF4/MALLS des fragments d'esters de HA de fortes masses molaires

Le tableau 9 résume les valeurs de masses molaires déterminées à partir des fractogrammes précédents. Les masses molaires obtenues pour le précurseur HA 500 sont très proches des valeurs obtenues par couplage SEC/MALLS. De plus, la quantité d'échantillon détectée par le réfractomètre est semblable à la quantité analysée par couplage SEC/MALLS. Nous pouvons en déduire que la méthode de séparation est adaptée au HA. Les valeurs de \overline{Mw} confirment la forte tendance de cet ester aux associations interchaînes de nature hydrophobe apportée par l'estérification. Néanmoins, il a été possible de déterminer les masses molaires de l'ester HA 500 C₁ 41% et donc de séparer de façon satisfaisante les agrégats de masse molaire très élevée et les chaînes isolées. Les valeurs de masses molaires des chaînes isolées nous montrent que la méthode d'estérification utilisée n'est pas dégradante même en utilisant des précurseurs de masse molaire plus élevée.

Il n'a cependant pas été possible de réaliser une séparation correcte dans le cas des autres esters de HA entre les agrégats et les chaînes isolées. De plus, les quantités

d'échantillons détectées par le réfractomètre (< 10%) ne sont pas représentatives des espèces présentes en solution.

III.C. Caractéristiques viscosimétriques des esters de HA

Dans cette partie, l'influence de l'estérification (longueur de la chaîne alkyle et taux d'estérification) est étudiée sur la viscosité des solutions d'esters de HA à l'aide d'un viscosimètre de type couette (Contraves Low Shear LS30). Nous avons étudié les esters préparés à partir du précurseur HA 500 car pour ceux préparés à partir des HA 23 et 28, les viscosités obtenues se sont avérées trop proches de la viscosité de l'eau pour en établir une variation en fonction de la concentration.

Nous avons choisi d'analyser les paramètres viscosimétriques en fixant le pH des solutions à 4 et en fixant une gamme de concentration allant de 0,1 à 2 g.L⁻¹. De plus, les études sont réalisées dans l'eau milli-Q ainsi que dans NaCl 0,15 mol.L⁻¹. Ces conditions expérimentales sont celles utilisées pour l'étude de l'hydrolyse enzymatique des esters de HA catalysée par la HAase.

III.C.1. Analyses effectuées à 25°C

III.C.1.a. Etude du régime des différents esters de HA en solution dans l'eau pure

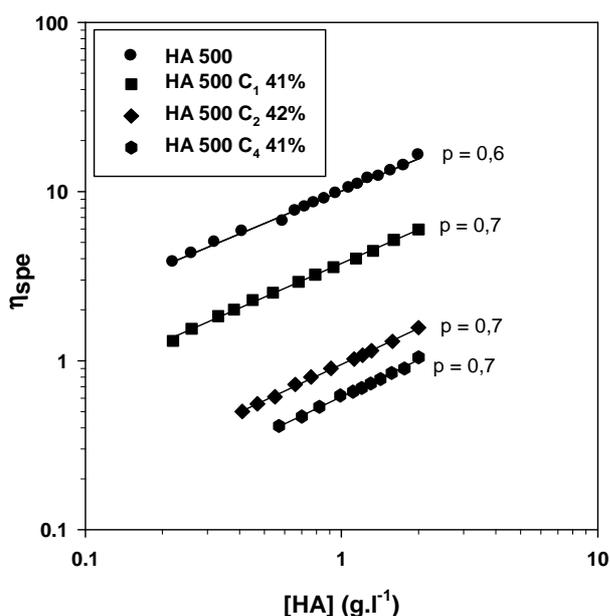


Figure 65 : Evolution de la viscosité spécifique en fonction de la concentration pour les esters de HA préparés à partir de HA 500

La figure 65 présente l'évolution de la viscosité spécifique en fonction de la concentration en HA 500 et en esters HA 500 C₁ 41%, HA 500 C₂ 42% et HA 500 C₄ 41%. Elle nous permet d'observer que cette variation est linéaire quelque soit la chaîne alkyle ajoutée. Les pentes de ces droites dont la valeur est proche de 0,5 sont caractéristiques de solutions de polyélectrolytes en régime semi dilué non enchevêtré (Don, 2008).

chaîne alkyle greffée		C ₁	C ₂	C ₄	C ₈		
taux d'estérification	0	41%	42%	41%	3%	13%	20%
η_{spe} à 2 g.L ⁻¹	16,40	6,00	1,61	1,15	0,32	0,31	0,20

Tableau 10 : Détermination de η_{spe} à une concentration fixée à 2 g.L⁻¹ pour l'ensemble des esters préparés à partir de HA 500

La viscosité spécifique des esters octylés étant trop proches de la viscosité spécifique de l'eau il n'a pas été possible d'en tracer l'évolution en fonction de la concentration. C'est pourquoi nous avons décidé de regrouper dans le tableau 3 la viscosité spécifique à une concentration fixe pour chaque ester. Ceci nous permet de comparer l'ensemble des esters préparés. Nous constatons que la viscosité spécifique diminue lorsque la longueur de la chaîne alkyle augmente. Dans le cas de la chaîne octyle, la viscosité spécifique diminue également lorsque le taux d'estérification augmente.

III.C.1.b. Détermination de la viscosité intrinsèque dans l'eau pure

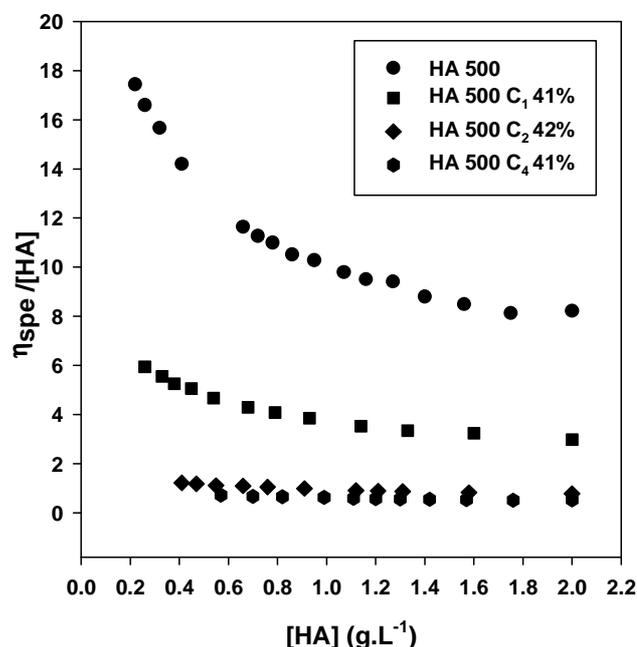


Figure 66 : Evolution de la viscosité réduite en fonction de la concentration pour les esters de HA préparés à partir de HA 500 (représentation de Huggins)

L'évolution de la viscosité réduite des différents échantillons en fonction de la concentration dans l'eau est typique d'un polyélectrolyte : la viscosité réduite augmente lorsque la concentration diminue. Ceci s'explique par l'augmentation, à très faible concentration, des forces de répulsions entre les charges négatives portées par les fonctions carboxylates du HA et provoquant ainsi l'expansion des chaînes de polymère. Nous observons également que l'estérification des fragments de HA diminue ce phénomène d'expansion. En estérifiant à 40%, nous masquons une quantité relativement importante de charges négatives, ce qui peut expliquer cette diminution. Ce phénomène a été observé par Dragan et Ghimici (2001) lors de leur étude sur des polyélectrolytes cationiques hydrophobes. Nous remarquons aussi que l'expansion semble diminuer lorsque la longueur de la chaîne alkyle augmente à taux d'estérification constant en raison de l'augmentation du caractère hydrophobe. Les associations hydrophobes intrachânes en milieu dilué masquent l'effet polyélectrolyte.

Il n'est pas possible de déterminer la viscosité intrinsèque des échantillons par cette représentation. Nous avons donc choisi deux représentations classiques : la représentation de Fuoss ainsi que la représentation de Fedors.

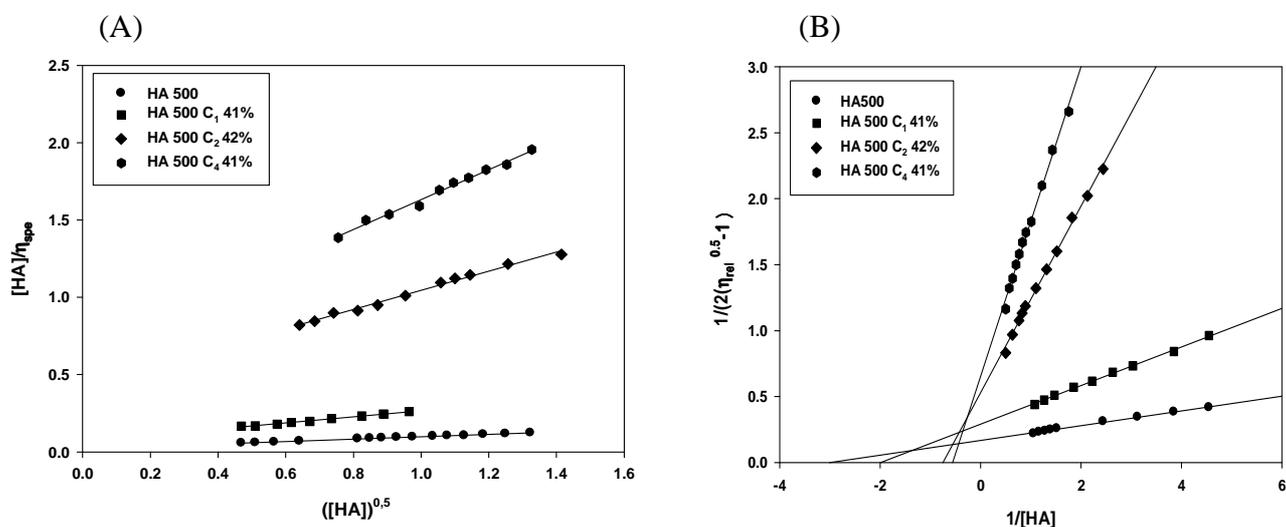


Figure 67 : Représentations de Fuoss (A) et de Fedors (B) pour les esters de HA préparés à partir de HA 500

Les deux méthodes de linéarisation représentées sur la figure 67 nous permettent d'obtenir des droites pour l'ensemble des esters étudiés. Ces deux modèles semblent être applicables dans le cas de nos systèmes en régime semi dilué non enchevêtré. Il est donc possible d'accéder à la viscosité intrinsèque et de comparer les valeurs obtenues par les deux méthodes. Les valeurs de viscosités intrinsèques sont résumées dans le tableau 3.

	Fuoss		Fedors	
	$[\eta]$ (L.g ⁻¹)	$[\eta]$ (L.g ⁻¹)	$[\eta]$ (L.g ⁻¹)	Cm
HA 500	50,00	10,60		0,33
HA 500 C₁ 41%	16,70	6,85		0,50
HA 500 C₂ 42%	2,38	1,41		1,33
HA 500 C₄ 41%	1,52	0,85		1,79

Tableau 11 : Détermination de la viscosité intrinsèque ($[\eta]$) pour les esters de HA préparés à partir du HA 500 ainsi que pour le précurseur HA 500

Nous constatons une différence entre les viscosités intrinsèques obtenues par les méthodes de linéarisation de Fuoss et de Fedors. La différence des valeurs est importante. Il a déjà été montré que la détermination de la viscosité intrinsèque par la

méthode de Fuoss pour des pectines donnait des valeurs surestimées (Michel *et al.*, 1984). Les résultats de Cohen *et al.* (1988) montrent que l'équation de Fuoss n'est pas adapté aux faibles concentrations en polymères. Rotureau *et al.* (2006) utilisent un polysaccharide neutre pour réaliser une comparaison entre la méthode de Huggins et celle de Fedors. Leurs études ont montré que les valeurs de viscosités intrinsèques déterminées par la méthode de Fedors pour des dextrans amphiphiles sont très proches de celles obtenues par la représentation de Huggins. Ces représentations restent cependant empiriques, et traduisent une tendance qui est la même pour les deux méthodes. Quelque soit la représentation, la viscosité intrinsèque diminue lorsque la longueur de la chaîne alkyle ajoutée augmente en fixant le taux d'estérification à 40%. La viscosité du HA précurseur est liée à la présence de liaisons hydrogène entre le groupe carboxylate et le groupe N-acétyl via une molécule d'eau (Heatley and Scott 1988). Ces liaisons sont d'autant plus présentes que les solutions analysées sont préparées dans l'eau pure. Estérifier les fonctions carboxyl diminue le nombre possible de liaisons hydrogène et diminue donc la viscosité. Cette diminution de la viscosité intrinsèque peut également signifier une diminution du volume hydrodynamique par associations hydrophobes intramoléculaires. Souguir *et al.* (2007) réalise une étude viscosimètre dans l'eau pure de carboxyméthylpullulane hydrophobisés par du diméthylaminopropylamine et constate également une conformation plus compacte par rapport à son précurseur.

De plus, nous constatons une augmentation du paramètre C_m en parallèle de la diminution de la viscosité intrinsèque. Cette augmentation signifie la formation de structures plus compactes avec l'augmentation de la longueur de la chaîne alkyle. D'après les études de Rotureau *et al.* (2006), le paramètre C_m est lié à la concentration d'agrégation lorsqu'il s'agit de polymères amphiphiles.

III.C.1.c. Etude du régime des esters de HA dans NaCl 0,15 mol.L⁻¹

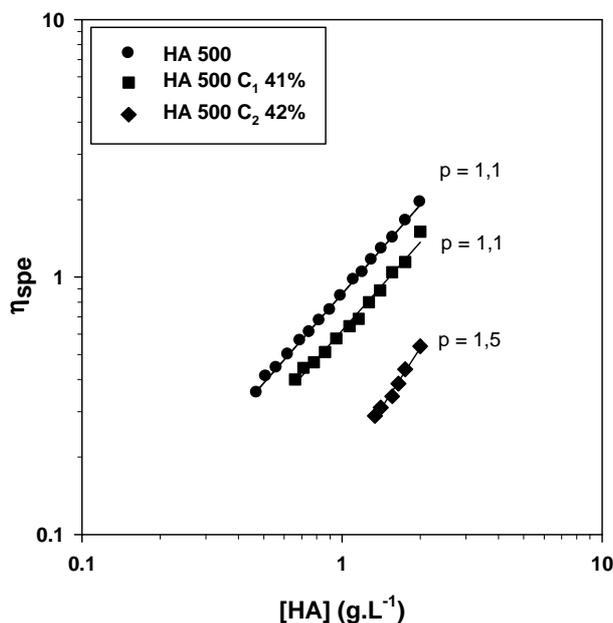


Figure 68 : Evolution de la viscosité spécifique en fonction de la concentration pour les esters de HA préparés à partir de HA 500

En présence de 0,15 mol.L⁻¹ de NaCl, nous observons comme précédemment une variation linéaire de la viscosité spécifique en fonction de la concentration quelle que soit la longueur de la chaîne alkyle ajoutée. Les valeurs de pente, qui varient de 1,1 à 1,5 sont caractéristiques de solutions en régime dilué (Utracki, 1963).

chaîne alkyle greffée		C ₁	C ₂	C ₄	C ₈		
taux d'estérification	0	41%	42%	41%	3%	13%	20%
η _{spe} à 2 g.L ⁻¹	1,96	1,50	0,59	0,41	0,23	0,17	0,14

Tableau 12 : Détermination de η_{spe} à une concentration fixée à 2 g.L⁻¹ pour l'ensemble des esters préparés à partir de HA 500

Comme dans le cas des analyses effectuées dans l'eau pure, les viscosités spécifiques du HA 500 C₄ 41% ainsi que les esters octylés sont trop faibles pour obtenir une évolution en fonction de la concentration en HA. Nous pouvons néanmoins les comparer à une concentration fixée à 2 g.L⁻¹. Tout d'abord, nous constatons qu'en présence de NaCl, les viscosités spécifiques sont logiquement plus faibles que dans l'eau pure en raison de l'écrantage des charges. En les comparant, il est important de remarquer que, comme dans le cas des solutions préparés dans l'eau

pure, la viscosité spécifique diminue lorsque la longueur de la chaîne alkyle ajoutée augmente. Pour les esters octylés, nous remarquons également que la viscosité spécifique diminue lorsque le taux d'estérification augmente pour les mêmes raisons que précédemment.

III.C.1.d. Détermination de la viscosité intrinsèque dans NaCl 0,15 mol.L⁻¹

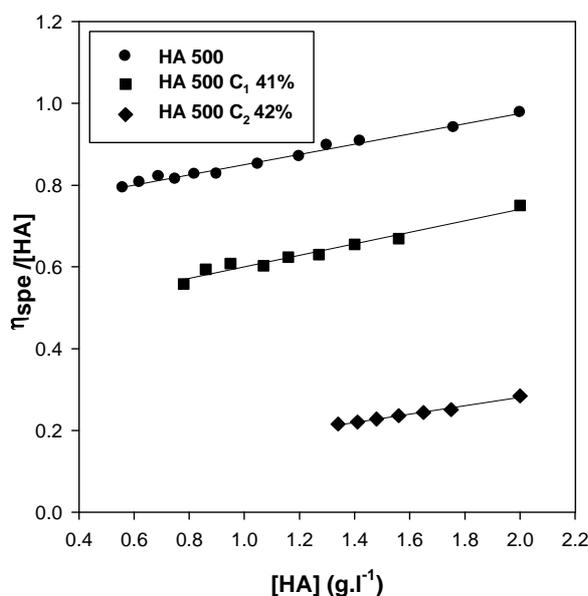


Figure 69 : Représentation de Huggins pour les esters de HA préparés à partir de HA 500

En présence de 0,15 mol.L⁻¹ de NaCl, nous n'observons plus d'augmentation de la viscosité réduite lorsque les concentrations en HA estérifiés ou non diminuent. Les effets polyélectrolytes sont supprimés par l'ajout de force ionique. Il est donc possible de déterminer dans le cas du HA 500 précurseur ainsi que des deux esters HA C₁ 41% et HA 500 C₂ 42% les viscosités intrinsèques en utilisant la représentation de Huggins. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant

	Huggins		Fedors	Fuoss
	[η] (L.g ⁻¹)	K _H	[η] (L.g ⁻¹)	[η]
HA 500	0,72	0,24	0,87	1,84
HA 500 C₁ 41%	0,46	0,66	0,55	0,89
HA 500 C₂ 42%	0,08	1,60	0,13	0,27

Tableau 13 : Détermination de la viscosité intrinsèque ([η]) pour les esters de HA préparés à partir du HA 500 ainsi que le précurseur

Le tableau 13 nous montre qu'en fixant le taux d'estérification à 40%, les viscosités intrinsèques diminuent lorsque la longueur de la chaîne alkyle ajoutée augmente. Ceci suggère une diminution du volume hydrodynamique. Simon *et al.* (Simon *et al.*, 2003) observent de la même manière une diminution de viscosités intrinsèques des carboxyméthylpullulanes hydrophobisés par des chaînes octyle lorsque le degré de substitution augmente. Pelletier *et al.* (Pelletier *et al.* 2000) montre qu'en régime dilué, les interactions hydrophobes intramoléculaires entre les chaînes alkyle sont favorisées dans NaCl 0,15 mol.L⁻¹. De plus la représentation de Huggins nous permet d'accéder au paramètre k_H . La valeur obtenue pour le HA 500 précurseur est une valeur classique pour un bon solvant. Nous observons que sa valeur augmente lorsque la longueur de la chaîne alkyle ajoutée augmente. Bien que les chaînes alkyle ajoutées soient courtes, les interactions polymère-polymère sont accentuées et les interactions polymère-solvant diminuent. Le taux d'estérification élevé permet ces associations hydrophobes. Les données de viscosité ont également été linéarisées selon les méthodes de Fuoss et de Fedors. En accord avec Rotureau *et al.* (2006), en présence de sel les représentations de Huggins et de Fedors donnent des résultats proches.

III.C.2. Analyses effectuées à 37°C

Les mêmes analyses viscométriques ont été réalisées en fixant la température à 37°C. Ceci nous permet de nous rapprocher davantage des conditions utilisées pour l'étude de l'hydrolyse enzymatique.

III.C.2.a. Etude du régime des esters de HA dans l'eau pure

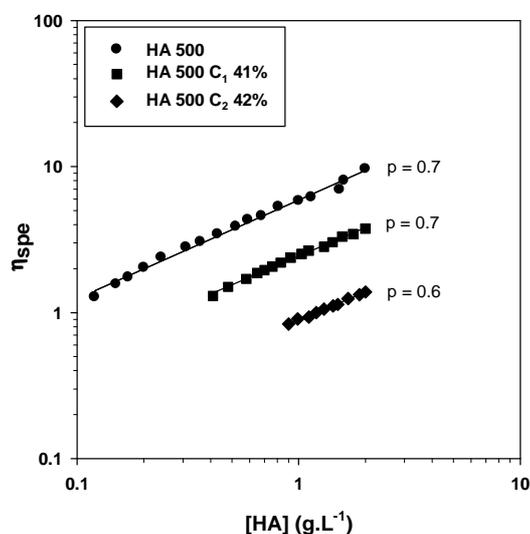


Figure 70 : Evolution de la viscosité spécifique en fonction de la concentration pour les esters de HA préparés à partir de HA 500

Comme pour tous les polymères non LCST, nous observons des viscosités plus faibles à 37°C qu'à 25°C. A cette température, nous observons également une variation linéaire de la viscosité spécifique en fonction de la concentration en HA estérifié ou non. Les pentes de ces droites dont la valeur est proche de 0,5 sont caractéristiques de solutions de polyélectrolytes en régime semi dilué non enchevêtré. Ne pouvant pas observer l'effet de la concentration pour le HA 500 C₄ 41% et les HA 500 octylés. Nous choisissons de comparer l'ensemble des fragments de HA préparés à partir du HA 500 à une concentration fixe. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant.

chaîne alkyle greffée		C ₁	C ₂	C ₄	C ₈		
taux d'estérification	0	41%	42%	41%	3%	13%	20%
η_{spe} à 2 g.L ⁻¹	9,62	3,80	1,38	0,61	0,05	0,06	0,04

Tableau 14 : Détermination de η_{spe} à une concentration fixée à 2 g.L⁻¹ pour l'ensemble des esters préparés à partir de HA 500

Le tableau 14 présente des viscosités spécifiques qui diminuent avec l'ensemble des échantillons analysés lorsque nous nous plaçons à 37°C. Nous observons également la même tendance qu'à 25°C, c'est-à-dire, une diminution de la viscosité spécifique lorsque la longueur de la chaîne alkyle ajoutée augmente. Pour les esters octylés, une diminution de la viscosité spécifique est à noter lorsque le taux d'estérification augmente.

III.C.2.b. Détermination de la viscosité intrinsèque dans l'eau pure

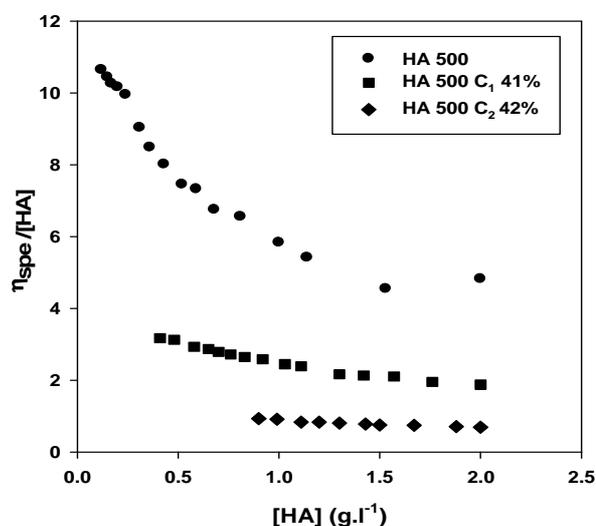


Figure 71 : Evolution de la viscosité réduite en fonction de la concentration pour les esters de HA préparés à partir de HA 500 (représentation de Huggins)

La figure 71 présente l'évolution de la viscosité réduite selon la représentation de Huggins. L'augmentation de la température d'analyse induit une diminution de la viscosité réduite en fonction de la concentration. L'effet polyélectrolyte très marqué pour le HA 500 précurseur est à nouveau observé à 37°C. La diminution de cet effet polyélectrolyte est mise en évidence lorsque la longueur de la chaîne alkyle augmente. Pour déterminer la viscosité intrinsèque des échantillons HA 500, HA 500 C₁ 41% et HA 500 C₂ 42%, nous avons alors utilisé les méthodes de linéarisation de Fuoss et celle de Fedors. Les résultats sont résumés dans les figures et tableau suivants.

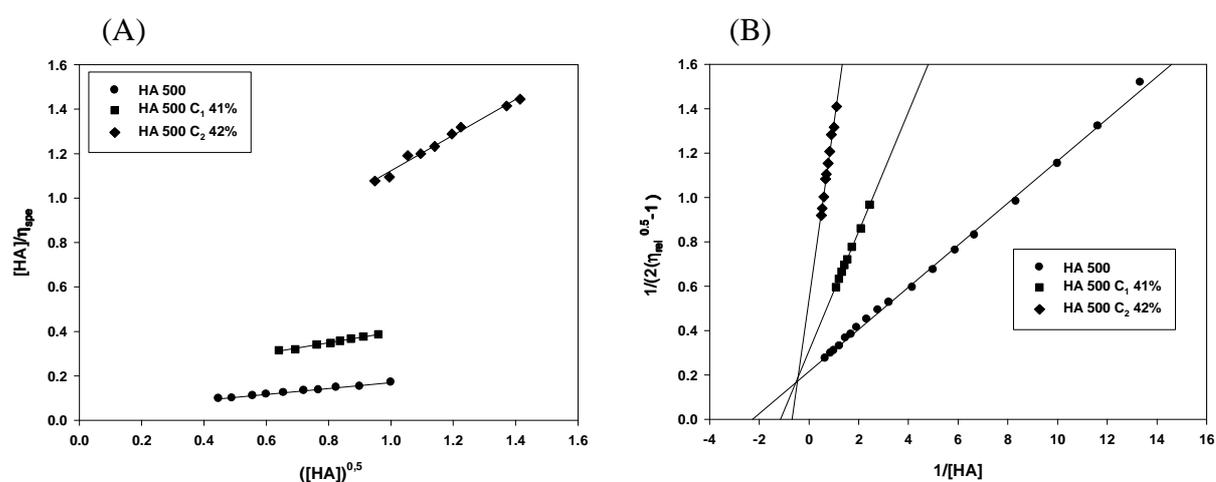


Figure 72 : Représentation de Fuoss (A) et de Fedors (B) pour les esters de HA préparés à partir de HA 500

Les deux équations utilisées permettent l'obtention de droites pour les trois échantillons analysés. Il est donc possible d'accéder aux viscosités intrinsèques et de comparer les valeurs obtenues par les deux méthodes. Ces valeurs sont résumées dans le tableau suivant.

	fuoss	Fedors	
	[η]	[η]	Cm
HA 500	26,3	16,9	0,44
HA 500 C₁ 41%	6,25	3,71	0,87
HA 500 C₂ 42%	3,11	1,26	1,49

Tableau 15 : Détermination de la viscosité intrinsèque ([η]) pour les esters de HA préparés à partir du HA 500 ainsi que le précurseur

Le tableau 15 présente un écart important entre les valeurs de viscosités intrinsèques déterminées par l'équation de Fuoss et celles obtenues par l'équation de Fedors. La tendance reste cependant la même. La viscosité intrinsèque diminue de

façon importante lorsque la longueur de la chaîne alkyle augmente. Nous pouvons remarquer que la diminution est très marquée entre la valeur obtenue pour le HA 500 précurseur et les deux esters analysés. En parallèle, nous observons également une augmentation du paramètre C_m lorsque la longueur de la chaîne alkyle augmente. Les valeurs de C_m obtenues à 37°C sont plus élevées que celles obtenues à 25°C. Ceci suggère qu'en augmentant la température d'analyse, nous obtenons des structures plus compactes qu'à 25°C. Il est probable que les associations hydrophobes soient favorisées en augmentant la température.

III.C.2.c. Etude du régime des esters de HA dans NaCl 0,15 mol.L⁻¹

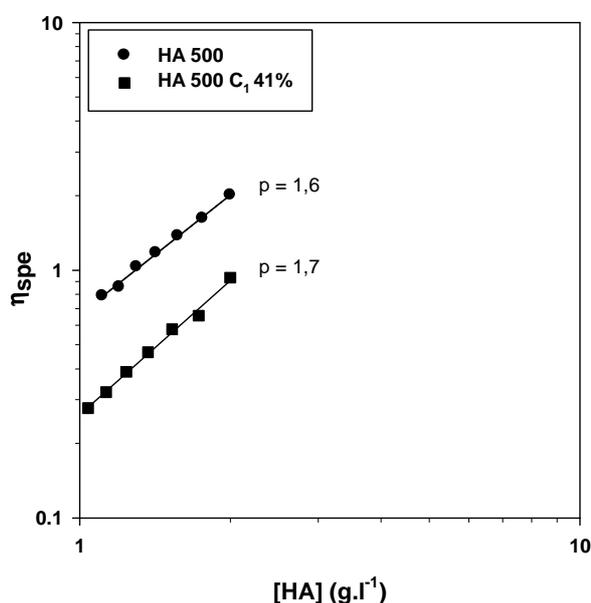


Figure 73 : Evolution de la viscosité spécifique en fonction de la concentration pour l'ester de HA C₁ 41% préparés à partir de HA 500

La figure 73 montre une variation linéaire entre la viscosité spécifique et la concentration en polymère. Les pentes des droites obtenues sont comprises entre 1,6 et 1,7. Cette valeur de pente est caractéristique d'une solution en régime dilué. L'ajout de NaCl diminuant davantage la viscosité spécifique, nous ne pouvons pas tracer cette évolution pour l'ensemble des esters. Les viscosités spécifiques de l'ensemble des esters à une concentration de 2 g.L⁻¹ sont résumés dans le tableau suivant afin d'être comparé.

chaîne alkyle greffée		C ₁	C ₂	C ₄	C ₈		
taux d'estérification	0	41%	42%	41%	3%	13%	20%
η_{spe} à 2 g.L ⁻¹	2,01	0,93	0,33	0,23	0,12	0,09	0,08

Tableau 16 : Détermination de η_{spe} à une concentration fixée à 2 g.L⁻¹ pour l'ensemble des esters préparés à partir de HA 500

Le tableau 16 nous présente des viscosités spécifiques plus faibles lorsque les solutions sont préparées dans NaCl 0,15 mol.L⁻¹. De plus, nous montrons comme précédemment une diminution de la viscosité spécifique lorsque à la fois la longueur de la chaîne et/ou le taux d'estérification augmente.

III.C.2.d. Détermination de la viscosité intrinsèque dans NaCl 0,15 mol.L⁻¹

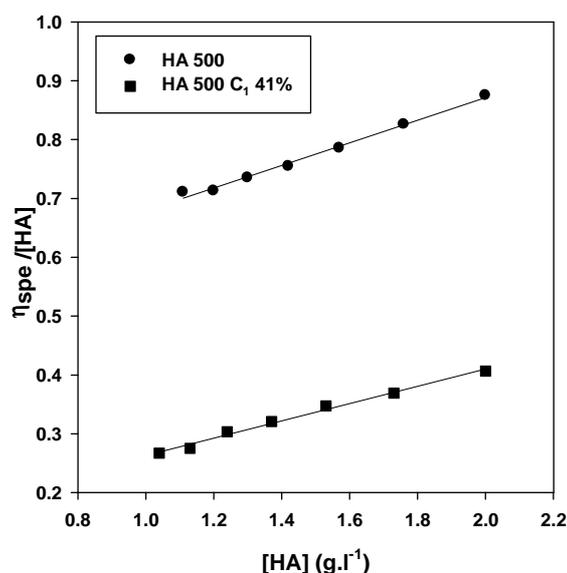


Figure 74 : Evolution de la viscosité réduite en fonction de la concentration pour les esters de HA préparés à partir de HA 500 (représentation de Huggins)

La figure 74 montre que la représentation de Huggins linéarise de façon correcte les valeurs de viscosités obtenues. Nous pouvons donc accéder à la viscosité intrinsèque pour le HA 500 précurseur ainsi que pour le HA 500 C₁ 41%.

	Huggins		Fedors	Fuoss
	$[\eta]$ (L.g ⁻¹)	K_H	$[\eta]$ (L.g ⁻¹)	$[\eta]$ (L.g ⁻¹)
HA 500	0,49	0,79	0,55	1,55
HA 500 C, 41%	0,12	10,9	0,19	0,61

Tableau 17 : Détermination de la viscosité intrinsèque ($[\eta]$) pour les esters de HA préparés à partir du HA 500 ainsi que le précurseur

Nous observons que la viscosité intrinsèque diminue lorsque nous estérifions le HA 500 avec 41% de chaînes méthyle. En parallèle, k_H augmente de façon très marquée. La valeur de k_H devient particulièrement élevée lorsque nous augmentons la température. La représentation de Fedors est à nouveau en accord avec d'Huggins.

III.C.3. Bilan des analyses viscosimétriques

Cette étude nous a montré que quelque soit la température ou la force ionique des solutions préparées, la présence de chaînes alkyle modifie la conformation du HA en solution diluée. Nous avons constaté une diminution de la viscosité intrinsèque accompagné d'une augmentation du paramètre C_m déterminé dans l'eau pure et de k_H déterminé en milieu salin lorsque la longueur de la chaîne alkyle augmente. Une diminution de la viscosité intrinsèque ainsi qu'une augmentation de C_m suggère une diminution du volume hydrodynamique et donc une structure très compacte avec une augmentation de k_H qui montre le renforcement des interactions polymère-polymère. De plus, les résultats obtenus d'un point de vue microscopique par le couplage SEC/MALLS ainsi que la turbidité des solutions confirment la présence d'associations hydrophobes interchaînes. Il est donc probable qu'en choisissant un taux d'estérification de 40%, il y ait compétition en solution entre les associations hydrophobes de type intramoléculaire et intermoléculaire, ceci formant des espèces très compactes en solution. Aux faibles concentrations étudiées, la transition entre ces associations est difficile à obtenir. Ceci peut suggérer que la viscosité intrinsèque déterminée pourrait ne pas correspondre aux macromolécules isolées. Des comportements similaires ont déjà été observés pour d'autres polymères amphiphiles (Glinel *et al.*, 2001 ; Simon *et al.*, 2003).

La force ionique ainsi que l'augmentation de la température accentue les phénomènes déjà observés dans l'eau pure et à 25°C. Pelletier *et al.* (2000) montrent

que les structures obtenues pour des HA hydrophobisés sont plus compactes que celles des alginates hydrophobisés à même degré de substitution.

III.D. Inclusion d'une sonde hydrophobe dans les solutions d'esters de HA

Nous avons souhaité étudier par la suite le rôle de la concentration en ester de HA sur l'hydrophobie du système. Pour cela, nous avons réalisé des analyses par fluorescence en utilisant comme sonde hydrophobe le pyrène. Cette sonde est connue pour être sensible à la polarité de son microenvironnement (Kalyanasundaram et Thomas, 1977). Le rapport des intensités du premier et du troisième pic vibronique du spectre d'émission de fluorescence du pyrène est caractéristique du changement de polarité du milieu. La gamme de concentration étudiée varie de $0,001 \text{ g.L}^{-1}$ à 2 g.L^{-1} afin de se placer dans les conditions utilisées pour l'étude de l'hydrolyse enzymatique.

III.D.1. Esters obtenus à partir de HA 23 et 28

III.D.1.a. Influence du taux d'estérification

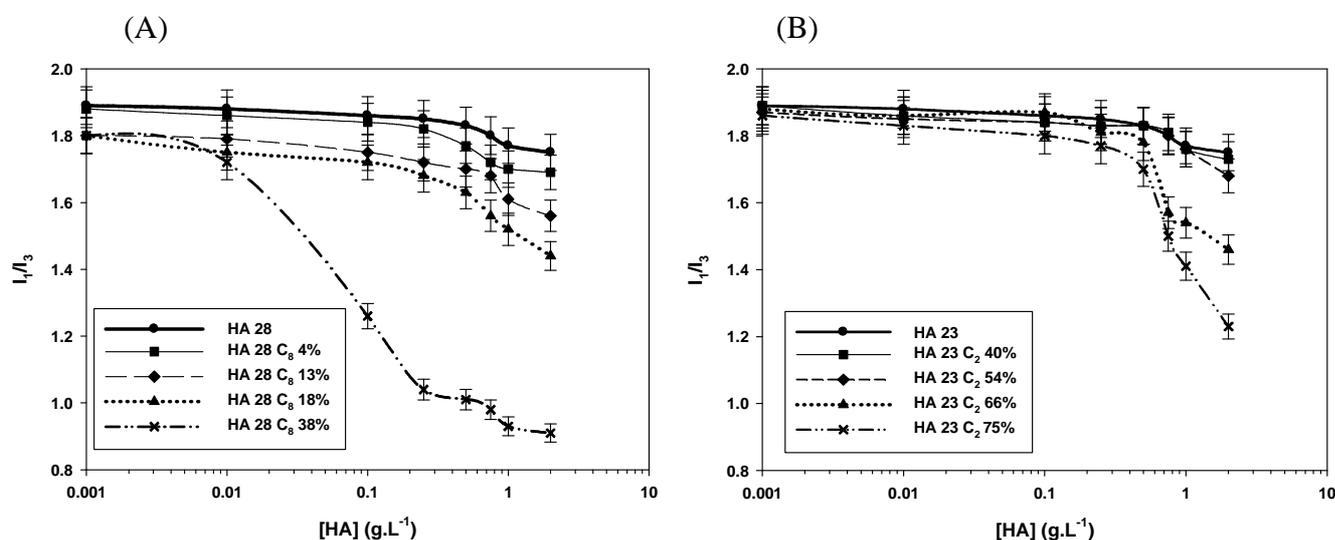


Figure 75 : Evolution du rapport I_1/I_3 du spectre d'émission de fluorescence du pyrène en fonction de la concentration pour les esters octylés (A) et éthylés (B) de HA préparés à partir de HA 28 et HA 23

La figure 75 présente l'évolution du rapport I_1/I_3 en fonction de la concentration en esters octylés (A) et éthylés (B) de HA. Concernant le HA précurseur, nous observons une légère diminution de ce rapport pour les plus fortes concentrations en HA, c'est-à-dire au-dessus de 1 g.L^{-1} . La diminution de ce rapport

marque la présence de microdomaines hydrophobes où le pyrène est préférentiellement soluble. Cette légère diminution aux concentrations les plus élevées peut s'expliquer par l'augmentation des « patches » hydrophobes (Scott *et al.*, 1992) du squelette du HA ou des liaisons hydrogène formant des agrégats de chaînes de HA. Concernant les esters éthylés de HA, une diminution du rapport I_1/I_3 est observée à partir de 66% d'estérification en chaîne éthyle. Elle débute à une concentration plus faible que pour le HA précurseur, c'est-à-dire à partir de $0,5 \text{ g.L}^{-1}$. La mise en évidence d'un changement de conformation induit par les plus forts taux d'estérification confirme les résultats obtenus lors des analyses chromatographiques.

En augmentant le taux d'estérification en chaînes octyle, le rapport I_1/I_3 diminue. Entre 13 et 18% de taux d'estérification, la diminution du rapport d'intensités commence à une concentration plus faible que pour les chaînes éthyle, c'est-à-dire $0,25 \text{ g.L}^{-1}$. La diminution est davantage marquée lorsque le taux d'estérification atteint 38% et elle commence dès $0,01 \text{ g.L}^{-1}$.

Le caractère hydrophobe et la formation de microdomaines hydrophobes sont montrés pour les esters HA 23 C₂ 75% et HA 28 C₈ 38%. De plus, la concentration en ester est un paramètre important puisqu'en l'augmentant, nous augmentons le caractère hydrophobe. Des études similaires ont été réalisées en présence de $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$ de NaCl. Ceci ne semble pas accentuer le phénomène.

III.D.1.b. Influence de la longueur de la chaîne alkyle

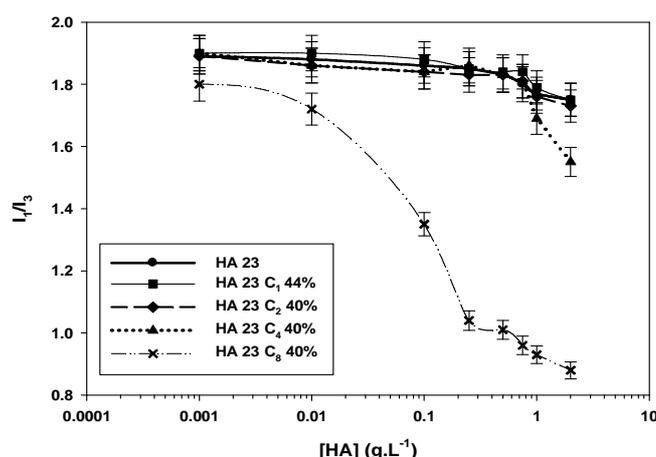


Figure 76 : Evolution du rapport I_1/I_3 du spectre d'émission de fluorescence du pyrène en fonction de la concentration pour les esters de HA préparés à partir de HA 23

Nous avons également étudié l'influence de la concentration sur des esters de HA en faisant varier la longueur de la chaîne alkyle. La figure 76 nous montre une

diminution marquée du rapport I_1/I_3 uniquement pour l'ester HA 23 C₈ 40%. Il semble donc qu'en fixant le taux d'estérification à 40%, l'ajout de chaînes méthyle, éthyle ou butyle n'induit pas d'associations hydrophobes en quantité suffisante pour former des microdomaines hydrophobes pouvant solubiliser le pyrène.

III.D.2. Esters obtenus à partir de HA 500

III.D.2.a. Influence du taux d'estérification

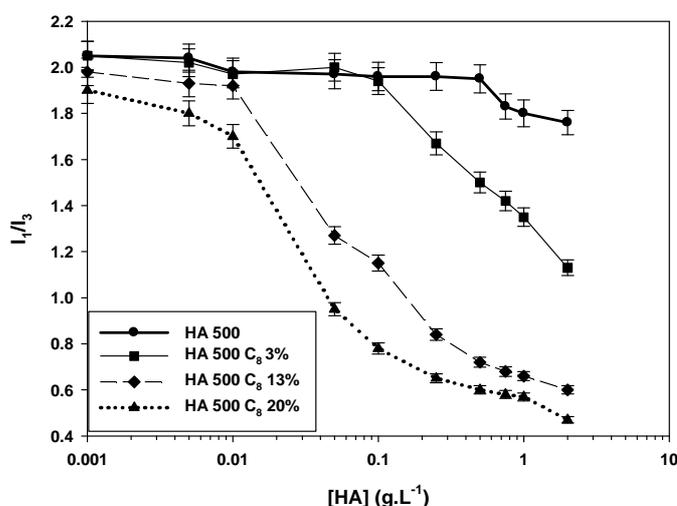


Figure 77 : Evolution du rapport I_1/I_3 du spectre d'émission de fluorescence du pyrène en fonction de la concentration pour les esters de HA préparés à partir de HA 500

La figure 77 nous présente l'évolution du rapport I_1/I_3 du spectre d'émission de fluorescence du pyrène en fonction de la concentration en esters préparés à partir de HA 500. Cette figure nous permet d'étudier l'influence du taux d'estérification en chaînes octyle sur la polarité des solutions préparées.

Tout d'abord, nous observons que comme dans l'étude similaire réalisée avec les précurseurs HA 23 et HA 28, le rapport I_1/I_3 diminue légèrement pour les plus fortes concentrations dans le cas du précurseur HA 500.

Concernant les esters octylés de HA, nous observons des diminutions du rapport I_1/I_3 plus marquées que pour les esters octylés homologues de plus faibles masses molaires. Dès 3% d'estérification en chaîne octyle le rapport chute à partir de 0,1 g.L⁻¹ jusqu'à une valeur de 1,2. Pour les esters HA 500 C₈ 13% et HA 500 C₈ 20%, la diminution marquée du rapport d'intensités apparaît à une concentration plus faible à partir de 0,01 g.L⁻¹ et atteint une valeur de 0,5. Cette valeur est la valeur la

plus faible que peut atteindre le rapport. D'après Kalyasundaram *et al.* (1977), cette valeur est atteinte dans le cas où le pyrène est en solution dans un solvant apolaire tel que le perfluorométhylcyclohexane. Ceci nous indique la présence importante de microdomaines hydrophobes dès les plus faibles taux d'estérification et à des concentrations faibles également. Il semble qu'en augmentant la masse molaire du fragment de HA précurseur nous ayons modifié l'organisation des chaînes pour les interactions hydrophobes. Etant donné les faibles concentrations à partir desquelles ont lieu la diminution du rapport I_1/I_3 ainsi que les faibles valeurs obtenues pour les plus hauts taux d'estérification, nous pouvons supposer la présence d'associations hydrophobes de type intra- et intermoléculaires.

III.D.2.b. Influence de la longueur de la chaîne alkyle

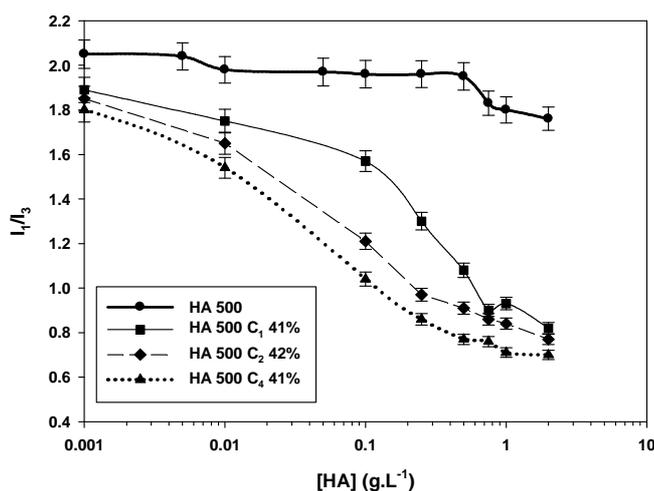


Figure 78 : Evolution du rapport I_1/I_3 du spectre d'émission de fluorescence du pyrène en fonction de la concentration pour les esters de HA préparés à partir de HA 500

La figure 78 nous montre qu'en se plaçant à un taux d'estérification de 40%, la diminution du rapport I_1/I_3 est très importante quelque soit la longueur de la chaîne alkyle ajoutée. Cette diminution est davantage accentuée lorsque avec l'augmentation de l'hydrophobie de la chaîne alkyle. La diminution du rapport apparaît pour de faibles concentrations en esters de HA, à partir de 0,01 g.L⁻¹. Les valeurs atteintes par le rapport I_1/I_3 sont beaucoup plus faibles que celles atteintes dans le cas des esters préparés à partir du précurseur HA 23. Pour les esters présentés par la figure 78, les plus courtes chaînes alkyle ajoutées induisent des microdomaines hydrophobes. En

augmentant la masse molaire du précurseur et la concentration en HA estérifié, nous augmentons la tendance aux associations hydrophobes.

IV. Influence de l'estérification du HA sur son hydrolyse enzymatique

IV.A. Comportement de la méthode de Reissig vis-à-vis des esters de HA

La méthode de Reissig (1955) est la principale méthode analytique utilisée dans ces travaux pour suivre la cinétique de la réaction d'hydrolyse enzymatique du HA catalysée par la HAase. Comme expliqué de manière plus détaillée dans la partie Matériels et Méthodes (IV.A.), cette méthode spectrophotométrique, adaptée lors d'études précédentes à nos analyses (Astériou *et al.*, 2001), permet de quantifier la formation d'extrémités réductrices N-acétyl-glucosamine (ER) formées, c'est-à-dire de quantifier l'apparition de sucres réducteurs lors de l'hydrolyse enzymatique des liaisons $\beta(1-4)$. Cette quantification est possible via une droite d'étalonnage. Cependant, concernant la droite d'étalonnage, nous avons détaillé dans la partie Matériels et Méthodes les différences de pente que nous observons entre la courbe obtenue pour la N-acétyl-glucosamine libre et celle obtenue pour le HA. Cifonelli *et al.* (1957) ont étudié l'influence de la position d'une substitution de l'hexosamine sur le produit coloré obtenu par la méthode de Morgan-Elson et montrent qu'une substitution en position 3 augmente l'intensité de la couleur alors qu'une substitution en position 4 ne produit aucune couleur. La position de la substitution est donc importante. Dans le cas du HA, la substitution sur l'hexosamine est en position 3 et nous observons le même phénomène d'augmentation de la couleur par rapport à la N-acétyl-glucosamine libre. Nous avons tout d'abord effectué un étalonnage de chacun des fragments de HA précurseur. Pour suivre la cinétique d'hydrolyse des fragments de HA par la méthode de Reissig, il est nécessaire que quelque soit la masse molaire du HA, la réponse spectrophotométrique, c'est-à-dire la pente de la droite d'étalonnage soit la même. L'objectif des analyses suivantes est de vérifier que la pente de la droite d'étalonnage de chacun des fragments précurseurs est identique. Chaque échantillon subit les différentes étapes de la méthode de Reissig. Seule la part colorimétrique du signal de Reissig, directement proportionnelle à la concentration

molaire des extrémités réductrices N-Acétyl-glucosamine, est représentée sur les différents graphiques. Les figures suivantes présentent les résultats obtenus.

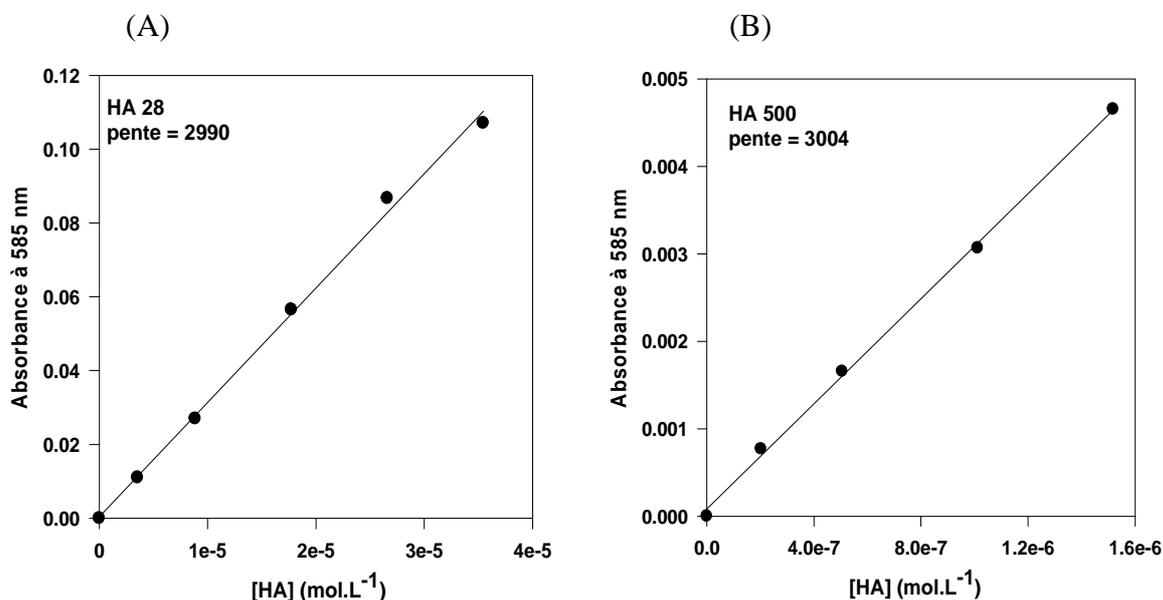


Figure 79 : Courbes d'étalonnage de la méthode de Reissig réalisées pour les précurseurs HA 28 (A) et HA 500 (B) solubilisés dans l'eau pure.

La figure 79 présente l'évolution de l'absorbance à 585 nm en fonction de la concentration en HA. Les variations de concentrations massiques en HA sont identiques pour le HA 28 et le HA 500 c'est-à-dire de 0,1 g.L⁻¹ à 1 g.L⁻¹. Nous choisissons d'exprimer la concentration en mol.L⁻¹ car elle correspond ainsi à la concentration d'extrémités réductrices N-acétyl-glucosamine ([ER]), espèce dosée par la méthode de Reissig. Les concentrations en ER sont naturellement plus faibles dans le cas du HA 500 puisque la masse molaire est plus forte. La figure montre que les pentes des droites d'étalonnage, soit les coefficients d'extinction molaires (ϵ), sont identiques pour les deux fragments précurseurs HA 28 et HA 500. Ces résultats permettent de vérifier que quelque soit la masse molaire du HA la réponse colorimétrique est identique d'environ 3000 uA.mol⁻¹.L.

Si la position du substituant est importante, la nature chimique du substituant pourrait l'être également. En estérifiant l'acide glucuronique, nous modifions la nature chimique du substituant de la N-acétyl-glucosamine. Nous avons donc voulu étudier l'influence de l'estérification sur la méthode de Reissig. Les résultats obtenus sont résumés sur les graphiques suivants.

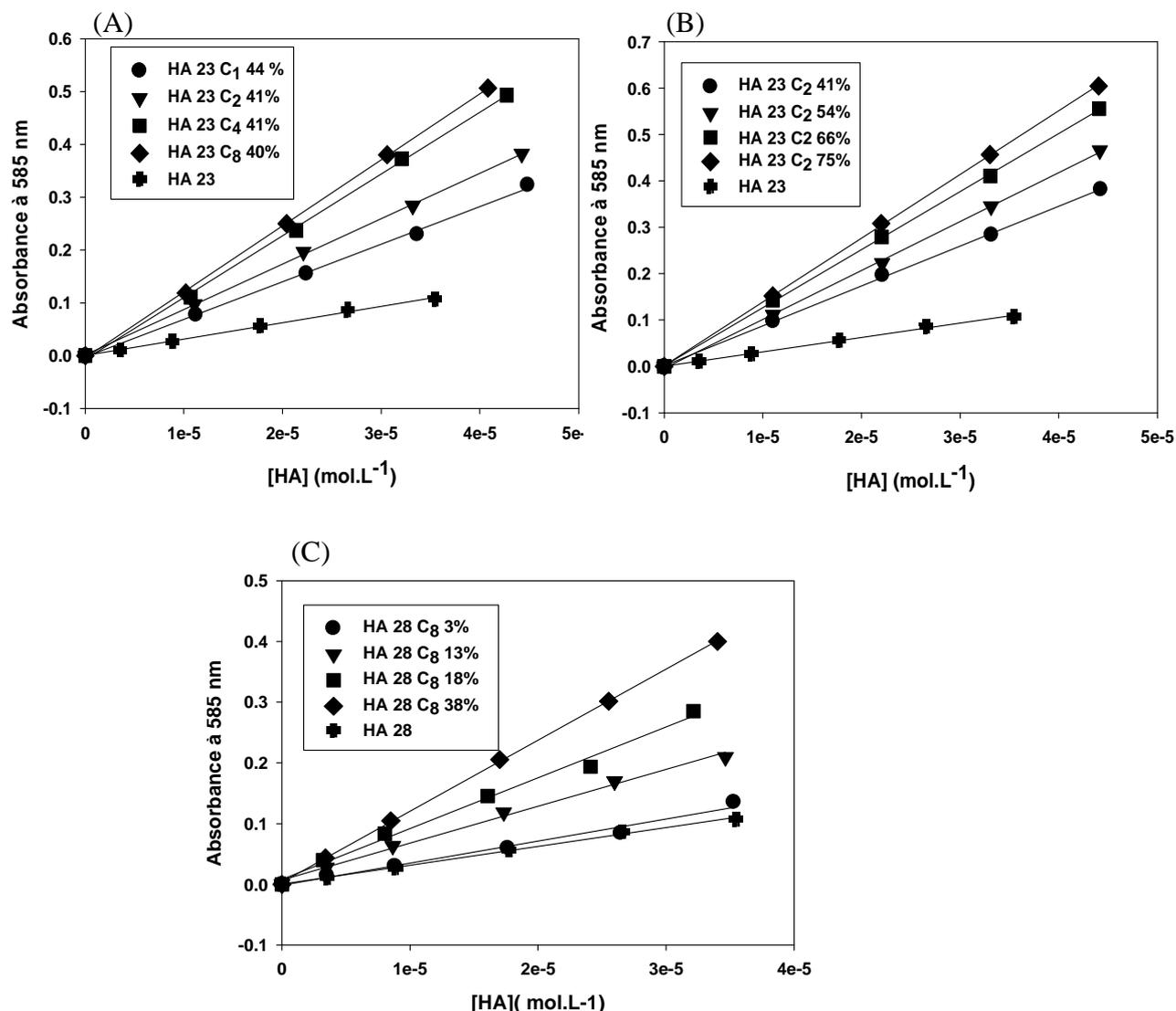


Figure 80 : Courbes d'étalonnage de la méthode de Reissig réalisées pour les esters de HA 28 solubilisés dans l'eau pure
 (A) variation de la longueur de la chaîne alkyle
 (B) variation du taux d'estérification en chaînes éthyle
 (C) variation du taux d'estérification en chaînes octyle

Les courbes d'étalonnage présentées par la figure 80 indiquent des changements de coefficient d'extinction molaire selon l'ester de HA analysé. Les courbes d'étalonnage sont rassemblées sur trois graphiques en fonction de la longueur de la chaîne alkyle (figure 80 (A)), en fonction du taux d'estérification en chaînes éthyle (figure 80 (B)) et octyle (figure 80 (C)). Nous observons que le coefficient d'extinction molaire augmente lorsque la longueur de la chaîne alkyle augmente et lorsque le taux d'estérification en chaîne éthyle ou octyle augmente.

Des essais ont été réalisés dans les mêmes conditions que précédemment avec les fragments HA 500 estérifiés. Les résultats sont résumés sur la figure suivante

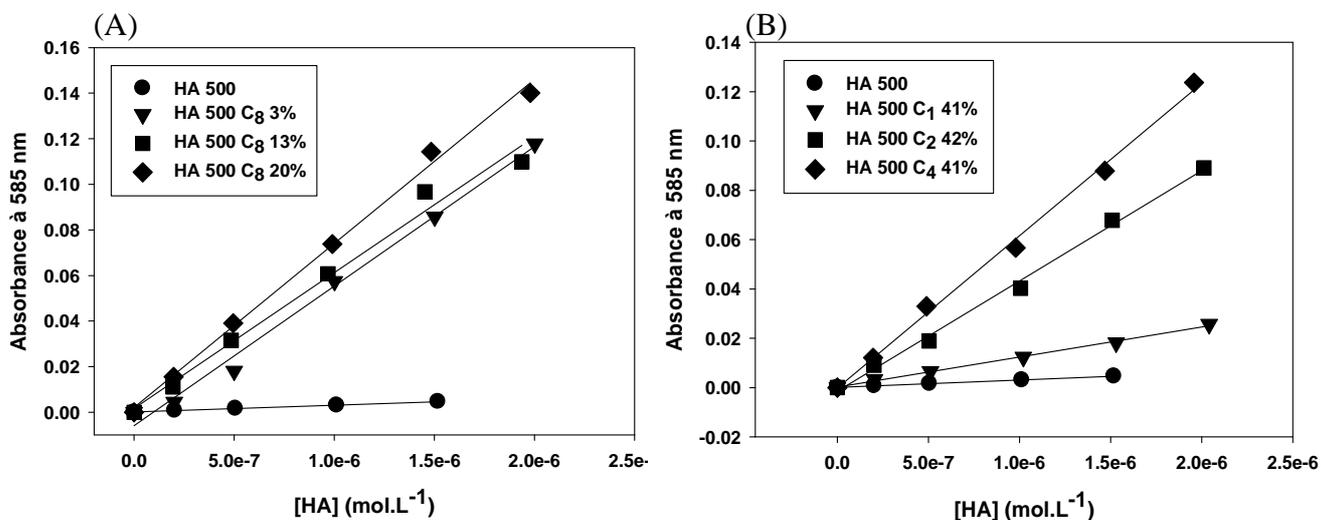


Figure 81 : Courbes d'étalonnage de la méthode de Reissig réalisées pour les esters de HA 500 solubilisés dans l'eau pure
 (A) variation du taux d'estérification en chaînes octyl
 (B) variation de la longueur de la chaîne alkyle

Les courbes d'étalonnage de la figure 48 diffèrent selon l'ester HA 500 analysé. Sur la figure 81 (A), nous observons des coefficients d'extinction molaire très élevés par rapport à celui du précurseur. Dans le cas des HA 28 octylés, nous observons une augmentation du coefficient d'extinction molaire lorsque le taux d'estérification augmente. Cependant, contrairement à ce que nous observons dans le cas des HA 28 octylés, les coefficients d'extinction molaire pour les HA 500 octylés varient peu en fonction du taux d'estérification en chaînes octyle. La figure 81 B montre une augmentation du coefficient d'extinction molaire lorsque la longueur de la chaîne alkyle augmente. Cette variation est la même que dans le cas des HA 23 estérifiés. Selon une étude menée précédemment dans notre équipe (Levasseur, 2006), le coefficient d'extinction molaire d'un HA estérifié se décompose en deux parties : une contribution correspondant à une extrémité réductrice N-acétyl glucosamine liée à un acide glucuronique non estérifié (ϵ_0) et une seconde contribution correspondant à une extrémité réductrice N-acétyl-glucosamine liée à un acide glucuronique estérifié (ϵ_1). La valeur de ϵ_1 est différente selon la longueur de la chaîne alkyle et son importance sur la valeur finale de ϵ est liée au taux d'estérification.

L'estérification influence donc la réponse du point de vue de l'absorbance pour le composé coloré de la méthode de Reissig. La nature chimique du substituant

en position 3 de la N-acétyl-glucosamine influence la formation du complexe coloré. Il était donc nécessaire d'effectuer un étalonnage pour chaque ester pour pouvoir par la suite convertir les résultats d'absorbance obtenus en concentrations d'extrémités réductrices ([ER]) et également en masse molaire.

IV.B. Influence de l'estérification sur l'hydrolyse enzymatique à concentration en HA fixe

Nous savons d'après la littérature (Hirano *et al.*, 2005) que lorsque le HA est estérifié à 100% en chaîne méthyle, la HAase testiculaire bovine ne peut catalyser son hydrolyse. Le HA reste alors intact. Connaissant donc le comportement de la HAase vis-à-vis d'un HA totalement estérifié, il est intéressant d'étudier son comportement vis-à-vis d'un HA partiellement estérifié avec des chaînes alkyle différentes. Avec l'étalonnage correspondant à chaque ester de HA, nous pouvons à présent étudier l'impact de l'estérification sur la réaction d'hydrolyse enzymatique catalysée par la HAase testiculaire bovine. Nous allons étudier tout d'abord l'effet de la longueur de la chaîne alkyle puis l'effet du taux d'estérification en fixant pour chaque réaction les conditions enzymatiques suivantes :

$$[\text{HA}] = 1 \text{ g.L}^{-1} ; [\text{HAase}] = 1 \text{ g.L}^{-1} ; [\text{NaCl}] = 0,15 \text{ mol.L}^{-1} ; \text{pH} = 4$$

IV.B.1. Influence de la longueur de la chaîne alkyle

Nous avons tout d'abord testé les esters méthylés, éthylés, butylés et octylés à 40% préparés à partir du HA 23 puis ceux préparés à partir du HA 500 et avons étudié leur influence sur l'hydrolyse enzymatique catalysée par la HAase. Nous souhaitons savoir via ces analyses si seule l'estérification de l'acide glucuronique du HA influe sur l'hydrolyse enzymatique ou si le choix de la chaîne alkyle peut également avoir son importance. Les cinétiques obtenues sont présentées sur les figures 82 et 83.

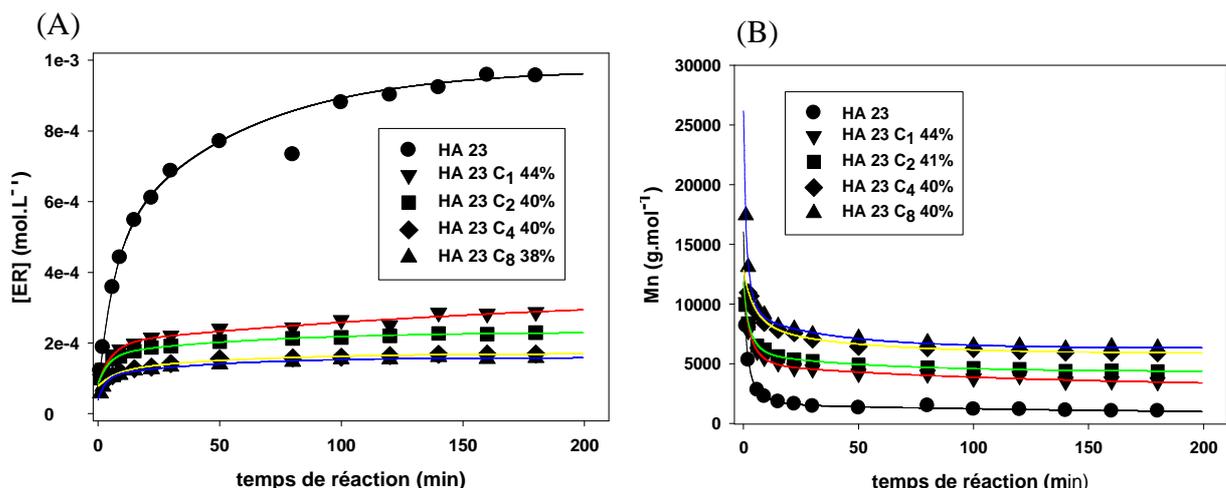


Figure 82 : superposition de suivis cinétiques d'hydrolyse enzymatique du précurseur HA 23 réalisées sur les esters méthyle, éthyle, butyle et octyl exprimés en [ER] (A) et en Mn (B). [HA] = 1 g.L⁻¹ ; [HAase] = 1 g.L⁻¹ ; [NaCl] = 0,15 mol.L⁻¹ ; pH = 4

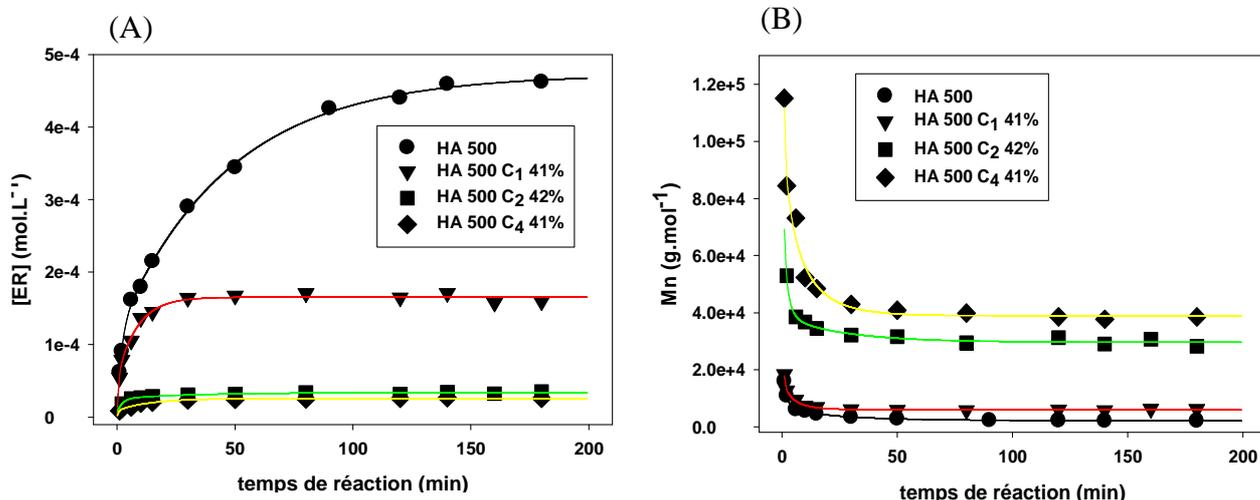


Figure 83 : superposition de suivis cinétiques d'hydrolyse enzymatique du précurseur HA 500 réalisées sur les esters méthyle, éthyle et butyle exprimés en [ER] (A) et en Mn (B). [HA] = 1 g.L⁻¹ ; [HAase] = 1 g.L⁻¹ ; [NaCl] = 0,15 mol.L⁻¹ ; pH = 4

Les figures 82 et 83 présentent les cinétiques obtenues pour les fragments de HA 23 et HA 500 à un taux d'estérification fixé à environ 40%. Sur les figures 82 (A) et 83 (A), les courbes sont tracées en termes de concentration molaire d'extrémités réductrices N-acétylglucosamine ([ER]) formées au cours de l'hydrolyse en fonction du temps de réaction. Comme expliqué de façon détaillée dans la partie Matériel et Méthodes (paragraphe IV.A.4), ces courbes sont le résultat de la conversion des valeurs d'absorbance, obtenues lors de l'analyse spectrophotométrique, via les droites d'étalonnage réalisées pour chaque ester. Les figures 82 (B) et 83 (B) présentent l'évolution de \overline{Mn} en fonction du temps de réaction correspondant aux courbes

précédentes. Les allures des courbes obtenues dans les figures 82 et 83 sont identiques à celles obtenues dans les études précédentes menées au laboratoire pour du HA natif ainsi que pour des fragments (Tranchepain *et al.*, 2006). Cela signifie que nous observons une courbe de cinétique en deux parties. La première partie montre une augmentation rapide de la concentration en extrémités réductrices au début de la réaction puis celle-ci s'infléchit et tend vers un palier qui indique la fin de l'hydrolyse.

Concernant le HA 23 précurseur (figure 82 (A)), la concentration d'extrémités réductrices augmente rapidement pendant environ 30 minutes, puis au-delà, la vitesse de formation des extrémités réductrices ralentit de façon importante. Concernant les esters de HA correspondants, la première partie de la courbe s'étend sur 15 minutes environ soit deux fois moins de temps que dans le cas du précurseur HA 23. Les courbes tendent par la suite vers des paliers. Nous observons que ces paliers se situent à des niveaux différents. La valeur de concentrations d'extrémités réductrices atteintes par ces paliers diminue lorsque la longueur de la chaîne alkyle augmente. La figure 82 (B) montre en parallèle des paliers correspondant à des valeurs de \overline{Mn} qui augmentent avec la longueur de la chaîne alkyle.

Concernant le précurseur HA 500 (figure 83 (A)), l'augmentation de la concentration en extrémités réductrices de la première partie de la courbe apparaît plus lente que dans le cas du HA 23. Elle s'étend sur 50 minutes environ puis tend vers un palier. Concernant les esters de HA 500, les premières parties de courbes sont obtenues dans un temps de plus en plus court soit environ 25 minutes pour le HA 500 C₁ 41%, et environ 10 minutes pour le HA 500 C₂ 42% et le HA 500 C₄ 41%. Les paliers sont donc atteints de plus en plus rapidement. Nous observons également que, comme dans le cas des fragments de HA 23, les paliers atteignent des valeurs de concentration d'extrémités réductrices plus faibles lorsque la chaîne alkyle est plus longue. Les esters HA 500 C₂ 42% et HA 500 C₄ 41% se stabilisent à des valeurs particulièrement basses. En parallèle, la figure 83 (B) montre que les paliers atteignent des valeurs de Mn augmentant avec la longueur de la chaîne alkyle.

Sachant que chaque fragment étudié dans cette partie est estérifié à 40% en chaîne alkyle, la diminution d'extrémités réductrices au bout de trois heures d'hydrolyse enzymatique devrait être la même pour l'ensemble des esters. Cette diminution devrait être de l'ordre de 40% car l'enzyme n'hydrolyse pas les liaisons $\beta(1-4)$ adjacentes aux acides glucuroniques estérifiés soit 40% de ces liaisons.

Cependant, les résultats ne montrent pas des valeurs d'extrémités réductrices identiques pour chaque ester. Les valeurs d'extrémités réductrices et donc de \overline{Mn} dépendent du choix de la chaîne alkyle. L'augmentation de la longueur de la chaîne alkyle induit une diminution des extrémités réductrices en fin d'analyse. Cette diminution est davantage marquée lorsque la masse molaire du fragment précurseur est plus forte.

L'ensemble des courbes des figures 82 et 83 (A) a été lissé par la méthode de lissage bi-exponentielle détaillée dans la partie Matériel et Méthodes (paragraphe IV.A.5). Ceci nous a permis de déterminer la vitesse initiale pour chaque courbe. Nous avons tracé l'évolution de la vitesse initiale en fonction de la longueur de la chaîne alkyle. Nous avons également tracé en parallèle l'évolution de la \overline{Mn} obtenue au bout de 3 heures d'hydrolyse enzymatique en fonction de la longueur de la chaîne alkyle. Ces résultats sont résumés sur la figure suivante.

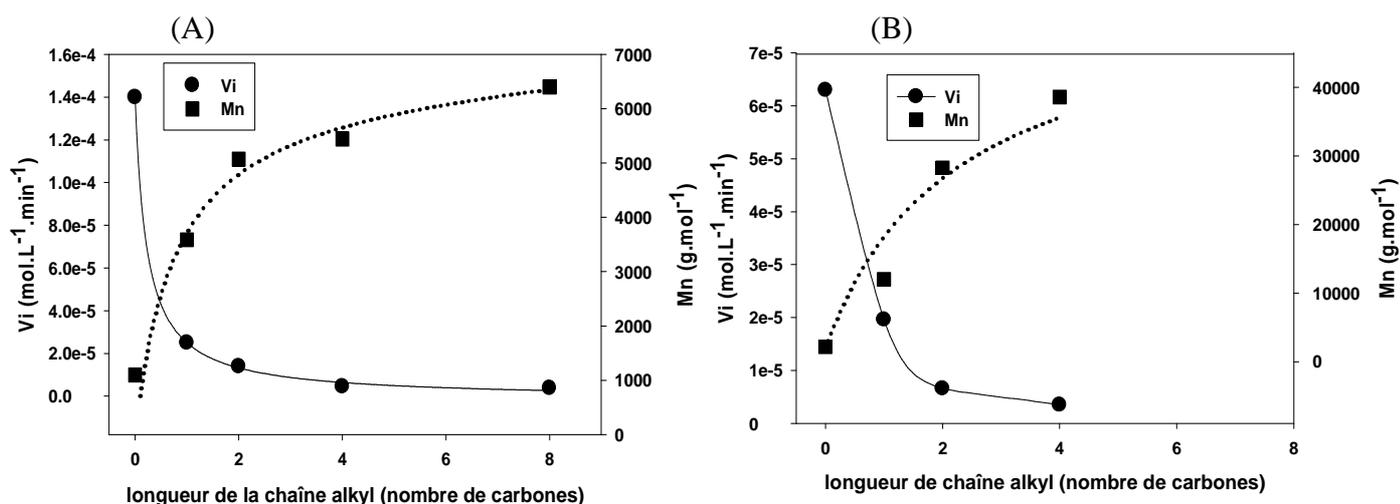


Figure 84 : Evolution de la vitesse initiale d'hydrolyse et de la \overline{Mn} en fonction de la longueur de la chaîne alkyle pour les esters de HA 23 (A) et de HA 500 (B)
 $[HA] = 1 \text{ g.L}^{-1}$; $[HAase] = 1 \text{ g.L}^{-1}$; $[NaCl] = 0,15 \text{ mol.L}^{-1}$; $\text{pH} = 4$

La figure 84 montre que la vitesse initiale (V_i) ainsi que la \overline{Mn} évoluent en fonction de la longueur de la chaîne alkyle pour les esters de HA 23 et de HA 500. Nous observons tout d'abord que la vitesse initiale du précurseur HA 500 est environ deux fois plus faible que celle du HA 23. Lors d'une étude précédente menée au laboratoire (Deschrevel *et al.*, 2008), il a également été observé que les vitesses initiales sont maximales pour des masses molaires de HA comprises entre 20 000 g.mol⁻¹ et 200 000 g.mol⁻¹. Au-delà, la vitesse initiale diminue et atteint la moitié de la

valeur maximale pour un fragment de 500 000 g.mol⁻¹. Ce phénomène est attribué à la formation de domaines d'exclusion au sein de la molécule de HA lorsque la masse molaire de celle-ci devient importante.

Concernant les esters de HA, nous observons les mêmes tendances quelque soit le précurseur. La figure 84 présente une diminution de la vitesse initiale ainsi qu'une augmentation de la Mn au bout de trois heures de réaction lorsque la longueur de la chaîne alkyle augmente. Nous constatons que l'estérification induit une gêne augmente davantage avec l'augmentation de la longueur de la chaîne alkyle. Diminuer la vitesse initiale, c'est à dire ralentir la cinétique de réaction ne permet pas d'atteindre au bout de trois heures de réaction une concentration d'extrémités réductrices environ égale à 60% de celle obtenue pour le fragment précurseur HA 23 ou HA 500.

IV.B.2. Influence du taux d'estérification (chaînes éthyle et octyle)

Il est intéressant, à présent, d'étudier l'influence du taux d'estérification en utilisant des esters avec des longueurs de chaînes alkyle très différentes : chaînes éthyle et octyle. Les précurseurs HA 23 et HA 28 sont les fragments issus de deux productions enzymatiques de fragments et ont des \overline{Mn} très proches qui sont respectivement de 22 600 et 28 200 g.mol⁻¹. Nous avons réalisé des essais avec les esters de HA 23 éthylés et HA 28 octylés dans les mêmes conditions enzymatiques que l'étude précédente. Les résultats sont résumés sur les figures suivantes.

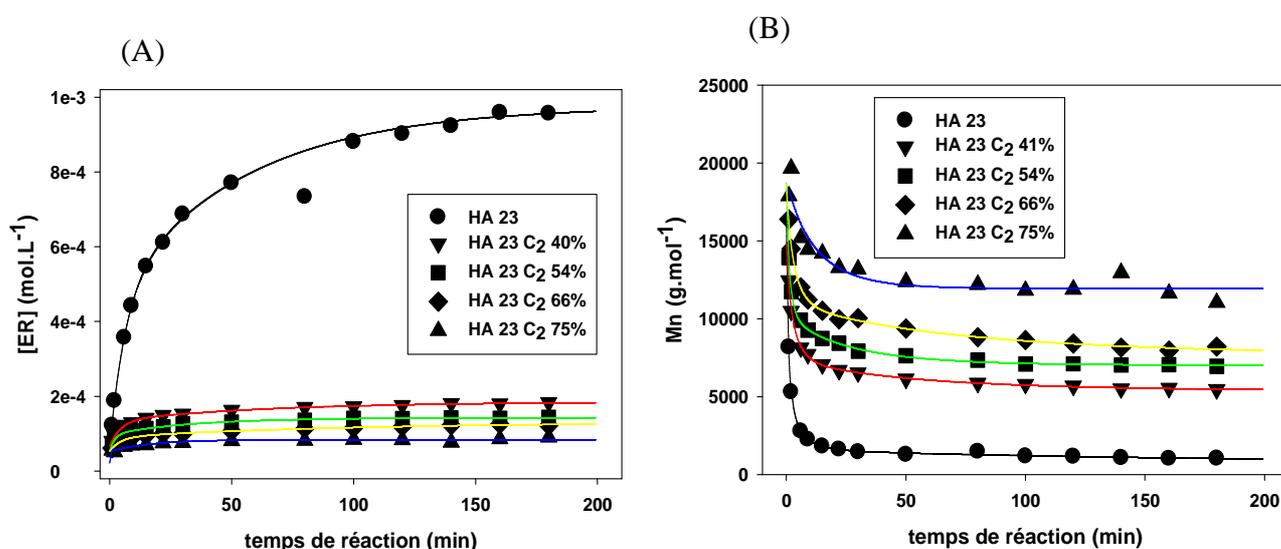


Figure 85 : superposition de suivis cinétiques d'hydrolyse enzymatique du précurseur HA 23 réalisées sur les esters éthylés exprimés en [ER] (A) et en Mn (B).
 $[HA] = 1 \text{ g.L}^{-1}$; $[HAase] = 1 \text{ g.L}^{-1}$; $[NaCl] = 0,15 \text{ mol.L}^{-1}$; $\text{pH} = 4$

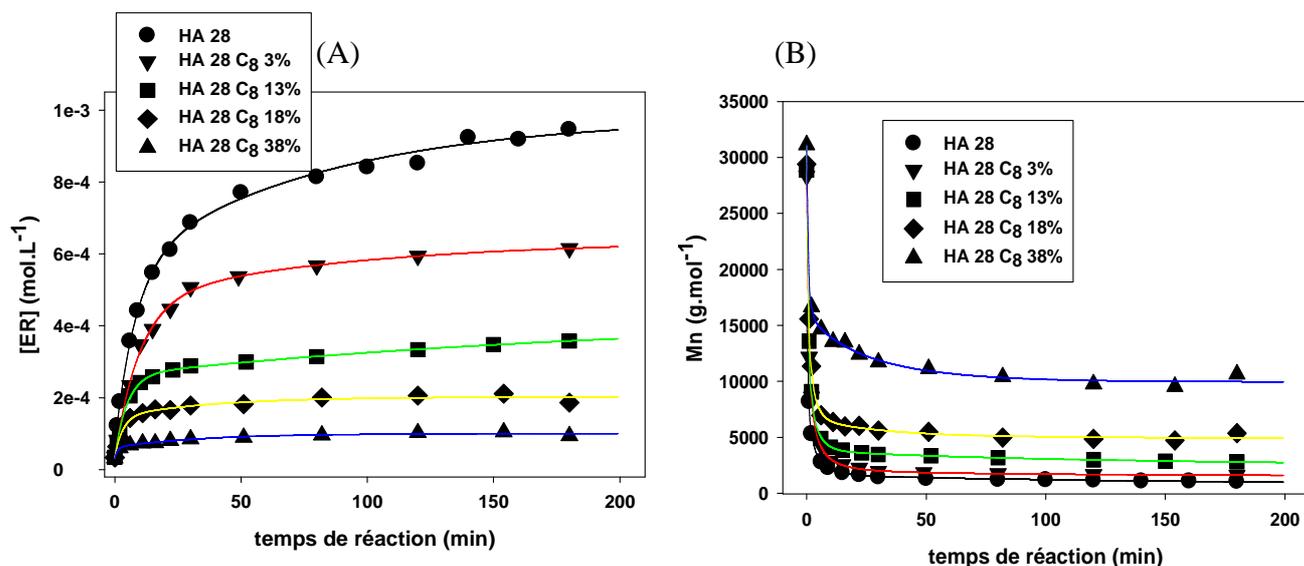


Figure 86 : superposition de suivis cinétiques d'hydrolyse enzymatique du précurseur HA 28 réalisées sur les esters éthylys exprimés en [ER] (A) et en Mn (B).
 $[HA] = 1 \text{ g.L}^{-1}$; $[HAase] = 1 \text{ g.L}^{-1}$; $[NaCl] = 0,15 \text{ mol.L}^{-1}$; $\text{pH} = 4$

Les précurseurs HA 23 et HA 28 ont des comportements cinétiques très similaires c'est-à-dire une première partie où l'augmentation de la concentration molaire en extrémités réductrices est rapide pendant 30 minutes puis la vitesse diminue pour tendre vers un palier.

Nous observons que, comme précédemment, les courbes des esters de HA 23 et HA 28 (figures 85 (A) et 86 (A)) atteignent, plus rapidement que leur précurseur, un palier indiquant la fin de la réaction. La hauteur du palier diminue lorsque le taux d'estérification augmente. Dans le cas des esters octylés où les taux d'estérification varient de 3% à 38%, la hauteur des paliers diminuent progressivement. En revanche, pour les esters éthylys où les taux d'estérification varient entre 40% et 75%, la hauteur des paliers est très faible. En parallèle, les \overline{Mn} obtenues au bout de trois heures de réaction (figure 85 et 86 (B)) augmentent lorsque le taux d'estérification augmente.

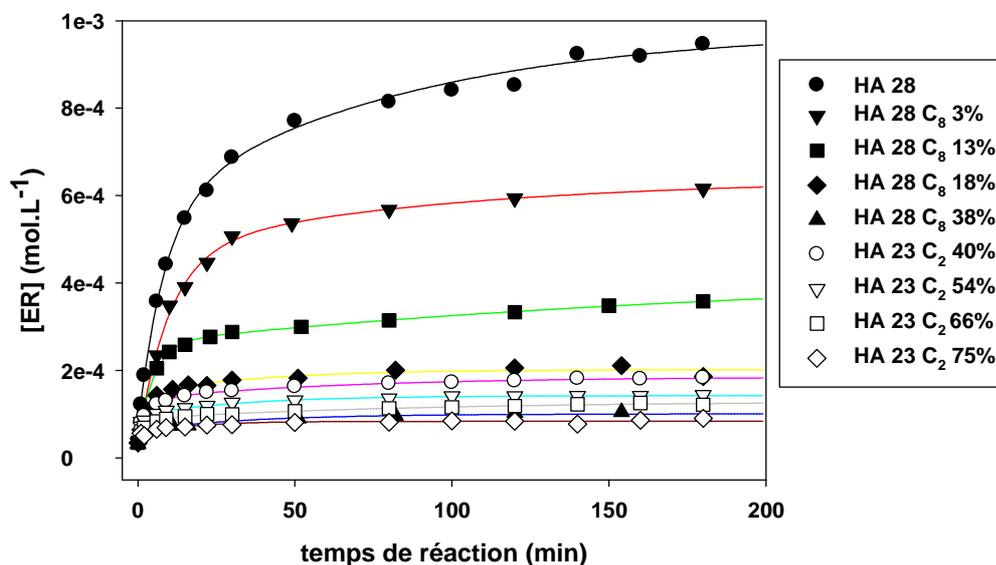


Figure 87 : superposition des suivis cinétiques d'hydrolyse enzymatique réalisés sur les esters éthylés et octylés exprimés en [ER].
 $[HA] = 1 \text{ g.L}^{-1}$; $[HAase] = 1 \text{ g.L}^{-1}$; $[NaCl] = 0,15 \text{ mol.L}^{-1}$; $\text{pH} = 4$

La figure 87 présente la superposition sur la même figure des cinétiques d'hydrolyse enzymatique réalisées pour les esters éthylés et octylés. En superposant ces cinétiques, nous constatons une diminution du palier de fin de réaction et donc de la concentration en extrémités réductrices en fonction du taux d'estérification bien que les chaînes alkyle soient différentes. Cependant le cas du HA 28 C₈ 38% est différent. La valeur d'extrémités réductrices atteinte au bout de trois heures de réaction pour cet ester est très proche de la valeur atteinte par le HA 23 C₂ 75%. Le cas particulier du HA 28 C₈ 38% montre à nouveau l'importance du choix de la longueur de la chaîne alkyle.

A partir du lissage bi-exponentiel des courbes de cinétiques des esters éthylés et octylés, nous avons déterminé les vitesses initiales de réaction d'hydrolyse. Nous avons suivi l'évolution de la vitesse initiale en fonction du taux d'estérification ainsi que celle de la \overline{Mn} obtenue au bout de trois heures de réaction. Les résultats sont résumés sur la figure 88.

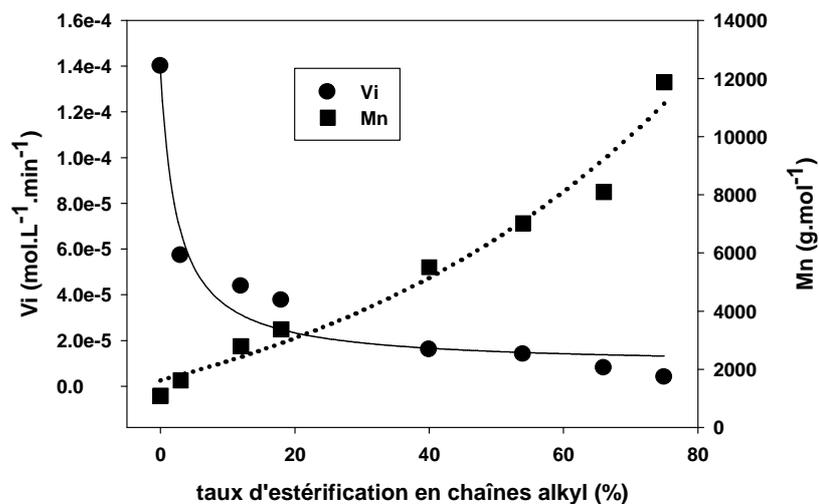


Figure 88 : Evolution de la vitesse initiale d'hydrolyse et de la \overline{Mn} en fonction du taux d'estérification pour les esters de HA 23 éthylés et octylés
 $[HA] = 1 \text{ g.L}^{-1}$; $[HAase] = 1 \text{ g.L}^{-1}$; $[NaCl] = 0,15 \text{ mol.L}^{-1}$; $\text{pH} = 4$

Nous observons que, quelque soit la chaîne alkyle étudiée, la vitesse de réaction diminue et la \overline{Mn} augmente (figure 88) lorsque le taux d'estérification augmente. La diminution de V_i est plus importante lorsque le taux d'estérification est supérieur à 40% même pour des chaînes alkyle courtes comme la chaîne éthyle. La vitesse initiale est réduite environ de 10 fois pour 40% d'estérification en chaînes éthyle. Cependant elle est réduite déjà de 2 fois dès 3% d'estérification en chaînes octyle. En parallèle, la \overline{Mn} atteint 12 000 g.mol^{-1} pour 75% d'estérification en chaîne éthyle et 11 000 g.mol^{-1} pour 38% d'estérification en chaîne octyle soit une \overline{Mn} 10 fois supérieure à la Mn des précurseurs au bout de trois heures d'hydrolyse. La chaîne octyle ayant un effet plus marqué sur l'hydrolyse, nous avons estérifié des fragments de HA 500 en chaînes octyle et nous avons effectué les mêmes analyses de cinétiques. Les résultats sont résumés sur la figure 89.

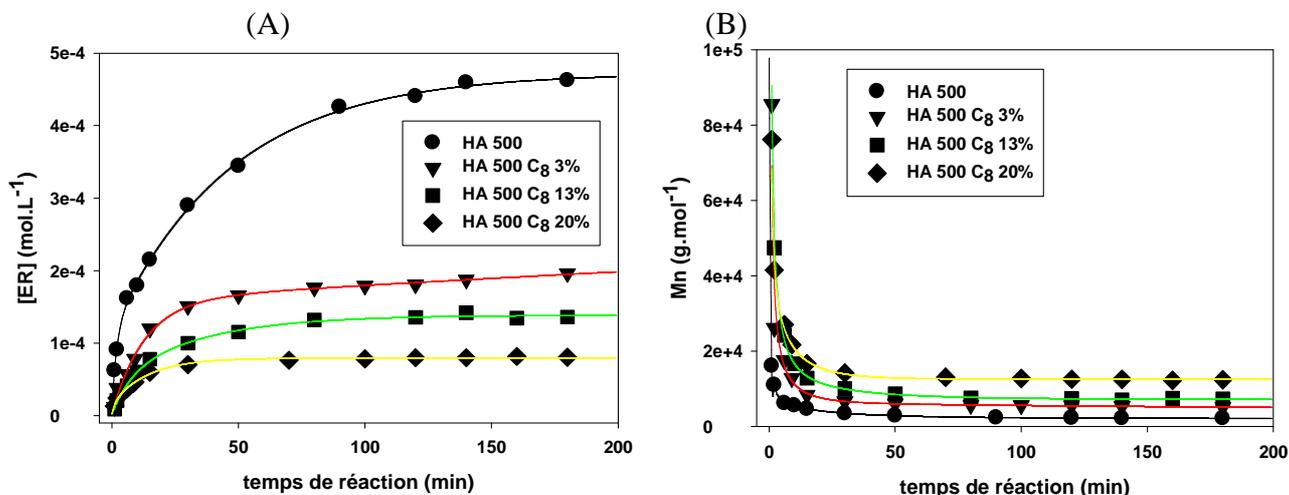


Figure 89 : superposition de suivis cinétiques d'une hydrolyse enzymatique du précurseur HA 500 réalisées sur les esters octylés exprimés en [ER] (A) et en \overline{Mn} (B).
 $[HA] = 1 \text{ g.L}^{-1}$; $[HAase] = 1 \text{ g.L}^{-1}$; $[NaCl] = 0,15 \text{ mol.L}^{-1}$; $\text{pH} = 4$

Avec les fragments de HA 500 octylés, nous observons que les courbes de cinétiques atteignent rapidement des paliers indiquant la fin de la réaction d'hydrolyse (figure 89 (A)). La hauteur du palier diminue lorsque le taux d'estérification augmente. La hauteur du palier est très faible dès 3% d'estérification en chaîne octyle. La réaction se stabilise à une concentration d'extrémités réductrices d'environ $2.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ soit une \overline{Mn} de 5 000 g.mol^{-1} (figure 89 (B)), c'est-à-dire 2 fois plus que lors de l'hydrolyse du précurseur HA 500. Nous traçons, comme dans les cas précédents, d'une part l'évolution de V_i , déterminée par lissage bi-exponentiel, et d'autre part l'évolution de la \overline{Mn} obtenue au bout de 3 heures de réaction en fonction du taux d'estérification en chaîne octyle. Les résultats sont résumés sur la figure 90.

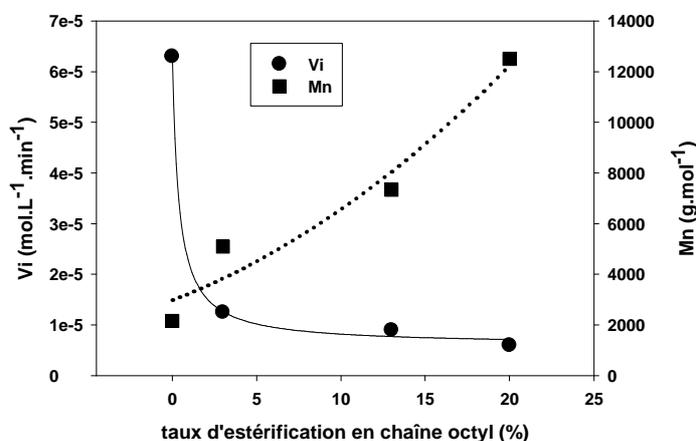


Figure 90 : Evolution de la vitesse initiale d'hydrolyse et de la \overline{Mn} en fonction de la longueur de la chaîne alkyle pour les esters de HA 500 octylés
 $[HA] = 1 \text{ g.L}^{-1}$; $[HAase] = 1 \text{ g.L}^{-1}$; $[NaCl] = 0,15 \text{ mol.L}^{-1}$; $\text{pH} = 4$

Les vitesses initiales présentées par la figure 90 diminuent en fonction du taux d'estérification. Elle est divisée par six entre le HA 500 précurseur et le HA 500 C₈ 3% et est divisée par dix pour le HA 500 C₈ 20%. L'effet de l'estérification en chaînes octyle sur la vitesse initiale est plus marquée dans le cas des esters de HA 500 (figure 89) que dans le cas des esters de HA 28 (figure 84 (B)). Les \overline{Mn} obtenues au bout de 3 heures de réaction augmentent avec l'augmentation du taux d'estérification. De plus, les valeurs sont plus importantes dans le cas des esters de HA 500.

IV.B.3. Bilan

Nous avons montré que l'estérification influence de façon significative la cinétique d'hydrolyse enzymatique. Modifier la fonction carboxylate ralentit la cinétique en apportant une gêne dès l'instant initiale de la réaction. Les conditions enzymatiques choisies sont favorables pour obtenir une vitesse initiale de réaction élevée. Cependant, nous avons constaté que les vitesses initiales diminuent rapidement lorsque la longueur de la chaîne alkyle et lorsque le taux d'estérification augmentent. Il est également important de noter que les concentrations d'extrémités réductrices ou les \overline{Mn} obtenues en fin d'analyse ne sont pas proportionnelles au taux d'acide glucuronique estérifié. La longueur de la chaîne alkyle ainsi que le taux d'estérification induiraient un comportement en solution qui gênerait davantage la HAase que l'estérification seule.

IV.C. Influence de la concentration en HA sur la cinétique de l'hydrolyse enzymatique de HA estérifiés

Dans cette partie, Nous avons choisi d'observer l'évolution de la vitesse initiale de la réaction d'hydrolyse en faisant varier la concentration en HA estérifié ou non estérifié, et ainsi obtenir pour chaque ester une substrat-dépendance. Il est apparu que le taux d'estérification est un paramètre important. De plus la chaîne octyle est celle qui donne les effets les plus marquées dès les plus faibles taux d'estérification. C'est pourquoi, cette étude a été réalisée sur les esters octylés de 0% à 40% préparés à

partir de HA 28 et HA 500. Les conditions enzymatiques choisies sont les suivantes :
 $[HAase] = 0,1 \text{ g.L}^{-1}$; $[NaCl] = 0,15 \text{ mol.L}^{-1}$; $pH = 4$ et $[HA]$ variant de 0 à 2 g.L^{-1} .

IV.C.1. Substrat-dépendance des fragments de HA précurseurs

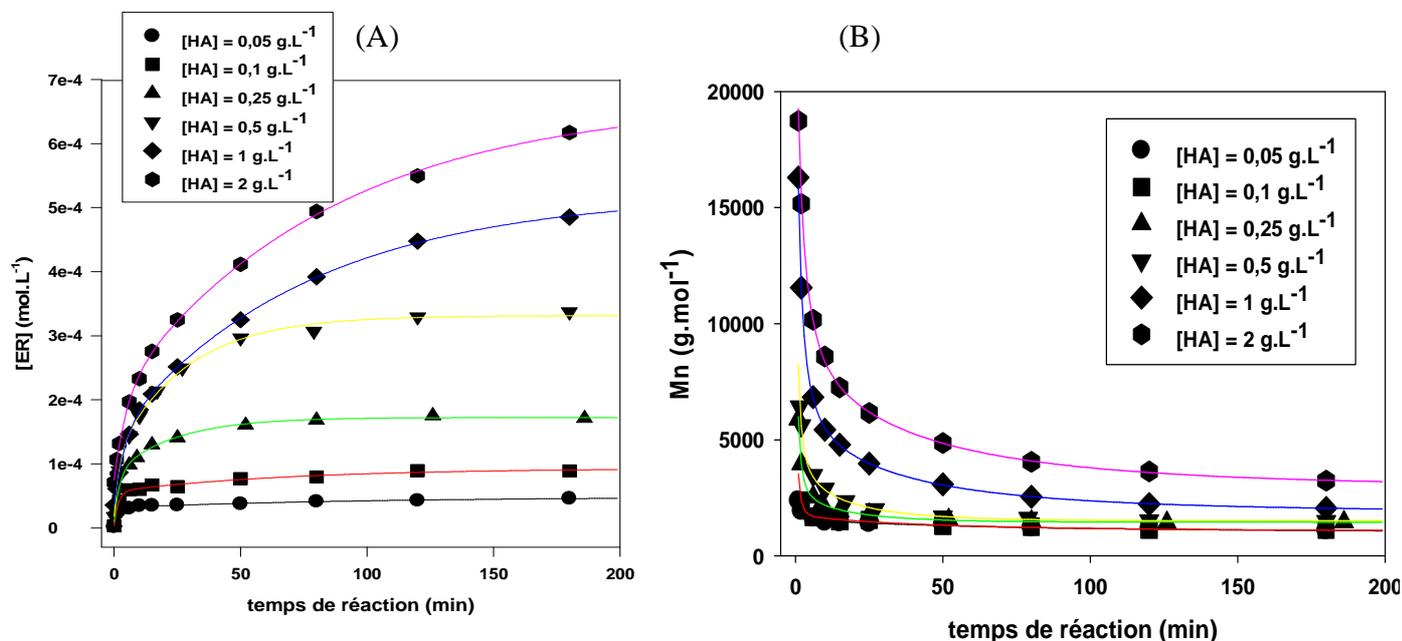


Figure 91 : superposition de suivis cinétiques d'hydrolyse enzymatique du précurseur HA 28 à différentes concentrations de HA exprimés en $[ER]$ (A) et en \overline{Mn} (B).
 $[HAase] = 0,1 \text{ g.L}^{-1}$; $[NaCl] = 0,15 \text{ mol.L}^{-1}$; $pH = 4$

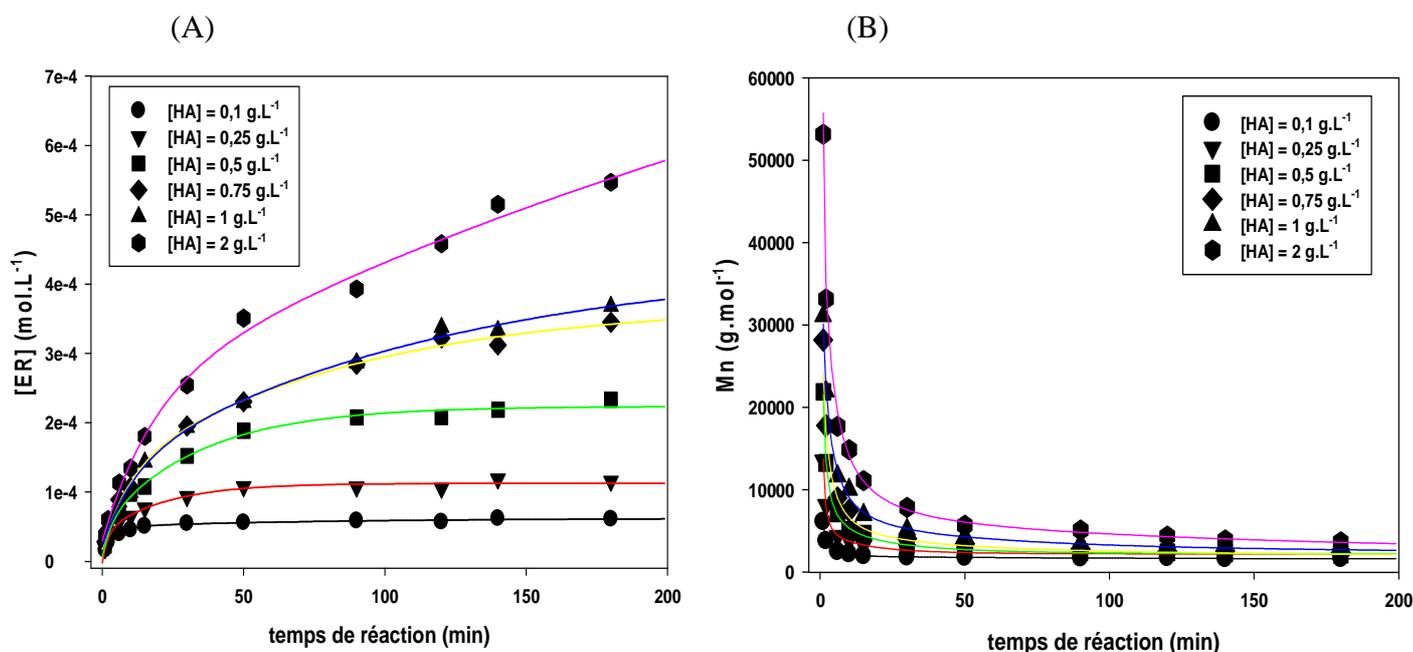


Figure 92 : superposition de suivis cinétiques d'hydrolyse enzymatique du précurseur HA 500 à différentes concentrations de HA exprimés en $[ER]$ (A) et en \overline{Mn} (B).
 $[HAase] = 0,1 \text{ g.L}^{-1}$; $[NaCl] = 0,15 \text{ mol.L}^{-1}$; $pH = 4$

La figure 91 présente les suivis cinétiques de l'hydrolyse enzymatique du précurseur HA 28 catalysée par la HAase réalisée à différentes concentrations initiales en HA. La figure 92 présente les suivis cinétiques réalisés dans les mêmes conditions que dans le cas de la figure 91 pour le précurseur HA 500. Les cinétiques suivies par la méthode de Reissig permettent de les exprimer en terme d'une part d'évolution de concentrations d'extrémités réductrices N-acétylglucosamine formées ([ER]), c'est-à-dire en concentration de liaisons glycosidiques $\beta(1-4)$ hydrolysées en fonction du temps de réaction et d'autre part en terme d'évolution de Mn en fonction du temps.

Ces courbes de cinétiques sont lissées au moyen du modèle bi-exponentiel (Vincent *et al.*, 2003) décrit plus en détail dans la partie Matériels et Méthodes. Ceci permet d'accéder à la vitesse initiale de la réaction et d'obtenir son évolution en fonction de la concentration en HA soit une substrat-dépendance. Nous allons ainsi pouvoir étudier une substrat-dépendance pour chacun des deux HA précurseurs HA 28 et HA 500.

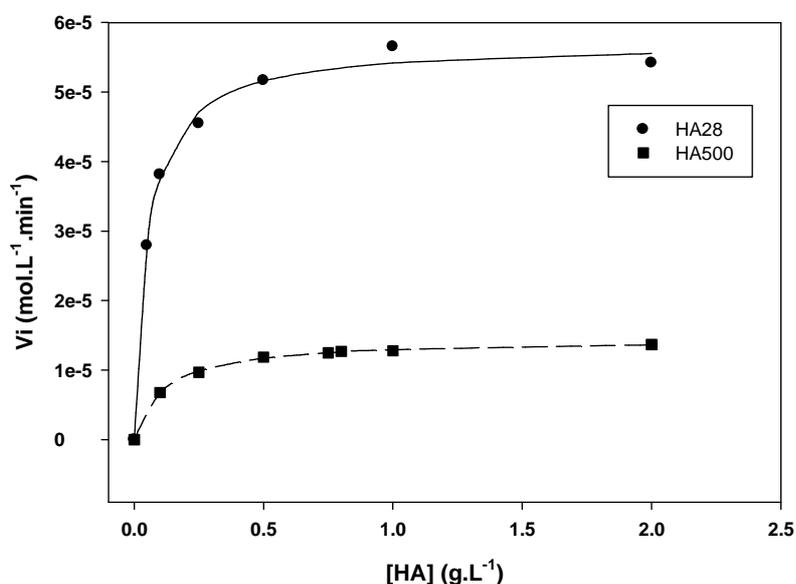


Figure 93 : Comparaison des substrat-dépendances de la réaction d'hydrolyse des précurseurs HA 28 et HA 500 catalysée par la HAase
 $[HAase] = 0,1 \text{ g.L}^{-1}$; $[NaCl] = 0,15 \text{ mol.L}^{-1}$; $pH = 4$

La figure 93 permet d'observer que les substrat-dépendances ont une allure de type Michaëlis et Menten (1913) c'est-à-dire que V_i augmente de façon hyperbolique avec la concentration en HA jusqu'à une valeur limite. Dans cette gamme de concentration en HA et étant en présence de $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$ de force ionique, nous

n'observons pas de phénomène de complexation électrostatique entre le HA et la HAase qui se manifeste dans le cas du HA natif par une diminution de V_i pour les concentrations les plus élevées en HA (Asteriou, 2006 ; Deschrevel *et al.*, 2008 ; Vincent et Lenormand, 2009). Ce phénomène n'est donc pas prédominant sur la réaction d'hydrolyse dans nos conditions expérimentales. Elles nous permettent d'accéder aux deux constantes de Michaëlis, la vitesse maximale (V_m), et la constante de Michaëlis (K_m). Comme expliqué dans la partie bibliographique, chaque couple V_m , K_m est caractéristique d'un système enzyme-substrat dans des conditions données.

Il est tout d'abord intéressant de remarquer que l'allure des substrat-dépendances diffère lorsque la masse molaire du HA est différente avant hydrolyse enzymatique. Les vitesses initiales obtenues pour le HA 500 sont plus faibles que celles obtenues pour le HA 28. Bien que les conditions enzymatiques choisies soient différentes, cette observation est en accord avec des résultats réalisés à pH 5 lors de la thèse de F. Tranchepain (Tranchepain, 2004 ; Deschrevel *et al.*, 2008). En terme de masse molaire, le HA 28 est situé dans une zone intermédiaire où des valeurs importantes de vitesses initiales sont associées à un rapprochement dans l'espace du substrat, c'est-à-dire, des liaisons $\beta(1-4)$ (Tranchepain, 2004). La concentration locale en sites sécables est plus grande que celle qui existe pour les chaînes très courtes. Le HA 500 est situé dans la dernière zone, au-dessus d'une \overline{Mn} de 90 000 g.mol⁻¹, où la vitesse initiale diminue car à partir de cette masse molaire, il se crée des domaines d'exclusion rendant moins accessibles certaines liaisons $\beta(1-4)$. De plus, la pente au début de la courbe est plus faible pour le HA 500 que celle de la courbe du HA 28.

A partir de ces courbes, nous pouvons accéder aux couples V_m , K_m par deux méthodes. La linéarisation est la méthode la plus anciennement utilisée. Il existe trois types de linéarisation : la linéarisation de Lineweaver-burk (Lineweaver et Burk, 1934) de Hanes-Woolf (Hanes, 1932) et de Eadie-Hoftee (Eadie, 1942 ; Hofstee, 1959).

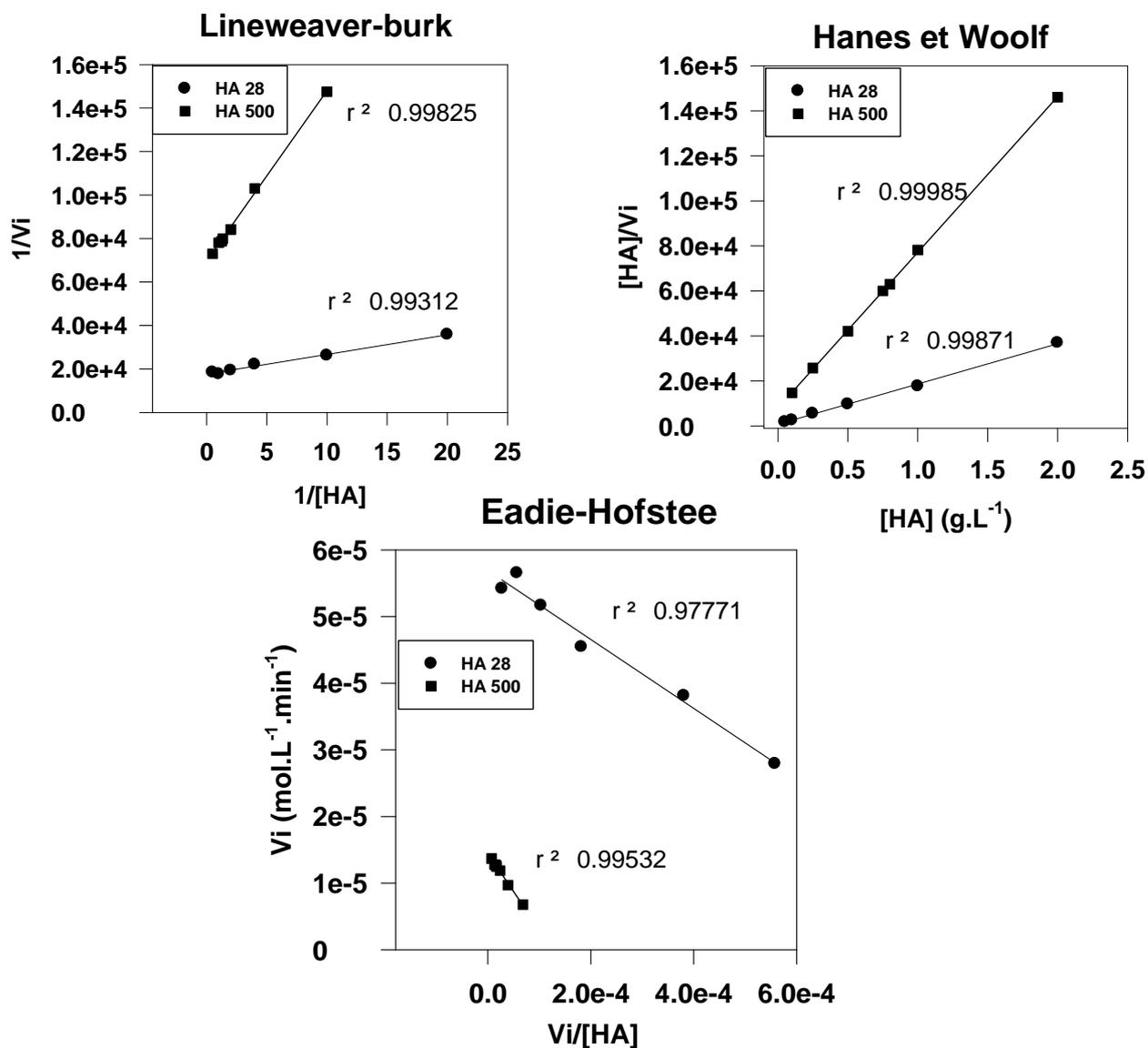


Figure 94 : Linéarisation des substrat-dépendances des précurseurs HA 28 et HA 500 par les méthodes de Lineweaver-burk, de Hanes-woolf et de Eadie-Hofstee.

La figure 94 rassemble les trois méthodes de linéarisation les plus utilisées. Elles sont employées dans le cas des substrat-dépendances des HA 28 et HA 500. Pour chaque linéarisation et quelque soit le précurseur étudié, les valeurs des coefficients de corrélation obtenus sont corrects. Ils nous permettent de confirmer que la cinétique de la réaction d'hydrolyse enzymatique du HA catalysée par la HAase obéit bien au modèle établi par Michaëlis et Menten (1913).

Ces différentes représentations facilitent la détermination des paramètres de Michaëlis. Cependant, ces représentations manquent de précision. En effet, la

représentation de Lineweaver-burk donne davantage d'importance aux valeurs expérimentales obtenues pour les faibles concentrations en HA (Dowd et Riggs, 1965). Or, il s'agit des vitesses initiales les plus faibles par conséquent possédant les incertitudes les plus grandes. Les représentations de Eadie-Hofstee ainsi que celles de Hanes-Woolf ne modifient qu'un seul axe par rapport aux substrat-dépendances, diminuant les incertitudes. Cependant V_i apparaît sur les deux axes de la courbe donc cette méthode est plus sensible aux erreurs de mesure. Hanes-Woolf serait le meilleur compromis avec une distribution plus équilibrée que celle de Lineweaver-burk et moins sensible aux erreurs de mesure que celle de Eadie-Hofstee. La meilleure approche actuellement consiste à utiliser un logiciel capable de déterminer précisément l'équation de la courbe de substrat-dépendance par régression non linéaire. Nous pouvons donc résoudre cette équation et déterminer les paramètres V_m et K_m .

	Valeur de V_m (mol.L ⁻¹ .min ⁻¹) et K_m (g.L ⁻¹)			
	Lineweaver-burk	Hanes-Woolf	Eadie-Hofstee	regression non linéaire
HA 28	$V_m = 5,7e-5$ $K_m = 0,05$	$V_m = 5,7e-5$ $K_m = 0,05$	$V_m = 5,6e-5$ $K_m = 0,04$	$V_m = 5,7e-5$ $K_m = 0,05$
HA 500	$V_m = 1,4e-5$ $K_m = 0,11$	$V_m = 1,4e-5$ $K_m = 0,11$	$V_m = 1,5e-5$ $K_m = 0,12$	$V_m = 1,4e-5$ $K_m = 0,12$

Tableau 18 : Comparaison des valeurs des paramètres de Michaëlis obtenus par différentes méthodes de linéarisation et de régression non linéaire

Le tableau 18 résume les valeurs obtenues pour les paramètres de Michaëlis en utilisant les différentes méthodes de linéarisation et de régression non linéaire. Pour le HA 28 comme pour le HA 500, les valeurs obtenues par les différentes méthodes sont très proches les unes des autres. Le tableau 18 indique cependant des différences en fonction de la masse molaire du fragment de HA précurseur. Le paramètre V_m diminue lorsque la masse molaire augmente et en parallèle le paramètre K_m augmente lorsque la masse molaire augmente. L'augmentation de K_m est également observée dans les études citées précédemment menées à pH 5 (Tranchepain, 2004). Le pH ne modifie pas les repliements de la chaîne de HA qui devient important pour le HA 500 rendant certaines liaisons $\beta(1-4)$ inaccessibles à l'hydrolyse enzymatique à l'instant initial et ne permet donc d'accéder qu'à un K_m apparent. Concernant V_m , le comportement est différent selon le pH. En effet, lors de l'étude à pH 5 réalisée précédemment (Deschrevel *et al.*, 2008), à des valeurs de masse molaires

équivalentes, les valeurs de V_m sont très proches. Dans notre cas, V_m est environ six fois plus faible pour le HA 500 que pour le HA 28. Cette différence de comportement en fonction du pH peut provenir des faibles valeurs de V_m obtenues à pH 5 où la vitesse de réaction d'hydrolyse enzymatique n'est pas maximale.

IV.C.2. Substrat-dépendance des fragments de HA octylés préparés à partir de HA 28

IV.C.2.a. Détermination des paramètres de Michaëlis

Une série d'hydrolyses enzymatiques a été réalisée pour chaque ester octylé de HA 28 de 3% à 40% en utilisant les mêmes conditions de réaction que dans le cas du précurseur HA 28. Nous avons ainsi obtenu une substrat-dépendance pour chaque ester afin de la comparer au précurseur. Les résultats sont présentés dans la figure suivante.

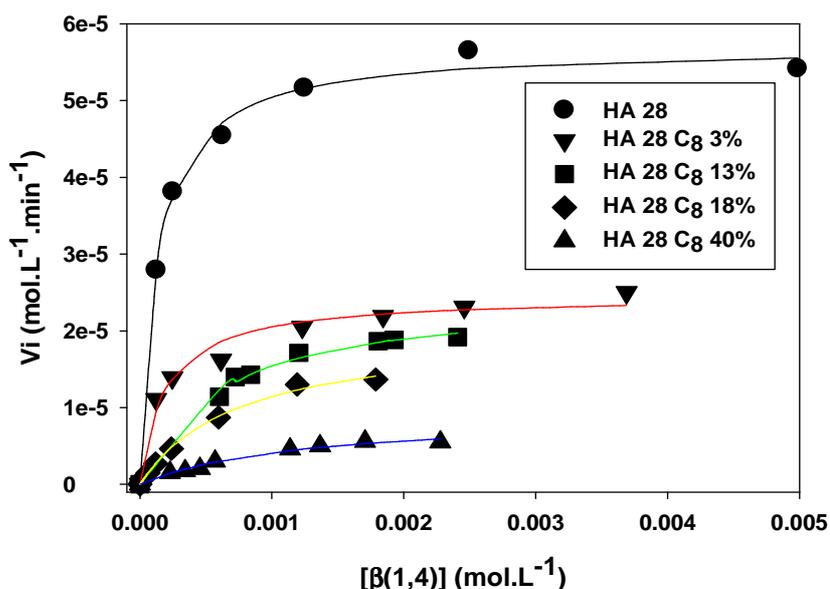


Figure 95 : Comparaison des substrat-dépendances de la réaction d'hydrolyse des esters octylés préparés à partir du HA 28 catalysée par la HAase
 $[HAase] = 0,1 \text{ g.L}^{-1}$; $[NaCl] = 0,15 \text{ mol.L}^{-1}$; $pH = 4$

La figure 95 indique que, dans cette gamme de concentration, toutes les substrat-dépendances obtenues pour les esters de HA sont de type Michaëlis-Menten comme pour le HA 28 précurseur. Afin de pouvoir les comparer nous avons tracé l'évolution des vitesses initiales en fonction de la concentration en substrat qui est dans ce cas la concentration en liaisons $\beta(1-4)$. Ces concentrations sont calculées pour chaque ester en tenant compte du taux d'estérification en chaînes octyle. Nous

observons que 3% d'estérification en chaînes octyle modifient de façon importante la courbe de substrat-dépendance par rapport au précurseur HA 28 et qu'elle évolue encore davantage lorsque nous augmentons le taux d'estérification en chaînes octyle. Les vitesses initiales mesurées diminuent de façon importante lorsque le taux d'estérification augmente dès le plus faible taux d'estérification. Nous observons également une diminution de la pente de début de la courbe lorsque le taux d'estérification augmente. Ces changements de courbes sont les mêmes que ceux observés lorsque la masse molaire du HA augmente. La méthode de détermination des paramètres michaéliens par régression non linéaire étant la plus précise, nous la choisissons pour obtenir les paramètres propres à chaque substrat-dépendance. Ces résultats sont présentés dans la figure 96.

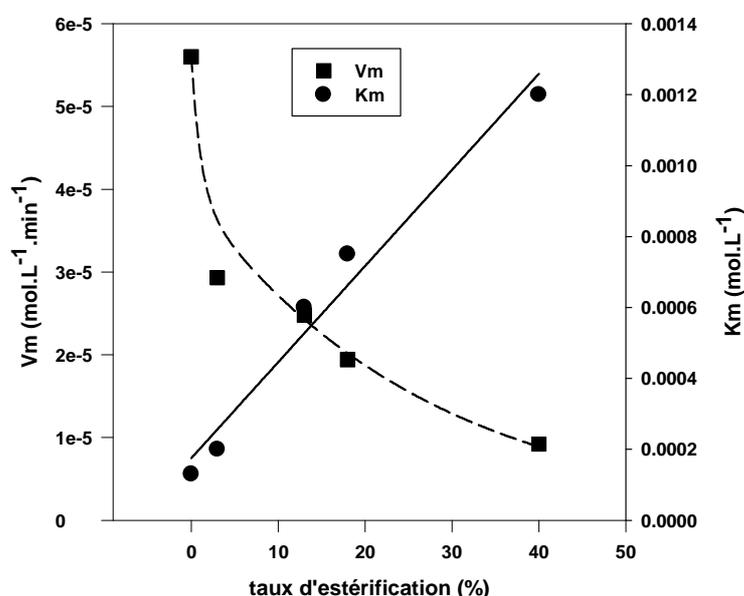


Figure 96 : Evolution des paramètres michaéliens K_m et V_m déterminés par régression non linéaire en fonction du taux d'estérification en chaînes octyle du HA

La figure 96 montre l'évolution des paramètres de Michaëlis K_m et V_m en fonction du taux d'estérification en chaînes octyle. Nous observons une diminution très marquée de V_m dès le plus faible taux d'estérification suivie d'une diminution plus lente lorsque le taux d'estérification augmente. Elle est réduite de moitié à partir de 3% d'estérification et divisée par six lorsque nous atteignons 40% d'estérification. En parallèle, nous observons une augmentation de K_m lorsque le taux d'estérification augmente. Ce paramètre augmente de manière jusqu'à 40% d'estérification en chaînes octyle. L'estérification influence donc l'étape de formation du complexe spécifique enzyme-substrat et l'étape de catalyse.

Les paramètres V_m et K_m évoluent de la même manière que lorsque nous avons comparé les paramètres de Michaëlis du HA 28 et du HA 500. Nous en déduisons que le nombre de liaisons $\beta(1-4)$ hydrolysables à l'instant initial diminue lorsque le taux d'estérification augmente. Il est intéressant de tracer à nouveau les substrat-dépendances précédentes en fonction de la concentration en liaisons $\beta(1-4)$ hydrolysables à l'instant initial et donc d'éliminer les parties estérifiées. Pour obtenir ces concentrations, nous avons soustrait à la valeur de départ le pourcentage de liaisons $\beta(1-4)$ adjacente à un monosaccharide glucuronique estérifié, correspondant au taux d'estérification, ces liaisons adjacentes ne pouvant être estérifiées. En ne conservant que les parties hydrolysables, les V_i devraient être identiques pour une concentration de liaison $\beta(1-4)$ donnée. Ces résultats sont résumés dans la figure 97.

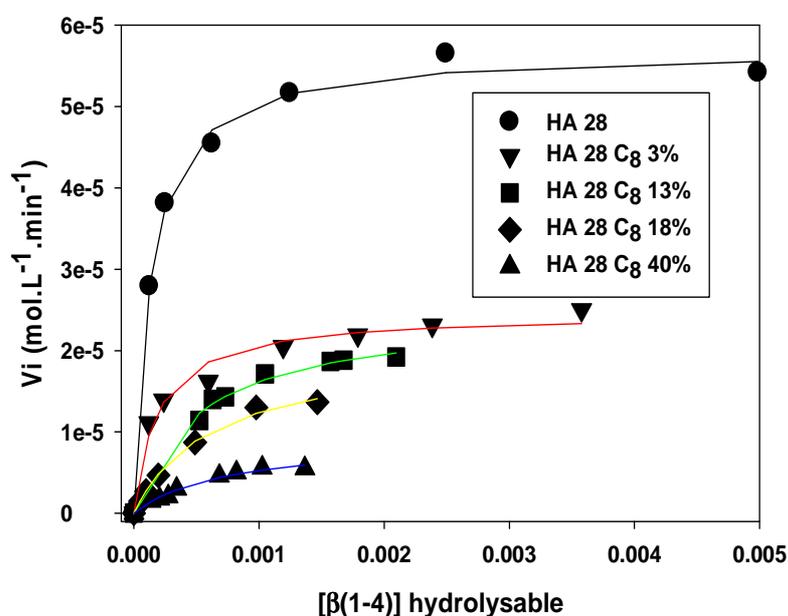


Figure 97 : Comparaison des substrat-dépendance de la réaction d'hydrolyse catalysée par la HAase des esters octylés préparés à partir du HA 28 après correction de la concentration en liaisons $\beta(1-4)$
 $[HAase] = 0,1 \text{ g.L}^{-1}$; $[NaCl] = 0,15 \text{ mol.L}^{-1}$; $pH = 4$

La figure 97 présente l'évolution, pour chaque ester octylé de HA, de la vitesse initiale en fonction de la concentration en liaisons $\beta(1-4)$ hydrolysables à l'instant initial. Nous constatons que l'allure des courbes de substrat-dépendances des différents esters de HA est très peu modifiée par la correction apportée à la concentration en substrat. Nous avons déterminé à nouveau les paramètres de Michaëlis à partir de ces nouvelles données. Les V_m ne sont pas modifiées par ce

changement de concentration. Nous observons cependant un changement au niveau du K_m . Les résultats sont résumés dans le tableau suivant.

	HA 28 C ₈ 3%	HA 28 C ₈ 13%	HA 28 C ₈ 18%	HA 28 C ₈ 40%
Km avant correction (mol.L⁻¹)	2,0e-4	6,0e-4	7,5e-4	1,2e-3
Km après correction (mol.L⁻¹)	1,9e-4	5,2e-4	6,0e-4	7,3e-4

Tableau 19 : Comparaison des valeurs du paramètre K_m obtenues avant et après correction de la concentration en substrat

Le tableau 19 montre une diminution des valeurs de K_m lorsque nous appliquons une correction à la concentration en substrat qui tient compte du taux d'estérification. Cette diminution est plus marquée pour les plus hauts taux d'estérification. Cependant les valeurs de K_m sont toujours plus élevées que la valeur obtenue pour le précurseur excepté dans le cas du HA 28 C₈ 3% où la valeur de K_m est très proche de celle du précurseur qui est de $1,3 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹. Il ne s'agit donc pas seulement d'une diminution de la concentration en substrat. Les monosaccharides glucuroniques estérifiés interagissent avec la HAase puisqu'ils modifient l'affinité de la HAase pour son substrat.

Lors d'une réaction enzymatique, une espèce capable de réduire la vitesse de réaction et de modifier les paramètres de Michaëlis V_m et K_m est appelé un inhibiteur. Les esters de HA que nous soumettons à la réaction d'hydrolyse catalysée par la HAase modifient les paramètres de Michaëlis K_m et V_m et la diminution de substrat due à l'estérification n'explique pas les résultats que nous obtenons. Le substrat de la réaction d'hydrolyse enzymatique du HA catalysée par la HAase étant la liaison $\beta(1-4)$, nous pouvons envisager que la liaison $\beta(1-4)$ adjacente à un monosaccharide glucuronique estérifié, donc le substrat modifié se comporte comme un composé inhibant la réaction d'hydrolyse. Augmenter le taux d'estérification en chaînes octyle revient donc à augmenter la concentration en inhibiteur. Il existe plusieurs types d'inhibition et il est possible de déterminer de quel type d'inhibition il s'agit en observant l'évolution des paramètres de Michaëlis ainsi que l'évolution des linéarisations de Lineweaver-burk des substrat-dépendances des fragments HA 28 octylés. L'évolution des linéarisations est présentée sur la figure 98.

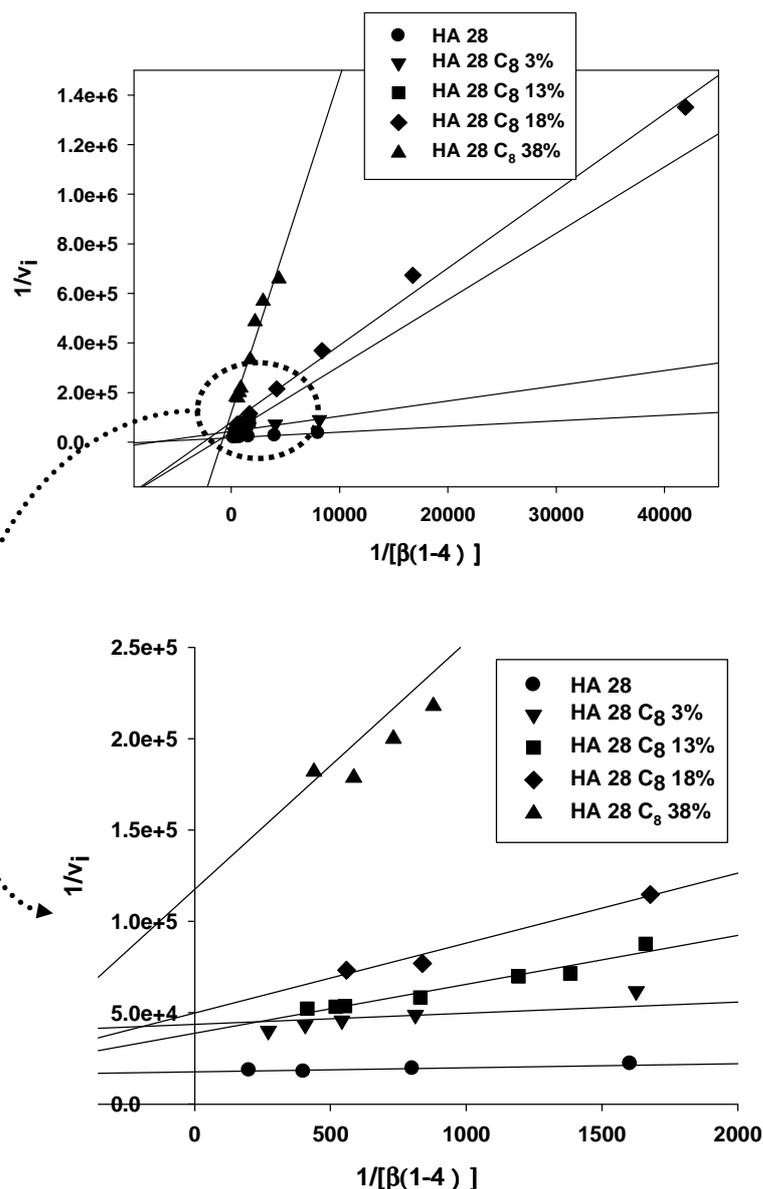


Figure 98 : Linéarisation par la méthode de Lineweaver-burk des substrat-dépendances de HA 28 octylés. Le second graphique est un zoom de la partie entourée.

[HAase] = 0,1 g.L⁻¹ ; [NaCl] = 0,15 mol.L⁻¹ ; pH = 4

Dans le cas d'une inhibition compétitive, seul le paramètre K_m est modifié. Dans le cas d'une inhibition non compétitive, seul le paramètre V_m est modifié (Dixon et Webb, 1979 ; Mikkelsen et Corton, 2004). La figure 98 confirme que les paramètres michaéliens K_m et V_m sont modifiés. K_m est modifié puisque la pente des droites augmente avec le taux d'estérification et le V_m est modifié puisque les droites ne coupent pas l'axe des ordonnées à la même valeur. Une inhibition conduisant à une diminution de V_m ainsi qu'une augmentation de K_m est une inhibition mixte. En modifiant les deux paramètres de Michaëlis, l'inhibition mixte implique à la fois des

effets catalytiques et spécifiques (Bunting et Myers, 1973 ; Cornish-Bowden, 1974). Il existe deux types d'inhibition mixte : l'inhibition compétitive-non compétitive et l'inhibition compétitive-incompétitive. D'après l'évolution des paramètres de Michaëlis (figure 98), nous sommes en présence d'une inhibition compétitive-non compétitive. En effet, l'augmentation de K_m indique une compétition entre les liaisons modifiées et non modifiées lors de la formation du complexe spécifique enzyme-substrat ce qui est caractéristique de l'inhibition compétitive. De plus, pour ce type d'inhibition, l'inhibiteur possède une structure chimique très proche de celle du substrat ce qui est le cas dans cette étude puisque la liaison $\beta(1-4)$ est uniquement modifiée par l'estérification en chaîne octyle sur l'acide glucuronique. La diminution de V_m montre une inhibition non compétitive. En dehors du site actif, d'autres domaines de la HAase ont une affinité avec le substrat modifié. Ceci suggère que les domaines hydrophobes formés par l'estérification et détectés par analyse SEC/MALLS et analyse de fluorescence créent des interactions avec des parties hydrophobes de la HAase qui ne font pas partie du site actif. En augmentant le taux d'estérification, nous augmentons la quantité de domaines hydrophobes et donc la possibilité d'interagir avec les parties hydrophobes de la HAase. Il existe donc une complexation non spécifique entre le HA partiellement estérifié et la HAase de type hydrophobe. En utilisant une autre enzyme, les interactions hydrophobes entre l'enzyme et le HA estérifié peuvent conduire à des résultats différents. Hirano *et al.* (Hirano *et al.*, 2005) réalisent une réaction enzymatique entre du HA non modifié et une chondroïtine lyase ainsi que la même réaction enzymatique avec comme substrat du HA méthylé. En comparant les valeurs des paramètres de Michaëlis obtenus pour les deux réactions, ils observent une diminution à la fois de V_m et de K_m . Dans cette étude, les auteurs concluent que les interactions hydrophobes entre la chondroïtine lyase et le HA méthylé diminuent la valeur de K_m . Les interactions hydrophobes qui existent entre le HA méthylé et la chondroïtine lyase favorisent la réaction enzymatique. Dans le cas de la HAase, il a déjà été démontré, comme nous l'avons vu dans le chapitre I, qu'il existe une complexation non spécifique de type électrostatique entre le HA et la HAase qui inhibe l'activité de la HAase (Astériou *et al.*, 2005 ; Lenormand, 2007 ; Deschrevel *et al.*, 2008). Nous pouvons en conclure que la complexation non spécifique, quelle soit électrostatique ou hydrophobe, diminue l'efficacité catalytique de la HAase.

IV.C.2.b. Evolution de la Mn en fin d'analyse cinétique

A partir des séries de cinétiques d'hydrolyses enzymatiques réalisées pour chaque ester octylé de HA 28, il est possible d'étudier l'influence de la concentration en HA octylé sur la \overline{Mn} obtenue au bout de trois heures d'hydrolyse enzymatique. La \overline{Mn} au bout de trois heures de réaction a été déterminée en utilisant la méthode de Reissig pour chaque concentration de HA et cette évolution est suivie en fonction du taux d'estérification. Les résultats sont présentés sur la figure 99.

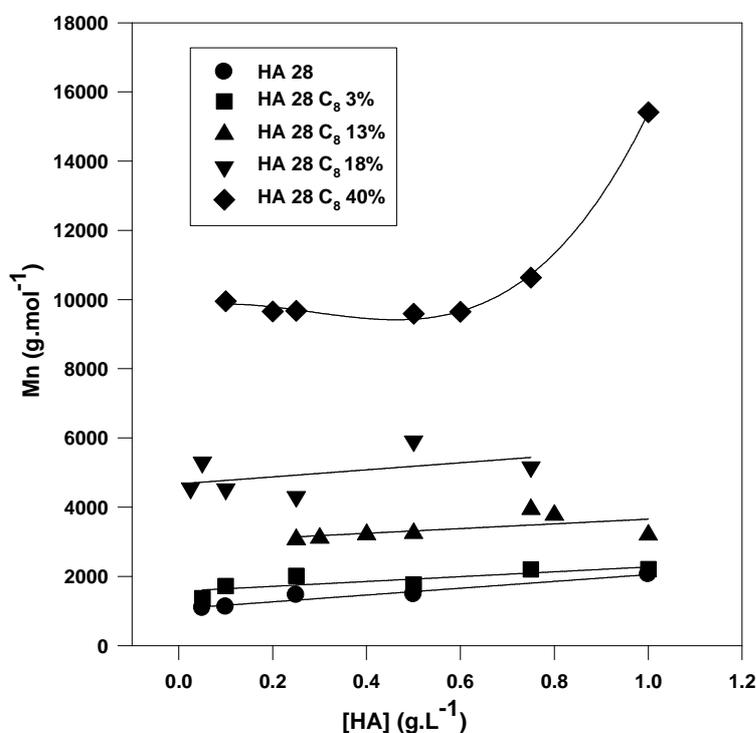


Figure 99 : Comparaison des \overline{Mn} obtenues en fin de réaction d'hydrolyse catalysée par la HAase des esters octylés préparés à partir du HA 28
[HAase] = 0,1 g.L⁻¹ ; [NaCl] = 0,15 mol.L⁻¹ ; pH = 4

La figure 99 permet d'observer une augmentation de la Mn au bout de trois heures de réaction lorsque le taux d'estérification augmente. Nous observons également que jusqu'à un taux d'estérification de 18% en chaînes octyle, la \overline{Mn} est quasi constante lorsque la concentration en HA augmente. Ceci nous montre que, pour les faibles taux d'estérification, tout comme pour le précurseur, la concentration n'est

pas un paramètre qui influe sur la \overline{Mn} obtenue au bout de trois heures de réaction. En revanche, pour le HA 28 C₈ 40%, La \overline{Mn} au bout de trois heures d'hydrolyse augmente de façon importante lorsque la concentration est au-dessus de 0,6 g.L⁻¹. A une concentration de 1 g.L⁻¹, elle est environ 1,5 fois plus importante qu'à 0,6 g.L⁻¹. De plus la valeur de \overline{Mn} atteinte (environ 15 000 g.mol⁻¹) montre que la masse molaire n'a été divisée que par deux en moyenne par rapport à la masse molaire du fragment de départ.

Dans cette gamme de concentration, nous avons observé lors des analyses par SEC/MALLS (paragraphe III.A.1.b.) et par fluorescence (paragraphe III.D.1.) la présence d'interactions hydrophobes entre les chaînes de HA. Ceci nous montre qu'en plus des phénomènes liés aux interactions hydrophobes précédemment décrites lors de l'étude des paramètres de Michaëlis, l'estérification peut induire des conformations des chaînes de HA dans l'espace qui excluent certaines liaisons $\beta(1-4)$ non modifiées les rendant ainsi inaccessibles à la HAase dans les conditions enzymatiques que nous avons choisies pour cette étude. En augmentant la concentration en HA estérifié, nous augmentons la probabilité de formation d'interactions hydrophobes de type intermoléculaire, donc le nombre de liaisons $\beta(1-4)$ non hydrolysables. Tout ceci provoque une hydrolyse très partielle au bout de trois heures d'hydrolyse.

IV.C.3. Substrat-dépendance des HA octylés préparés à partir de HA 500

IV.C.3.a. Détermination des paramètres de Michaëlis

La conformation en solution des HA estérifiés influençant la réaction d'hydrolyse enzymatique catalysée par la HAase, nous avons souhaité étudier l'influence de la masse molaire du fragment de HA précurseur. Des séries de cinétiques enzymatiques ont été réalisées pour les HA 500 octylés dans les mêmes conditions réactionnelles que dans l'étude décrite précédemment pour le HA 28.

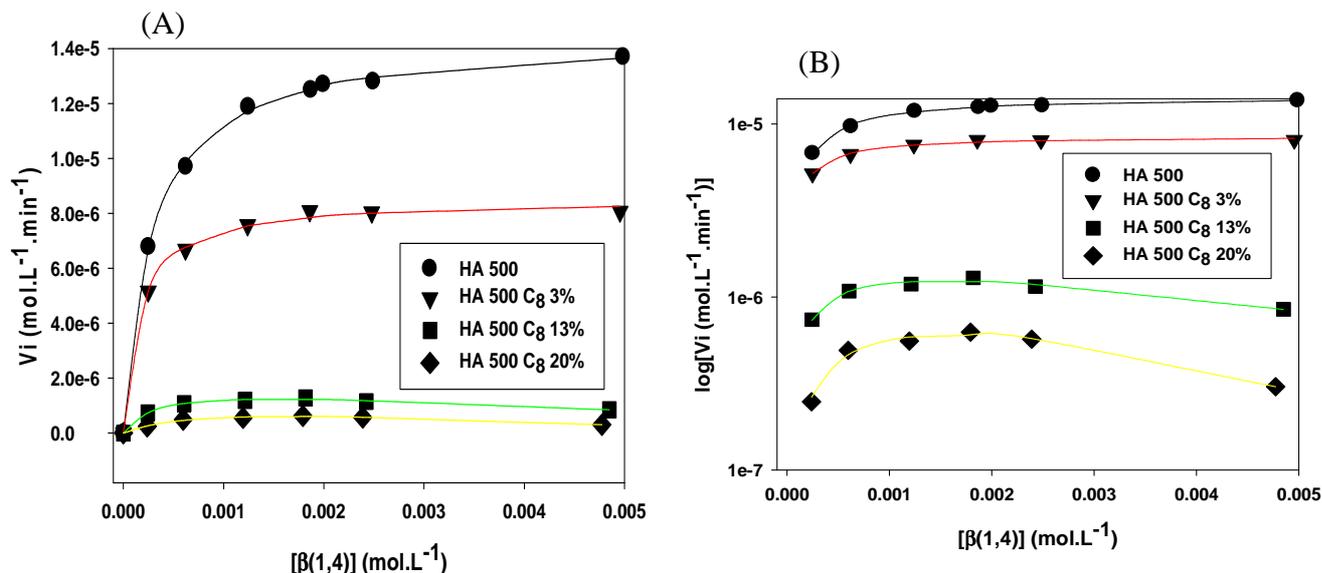


Figure 100 : Comparaison des substrat-dépendances de la réaction d'hydrolyse catalysée par la HAase des esters octylés préparés à partir du HA 500
 $[\text{HAase}] = 0,1 \text{ g.L}^{-1}$; $[\text{NaCl}] = 0,15 \text{ mol.L}^{-1}$; $\text{pH} = 4$
 (A) : représentation classique des substrat-dépendances
 (B) : représentation des mêmes substrat-dépendances avec une échelle logarithmique pour l'axe des ordonnées

Les figures 100 (A) et (B) permettent de comparer les substrat-dépendances obtenues pour les esters octylés de HA 500. Nous observons tout d'abord que l'allure des courbes diffère en fonction du taux d'estérification. Les vitesses initiales diminuent avec l'augmentation du taux d'estérification en chaînes octyle. En prenant l'échelle logarithmique à la place de l'échelle linéaire pour agrandir la partie basse du graphique (figure 100 (B)), nous observons un comportement non michaelien contrairement au HA 500 C₈ 3% et au HA 500 précurseur. Au lieu d'obtenir un palier, la vitesse initiale diminue pour les plus grandes valeurs de concentrations. Il est donc possible de déterminer les valeurs des paramètres de Michaelis par régression non linéaire uniquement pour le HA 500 et pour le HA 500 C₈ 3%. Pour les deux autres esters octylés, il n'est pas possible de les obtenir en lissant directement la courbe expérimentale obtenue.

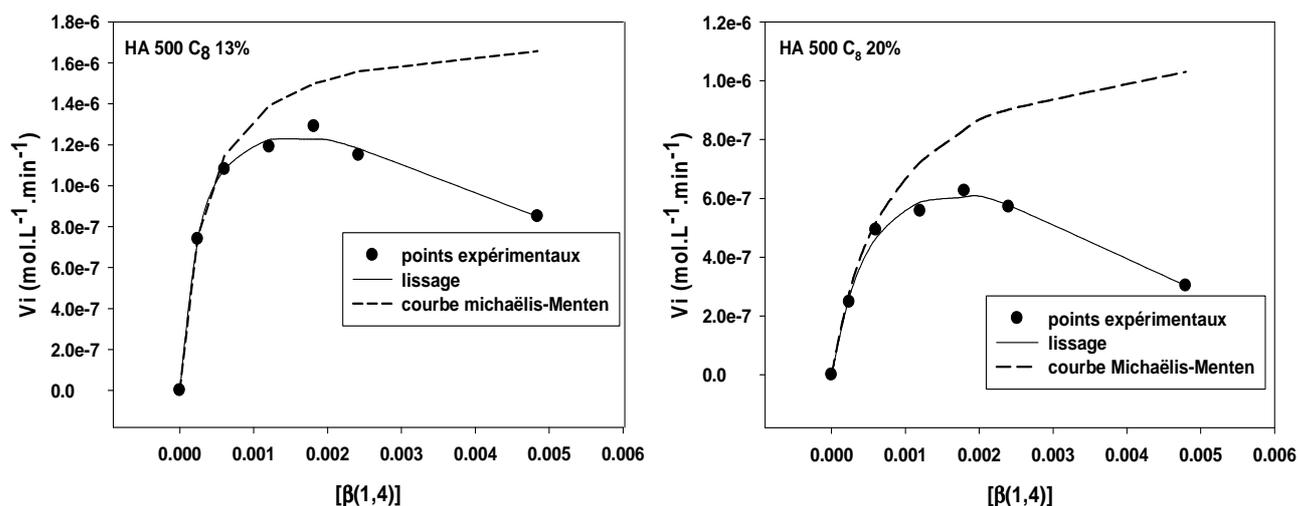


Figure 101 : Substrat-dépendance des HA 500 C₈ 13% et 20% avec lissage des points expérimentaux et obtention des courbes de Michaëlis-Menten correspondantes

Pour obtenir les paramètres de Michaëlis correspondants aux substrat-dépendances des fragments de HA 500 C₈ 13% et 20%, nous avons utilisé un programme mis au point lors des études menées sur la complexation électrostatique existant entre le HA et la HAase (Vincent *et al.*, 2009). Ce modèle montre l'existence d'une compétition entre la part liée à la complexation non spécifique et la part liée au comportement de type Michaëlis Menten. La courbe obtenue est la résultante de ces deux phénomènes qu'il est possible de décomposer mathématiquement. La première partie est liée uniquement à la réaction qui permet l'obtention de la substrat-dépendance de type Michaëlis-Menten. La deuxième partie est liée au phénomène de complexation. Ce programme peut être utilisé dans notre cas puisque, comme nous l'avons montré dans les paragraphes précédents, il existe une complexation non spécifique de type hydrophobe entre le HA estérifié et la HAase. La gêne apportée par l'hydrophobie des chaînes alkyle peut donc être éliminée via le programme et nous permettre d'obtenir uniquement la substrat-dépendance de type Michaëlis-Menten. Nous pouvons par la suite déterminer les paramètres de Michaëlis V_m et K_m. A présent, il est possible de comparer les paramètres de Michaëlis de l'ensemble des esters octylés HA 500 avec leur précurseur.

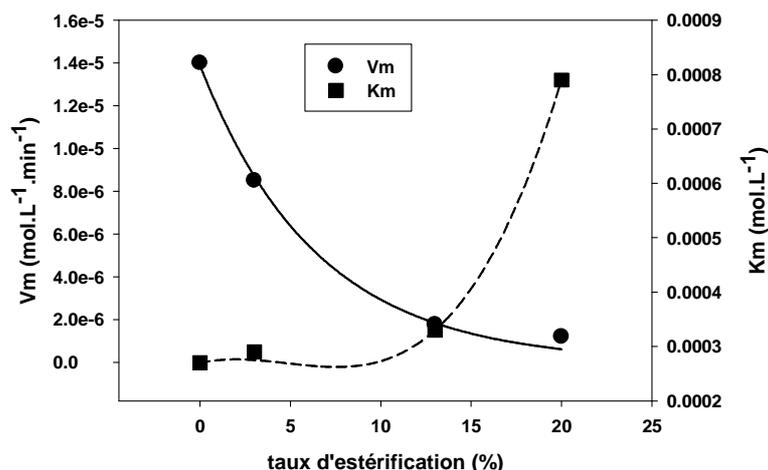


Figure 103 : Evolution des paramètres michaéliens K_m et V_m déterminés par régression non linéaire en fonction du taux d'estérification en chaînes octyle du HA 500

La figure 103 indique que les paramètres michaéliens évoluent de la même manière que dans le cas des esters octylés de HA 28. Nous observons une diminution de V_m ainsi qu'une augmentation de K_m lorsque le taux d'estérification en chaînes octyle augmente. Le paramètre V_m devient très faible à partir de 13 % d'estérification (facteur 4 entre 3% et 13%). En parallèle, nous observons une augmentation importante de K_m à partir de 13% d'estérification. Augmenter la masse molaire du fragment précurseur de HA ne modifie pas l'évolution des paramètres michaéliens. En revanche cela accentue le phénomène qui tend à diminuer la vitesse initiale de la réaction d'hydrolyse en favorisant les interactions hydrophobes. Comme montré par les analyses de fluorescence, les microdomaines hydrophobes semblent être plus importants lorsque la masse molaire du HA précurseur est plus forte pour les greffons octyle. Les interactions hydrophobes créées par la présence des greffons alkyle jouent donc un rôle important dans la diminution de la réactivité de la HAase lors de la réaction d'hydrolyse.

IV.C.3.b. Evolution de la Mn de fin d'analyse cinétique

Nous pouvons également étudier l'influence de la concentration en HA octylé sur la \overline{Mn} obtenue en fin d'hydrolyse enzymatique pour chaque ester de HA 500. Les résultats sont résumés sur la figure 104.

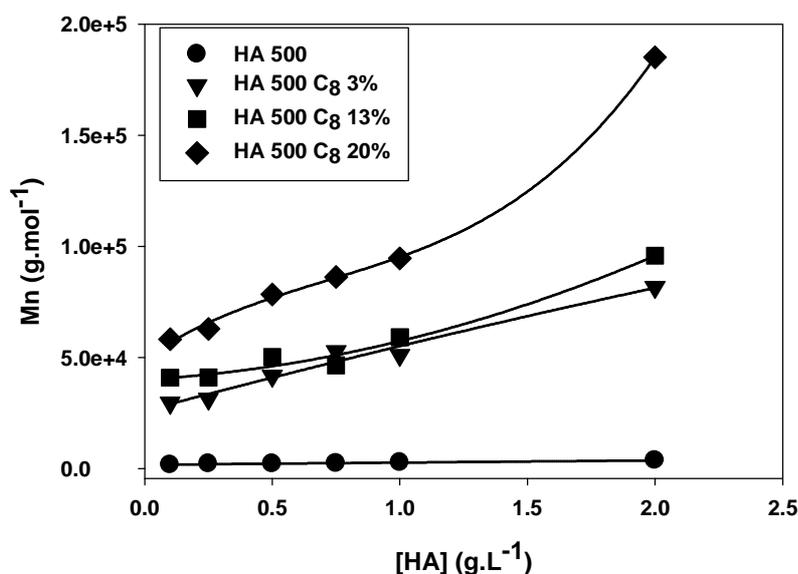


Figure 104 : Comparaison des Mn obtenues en fin de réaction d'hydrolyse catalysée par la HAase des esters octyleés préparés à partir du HA 500
[HAase] = 0,1 g.L⁻¹ ; [NaCl] = 0,15 mol.L⁻¹ ; pH = 4

Nous observons sur la figure 104 que la \overline{Mn} en fin d'hydrolyse est plus élevée avec le plus fort taux d'estérification. Nous avons déjà observé cet effet de l'estérification lors de l'étude décrite précédemment sur les HA 28 octylés. Même lorsque la masse molaire du fragment de HA précurseur est différente, l'augmentation du taux d'estérification en chaînes octyle conduit à une plus faible hydrolyse au bout de trois heures d'hydrolyse enzymatique. Cependant, contrairement à l'étude précédente, dès le plus faible taux d'estérification, nous remarquons que la Mn en fin d'hydrolyse est importante avec l'augmentation de la concentration en HA octylés ce qui n'est pas le cas pour le HA 500 précurseur. L'augmentation de \overline{Mn} observée est quasi linéaire pour le HA 500 C₈ 3% et le HA 500 C₈ 13%. Concernant le HA 500 C₈ 20%, l'augmentation de la Mn est quasi linéaire jusqu'à 1 g.L⁻¹, puis nous observons une augmentation plus prononcée à 2 g.L⁻¹. Nous avons observé ce phénomène pour le HA 28 mais lorsque le taux d'estérification en chaînes octyle atteignait 40%. Lorsque le fragment précurseur est le HA 500, un taux d'estérification plus faible en

chaînes octyle suffit pour affecter très fortement l'hydrolyse en donnant une faible réduction de la \overline{Mn} . Nous pouvons en conclure qu'en utilisant un fragment de HA de masse molaire plus forte, nous accentuons l'hydrophobie qui inhibe l'activité enzymatique. Ces résultats sont en accord avec les analyses réalisées par couplage SEC/MALLS (III.A.1.c.) et par fluorescence (III.D.2.) où la formation de microdomaines hydrophobes de type inter et intramoléculaire est favorisée avec des HA hydrophobisés de plus forte masse molaire.

IV.C.4. Mécanisme mis en jeu dans l'inhibition de l'activité enzymatique

Nous avons déterminé lors de l'étude sur les substrat-dépendances réalisées avec les HA 28 et les HA 500 octylés ainsi que l'étude sur les \overline{Mn} en fin d'hydrolyse que des interactions hydrophobes existant en solution peuvent être de deux types. Elles peuvent exister au niveau des chaînes de polymère créant des conformations plus complexes en solution via des associations hydrophobes intra et/ou interchaînes. Ces conformations peuvent rendre inaccessible à la HAase des liaisons $\beta(1-4)$ non modifiées.

Hors du site actif, des interactions peuvent également exister entre les chaînes de HA estérifiées et les parties hydrophobes de la HAase, ne lui permettant pas d'effectuer l'étape de catalyse qui suit l'étape de formation du complexe spécifique enzyme-substrat.

De plus, les courbes de substrat-dépendances des HA 500 C₈ 13% et HA 500 C₈ 20% présentent une diminution de la vitesse initiale lorsque les concentrations en HA sont les plus élevées. Ce phénomène, déjà observé lorsque le HA se lie de façon non spécifique à la HAase par des liaisons électrostatiques, montre que la complexation non spécifique rend la HAase catalytiquement inactive (Astériou *et al.*, 2005 ; Deschrevel *et al.*, 2008). Nous avons souhaité savoir si la diminution de la vitesse initiale aux plus fortes concentrations est causée par une complexation enzyme-substrat non spécifique ou par une conformation plus complexe des chaînes polysaccharidiques en solution, défavorable à la réaction d'hydrolyse enzymatique.

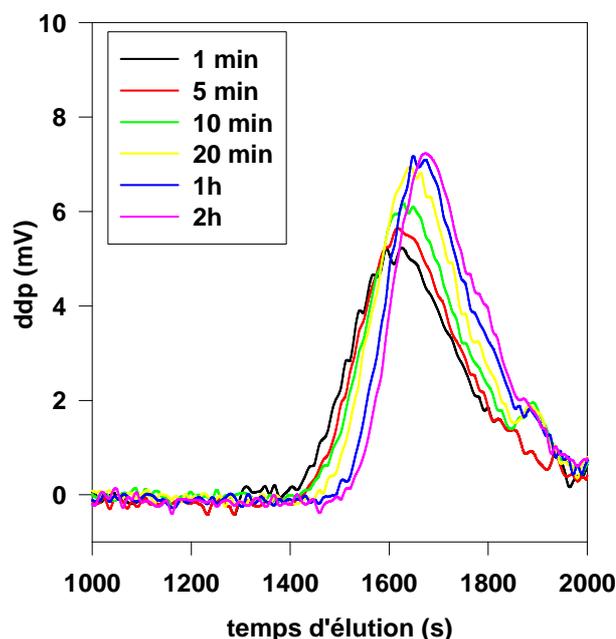


Figure 105 : Suivi chromatographique de la cinétique d'hydrolyse enzymatique du HA 500 C₈ 20% catalysée par la HAase.
 [HA] = 2 g.L⁻¹ ; [HAase] = 0,1 g.L⁻¹ ; [NaCl] = 0,15 mol.L⁻¹ ; pH = 4

La figure 105 présente la réaction d'hydrolyse du HA 500 C8 20% catalysée par la HAase et confirme la faible réactivité de l'enzyme. Nous avons choisi la réaction d'hydrolyse enzymatique de cet ester puisqu'elle s'arrête rapidement au bout de deux heures à une masse molaire très élevée (185 000 g.mol⁻¹). Nous allons réaliser une nouvelle fois cette réaction en ajoutant au bout de deux heures du HA 500 non estérifié à une concentration de 0,5 g.L⁻¹. Le but est de vérifier si l'enzyme est toujours active en hydrolysant les fragments de HA 500 précurseur. Les résultats de cette étude sont présentés sur la figure 106 .

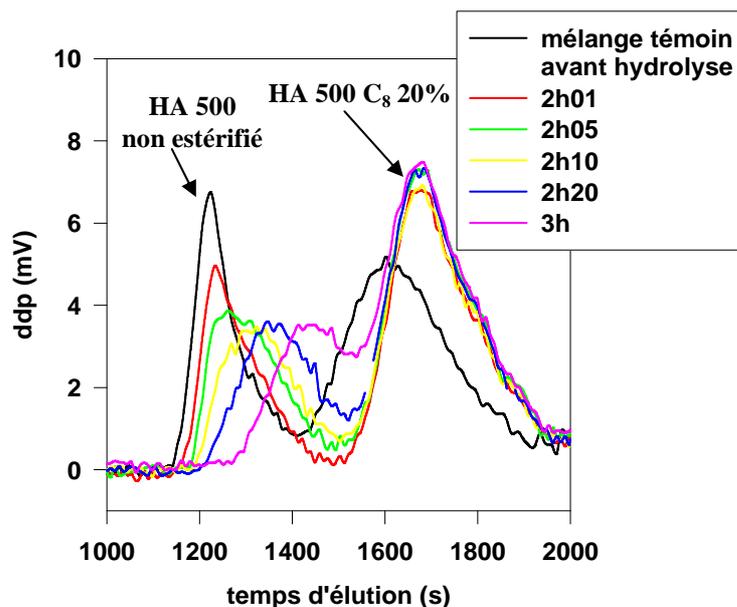


Figure 106 : Suivi chromatographique de la cinétique d'hydrolyse enzymatique du HA 500 C₈ 20% catalysée par la HAase après ajout à 2h de réaction de HA 500 précurseur non estérifié à 0,5 g.L⁻¹
 [HA] = 2 g.L⁻¹ ; [HAase] = 0,1 g.L⁻¹ ; [NaCl] = 0,15 mol.L⁻¹ ; pH = 4

La figure 106 montre tout d'abord comme mélange témoin, en trait plein noir, le HA 500 précurseur et le HA 500 C₈ 20% avant hydrolyse enzymatique afin de suivre l'évolution de la réaction sur ces deux substrats au cours du temps en suivant leur déplacement chromatographique. Nous constatons que concernant le HA 500 C₈ 20%, le pic chromatographique conserve le même temps d'élution quelque soit le temps de prélèvement. Il n'évolue plus au cours de la troisième heure d'analyse. La réaction enzymatique pour ce substrat est bloquée puisque sa masse molaire ne change plus. En revanche, le pic chromatographique correspondant au HA 500 précurseur évolue et se déplace vers les temps d'élution les plus élevés après avoir été ajouté au bout de deux heures. Ceci signifie que les fragments de HA 500 non estérifiés sont hydrolysés pendant le temps de l'analyse. Cette analyse permet de confirmer que bien que la réaction avec le substrat HA 500 C₈ 20% soit bloquée à une masse molaire forte, l'activité catalytique de l'enzyme est conservée puisqu'elle est capable d'hydrolyser les fragments HA 500 précurseurs ajoutés au cours de la réaction. L'arrêt rapide de la réaction dans le cas du HA 500 C₈ 20% ne peut donc pas être expliqué par une complexation non spécifique de nature hydrophobe empêchant la HAase d'exercer son action catalytique. Les interactions hydrophobes

prédominantes sont celles existant au sein de la chaîne de polymère de type intra et/ou intermoléculaire. Ces interactions conduisent à une conformation des chaînes polymère en solution complexe et plus compacte, rendant inaccessible à la HAase une partie des liaisons $\beta(1-4)$ hydrolysables.

IV.D. Etude du produit obtenu en fin d'hydrolyse enzymatique

Dans les travaux menés au laboratoire sur le HA non modifié, la méthode de Reissig et la chromatographie d'exclusion stérique muni d'un détecteur réfractométrique (SEC/RI), préalablement étalonnée, sont généralement associées pour étudier la cinétique d'hydrolyse enzymatique du HA catalysée par la HAase (Tranchepain *et al.*, 2006).

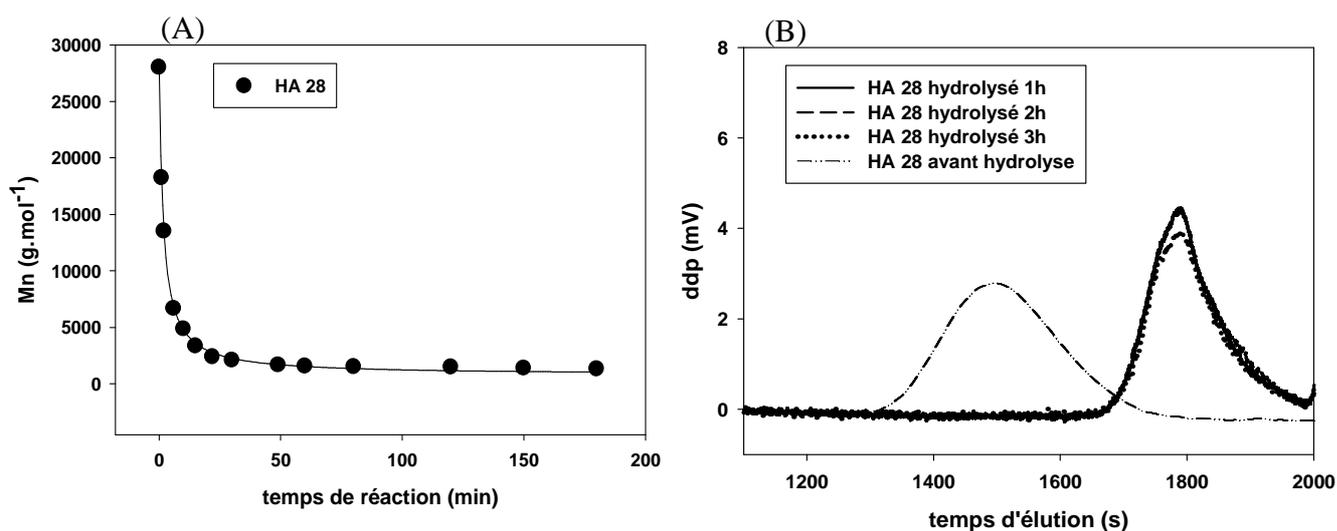


Figure 107 : Cinétique hydrolyse enzymatique du HA 28 catalysée par la HAase suivi par la méthode de Reissig et par couplage SEC/RI

$[HA] = 0,5 \text{ g.L}^{-1}$; $[HAase] = 0,1 \text{ g.L}^{-1}$; $[NaCl] = 0,15 \text{ mol.L}^{-1}$; $\text{pH} = 4$

Les profils chromatographiques obtenus sont homogènes (Figure 107 (B)) à tous les temps de prélèvement. Les résultats de \overline{Mn} obtenus par la méthode de Reissig (figure 107 (A)) et par le couplage SEC/RI (Figure 107 B) sont très proches. Nous avons souhaité associer de la même manière les deux méthodes afin d'étudier la cinétique d'hydrolyse enzymatique des fragments de HA estérifiés catalysée par la HAase. Les analyses suivantes ont été réalisées sur le fragment HA 28 C₈ 13%. Les résultats sont résumés sur la figure 108.

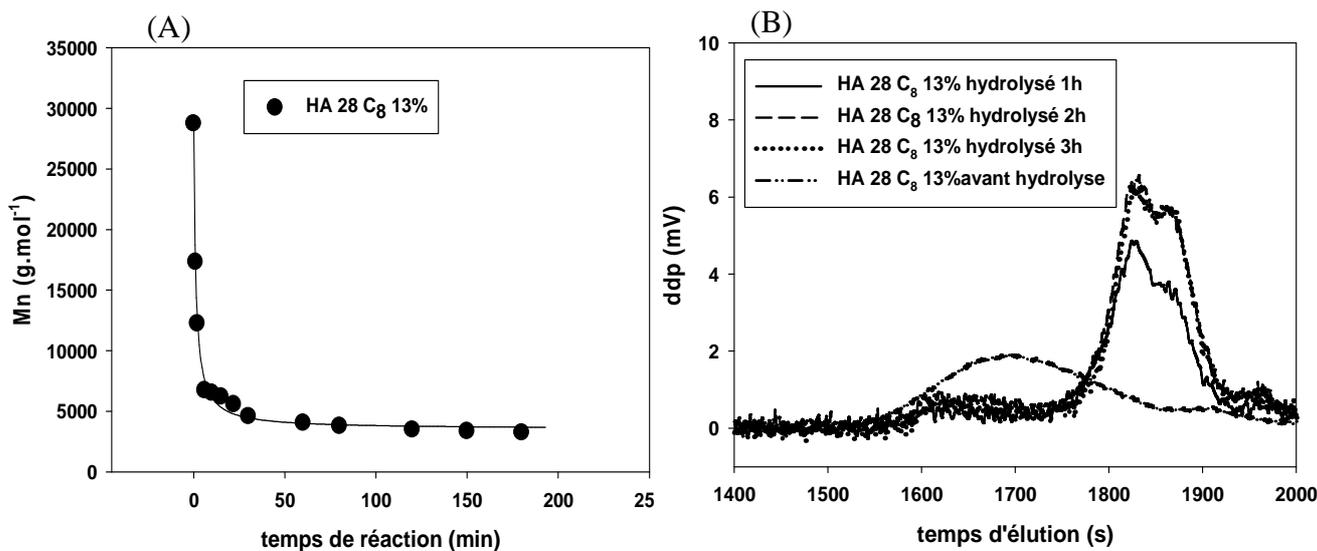


Figure 108 : Cinétique hydrolyse enzymatique du HA 28 C₈ 13% catalysée par la HAase suivi par la méthode de Reissig et par couplage SEC/RI
 [HA] = 0,5 g.L⁻¹ ; [HAase] = 0,1 g.L⁻¹ ; [NaCl] = 0,15 mol.L⁻¹ ; pH = 4

La figure 108 (B) présente des profils chromatographiques hétérogènes contrairement au précurseur HA 28. Dans ce cas, les valeurs de Mn obtenues par la méthode de Reissig et par le couplage SEC/RI sont différentes. Il semble que les chaînes de HA estérifié ne soient pas toutes hydrolysées de la même manière. Afin d'expliquer ces différences, nous avons souhaité en savoir davantage sur la répartition des chaînes alkyle le long de la chaîne de HA. La répartition des chaînes alkyle pourrait expliquer l'hétérogénéité des chaînes de HA obtenue après hydrolyse enzymatique. Afin de montrer cette possible hétérogénéité, nous avons reproduit une hydrolyse du HA 23 et HA 28 ainsi que leurs homologues estérifiés. Les résidus de l'hydrolyse ont été séparés en taille par la chromatographie d'exclusion stérique, puis chaque fraction a été étudiée par spectrométrie de masse MALDI-TOF et électrospray pour obtenir la structure chimique des produits finaux.

IV.D.1. Analyses par SEC/RI et par spectrométrie de masse

IV.D.1.a. Conditions enzymatiques

Les conditions enzymatiques adéquates pour cette étude doivent permettre d'arriver dans un temps raisonnable à une hydrolyse totale des fragments de HA analysés. Nous savons que la présence de force ionique ainsi qu'un rapport $[HAase]/[HA]$ important augmentent la vitesse de réaction d'hydrolyse (paragraphe I.A.3). Nous avons donc choisi les conditions enzymatiques suivantes :

$$[HA] = 1 \text{ g.L}^{-1} ; [HAase] = 3 \text{ g.L}^{-1} ; [NaCl] = 0,15 \text{ mol.L}^{-1} ; \text{pH} = 4$$

Ces conditions d'hydrolyse enzymatique sont ensuite testées sur les fragments de faibles masses molaires estérifiés ainsi que sur les précurseurs HA 28 et HA 23.

IV.D.1.b. Analyse du précurseur HA 28

La réaction d'hydrolyse est suivie par un système de chromatographie d'exclusion stérique étalonné avec une gamme d'oligomères de HA comme détaillée dans la partie Matériels et Méthodes (IV.B.4.).

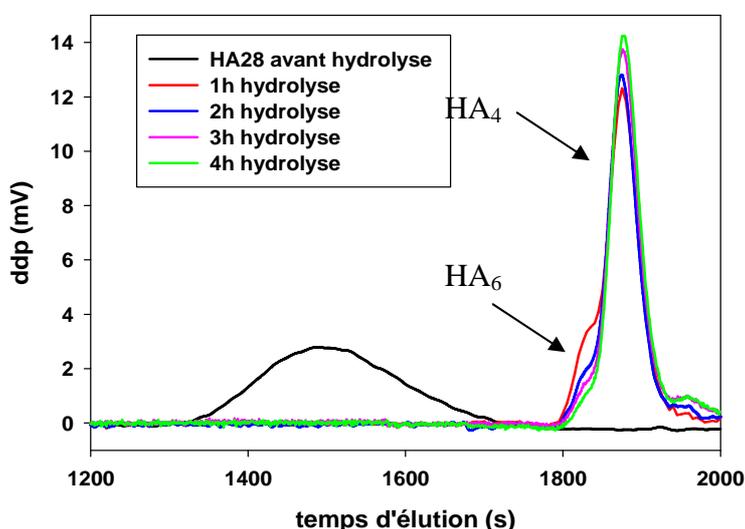


Figure 109 : Hydrolyse enzymatique du fragment précurseur HA 28 suivie par SEC/RI $[HA] = 1 \text{ g.L}^{-1} ; [HAase] = 3 \text{ g.L}^{-1} ; [NaCl] = 0,15 \text{ mol.L}^{-1} ; \text{pH} = 4$

La figure 109 nous permet d'observer l'évolution de l'hydrolyse enzymatique. Nous constatons tout d'abord que, comme nous le souhaitions, la vitesse de réaction est rapide puisque au bout d'une heure d'hydrolyse le mélange d'oligomères obtenu correspond, d'après l'étalonnage du système SEC/RI, à un mélange d'hexa- (HA_6) et

de tétrasaccharides (HA₄) de HA. Il s'agit du mélange final décrit classiquement dans la littérature (Meyer, 1971). Cependant en poursuivant la réaction nous observons la diminution de l'épaule correspondant à l'hexasaccharide de HA jusqu'à sa disparition complète observée au bout de quatre heures.

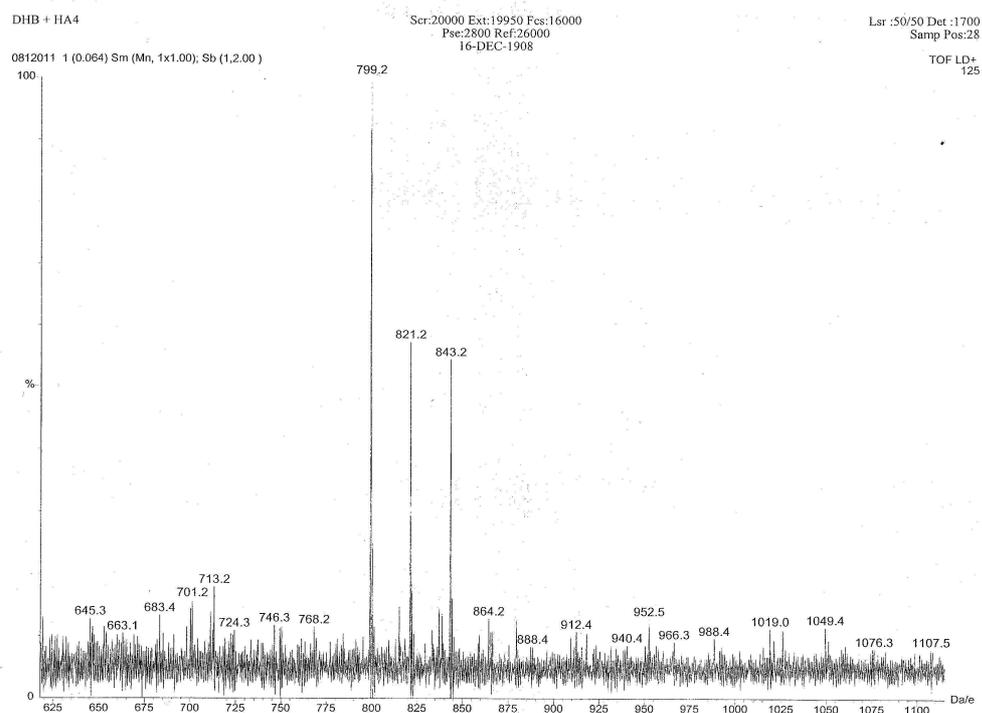


Figure 110 : HA 28 hydrolysé pendant 4h analysé par spectrométrie de masse MALDI-TOF [HA] = 1 g.L⁻¹ ; [HAase] = 3 g.L⁻¹ ; [NaCl] = 0,15 mol.L⁻¹ ; pH = 4

L'analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF d'un prélèvement de l'hydrolyse enzymatique effectué au bout de quatre heures de réaction (figure 110) confirme les résultats obtenus par SEC/RI. En effet, cette analyse montre la présence uniquement de tétrasaccharides dont les valeurs caractéristiques de rapport masse/charge (m/z) sont respectivement 799 [M+Na]⁺, 821 [M-H+2Na]⁺ et 843 [M-2H+3Na]⁺. Ces valeurs de rapport m/z sont en accord avec des études similaires sur la dégradation enzymatique partielle de HA (Sakai, 2007).

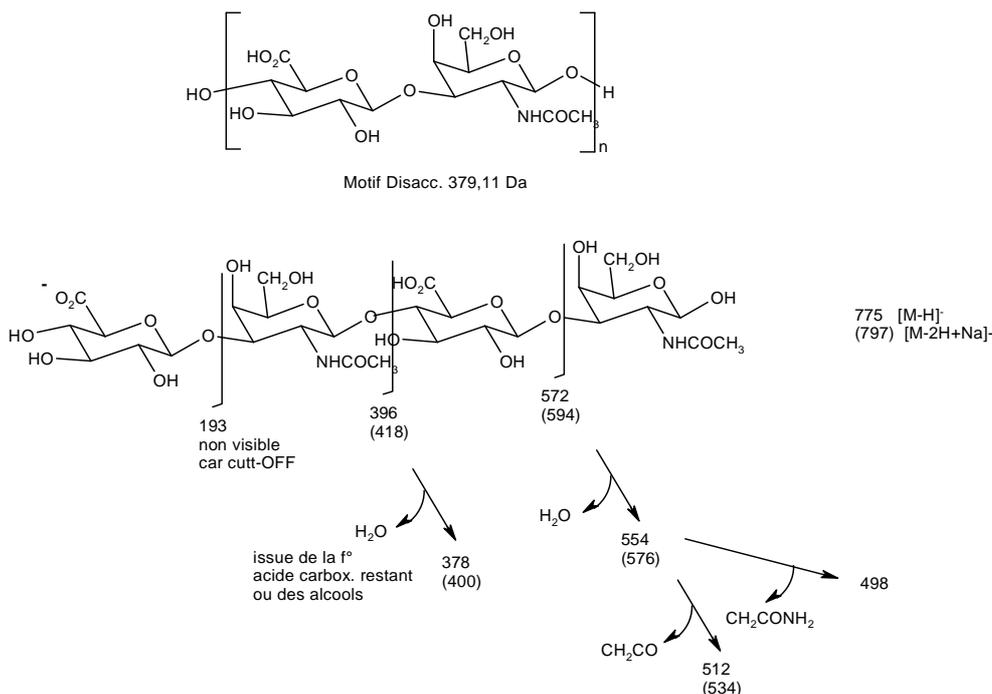


Figure 111 : Schéma de la fragmentation en ions négatifs du tétrasaccharide de HA

L'analyse de cet échantillon par spectrométrie de masse electrospray en mode négatif nous a permis de fragmenter l'ion négatif correspondant au tétrasaccharide de HA et de vérifier qu'il s'agit de cet oligosaccharide. Nous avons réalisé un schéma de fragmentation (figure 111) en détaillant tous les ions obtenus. La fragmentation provient tout d'abord de la rupture des liaisons glycosidiques ce qui est caractéristique des sucres (Domon et Costello, 1988). Chaque sucre subit ensuite une perte d'eau issu des fonctions hydroxyl ou carboxyl selon le sucre et enfin des pertes des fonctions carboxyl ou N-acétyl.

Ces analyses nous montrent qu'il est possible, dans nos conditions, d'hydrolyser les fragments de HA au-delà du mélange équimolaire d'hexa- et de tétrasaccharides décrit dans la littérature (Meyer *et al.*, 1971; Ernst *et al.*, 1995).

IV.D.1.c. Analyse des fragments de HA 23 et 28 estérifiés à taux d'estérification fixé à 40%

Les HA estérifiés préparés à partir des précurseurs HA 23 et HA 28 ont été hydrolysés par voie enzymatique dans les mêmes conditions réactionnelles que précédemment. Les analyses par couplage SEC/RI et par spectrométrie de masse MALDI-TOF et electrospray vont permettre d'étudier si les produits finaux varient selon le taux d'estérification et/ou selon la longueur de la chaîne alkyle greffée. Des prélèvements de milieu réactionnel sont effectués toutes les heures et analysés par couplage SEC/RI. Au bout de quatre heures, nous n'observons plus d'évolution de la réaction d'hydrolyse. Le prélèvement effectué au bout de quatre heures de réaction est analysé pour chaque ester de HA par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

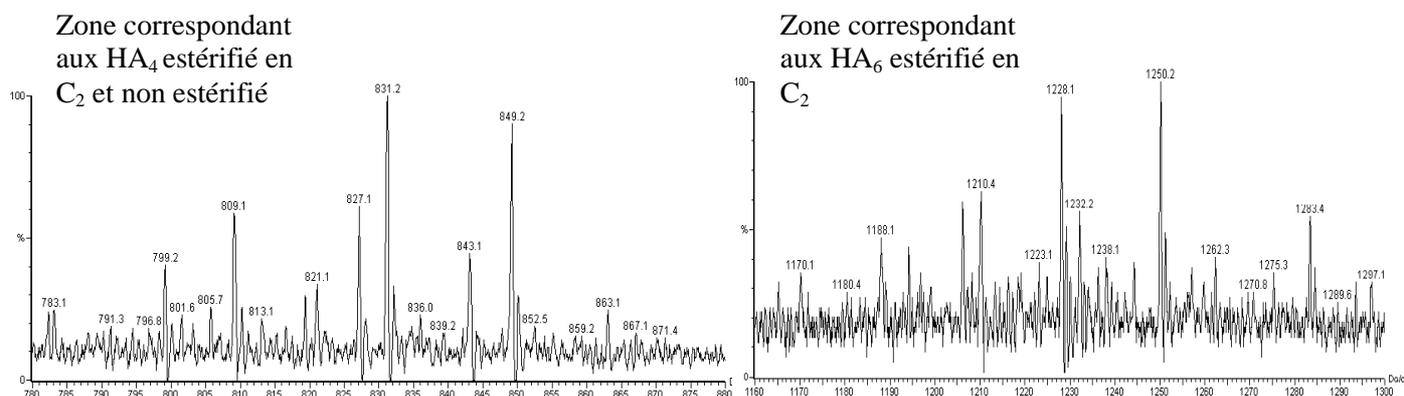


Figure 112 : HA 23 C₂ 40% hydrolysé pendant 4h analysé par spectrométrie de masse MALDI-TOF. [HA] = 1 g.L⁻¹ ; [HAase] = 3 g.L⁻¹ ; [NaCl] = 0,15 mol.L⁻¹ ; pH = 4

La figure 112 présente l'analyse réalisée dans le cas du HA 23 C₂ 40%. Les résultats obtenus pour cet ester sont les mêmes pour tous les esters estérifiés à 40% quelque soit la longueur de la chaîne alkyle ajoutée, de la chaîne éthyle à la chaîne octyle. Les spectres sont cependant plus complexes que dans le cas du HA 28 ou HA 23 non estérifié. Nous observons deux oligosaccharides de HA : HA₄ et HA₆. Nous avons résumé dans le tableau suivant les résultats obtenus pour tous les HA 23 estérifiés à 40%.

rapport m/z						
	HA ₄ non estérifié			HA ₄ mono estérifié		
	[M+Na] ⁺	[M-H+2Na] ⁺	[M-2H+3Na] ⁺	[M+Na] ⁺	[M-H+2Na] ⁺	[M-2H+3Na] ⁺
HA 23	799	821	843	/	/	/
HA 23 C₂ 40%	799	821	843	827	849	/
HA 23 C₄ 40%	799	821	843	856	878	/
HA 23 C₈ 40%	799	821	843	912	934	/

rapport m/z			
	HA ₆ mono estérifié		
	[M+Na] ⁺	[M-H+2Na] ⁺	[M-2H+3Na] ⁺
HA 23	/	/	/
HA 23 C₂ 40%	1206	1228	1250
HA 23 C₄ 40%	1234	1256	1279
HA 23 C₈ 40%	1290	1312	1334

Tableau 20 : Analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF des oligosaccharides HA₄, HA₄ estérifié et HA₆ estérifié issus de l'hydrolyse des fragments de HA 23 estérifiés à 40% hydrolysés pendant 4h
[HA] = 1 g.L⁻¹ ; [HAase] = 3 g.L⁻¹ ; [NaCl] = 0,15 mol.L⁻¹ ; pH = 4

Le tableau 20 nous permet d'observer la présence simultanée d'oligosaccharides de HA estérifiés et non estérifiés. Ceci confirme tout d'abord que la liaison ester n'est pas rompue avant la fin de l'hydrolyse des fragments de HA. Bien que l'hydrolyse enzymatique soit réalisée à pH 4, la liaison ester est conservée sur les produits de fin de réaction. De plus, les analyses de spectrométrie de masse montrent que la présence de greffons hydrophobes a modifié le produit final de la réaction d'hydrolyse enzymatique. En effet, l'estérification des fragments de HA à 40% ne permet pas une hydrolyse enzymatique totale puisque nous observons des oligosaccharides HA₆ qui ne sont pas observés lors de l'hydrolyse complète des précurseurs HA 23 et HA 28. En revanche, quelque soit la longueur de la chaîne alkyle les produits finaux de la réaction enzymatique sont les trois mêmes oligomères pour chaque ester analysé c'est-à-dire HA₄, HA₄ estérifié et HA₆ estérifié. A 40%

d'estérification, la longueur de la chaîne alkyle n'influence pas le produit final de la réaction enzymatique.

IV.D.1.d. Saponification des fins de réaction des esters de HA 23 et 28

Nous savons d'après l'étude des produits finaux des fragments estérifiés à 40%, qu'il peut y avoir des oligosaccharides estérifiés. Par conséquent, les prélèvements de milieu réactionnel sont tout d'abord saponifiés (pH 10 pendant 24h) afin de pouvoir les analyser par couplage SEC/RI. Une fois saponifié, les masses molaires des oligosaccharides peuvent être déterminés en absence d'interactions hydrophobes à partir d'un étalonnage réalisé avec des oligomères purifiés de HA (paragraphe IV.B.1 Matériels et méthodes).

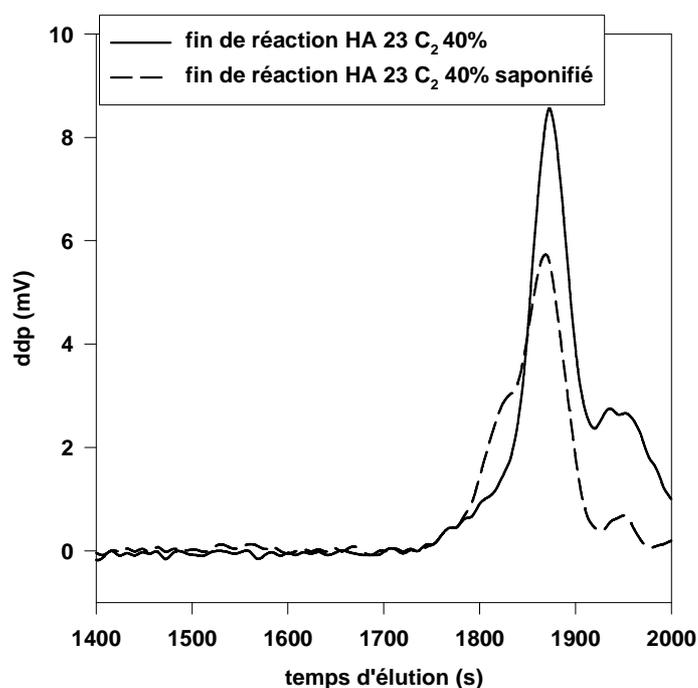


Figure 113 : HA 23 C₂ 40% hydrolysé pendant 4h et saponifié 24h à pH = 10. Prélèvement analysé par couplage SEC/RI. [HA] = 1 g.L⁻¹ ; [HAase] = 3 g.L⁻¹ ; [NaCl] = 0,15 mol.L⁻¹ ; pH = 4

La figure 113 nous présente le prélèvement de milieu réactionnel du HA C₂ 40% hydrolysé pendant quatre heures et saponifié en ajustant la solution à pH = 10 pendant 24h à température ambiante. Nous observons sur le chromatogramme après saponification un pic majoritaire correspondant à l'oligosaccharide HA₄. Après saponification, il apparaît un épaulement supplémentaire par rapport au profil non

saponifié. D'après la droite d'étalonnage, le temps d'élution de cet épaulement correspond à l'oligosaccharide HA₆. Le profil chromatographique montre donc la présence de deux tailles d'oligosaccharides HA₄ et HA₆. De plus, nous savons, d'après les analyses réalisées par spectrométrie MALDI-TOF, qu'il y avait des oligomères estérifiés HA₆ dans les produits finaux des fragments HA 23 C₂ 40% estérifiés. Les analyses chromatographiques ainsi que les analyses par spectrométrie de masse étant concordantes, nous pouvons conclure que les conditions de saponification choisies sont adaptées pour obtenir les oligosaccharides non estérifiés.

IV.D.1.e. Analyse des fragments de HA 23 et 28 estérifiés à taux d'estérification variable

Nous pouvons également étudier l'influence du taux d'estérification qui peut avoir une influence sur le produit final de la réaction puisqu'en modifiant le taux d'estérification, nous modifions le nombre de liaisons $\beta(1-4)$ hydrolysables. Pour réaliser une étude en fonction du taux d'estérification nous allons hydrolyser par voie enzymatique les fragments de HA 23 à différents taux d'estérification en chaînes éthyle et HA 28 à différents taux d'estérification en chaînes octyle. Les résultats des profils chromatographiques avant et après saponification montrent également que lorsque les oligosaccharides sont estérifiés, leurs temps d'élution sont décalés vers des temps plus longs en raison d'interactions avec la phase stationnaire. Nous avons appliqué cette méthode de saponification à tous les prélèvements.

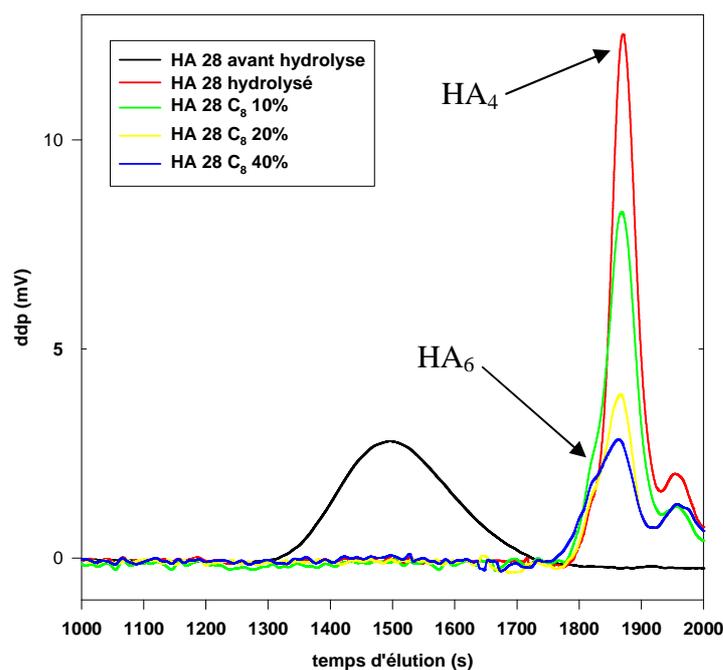


Figure 114 : HA 28 à taux d'estérification variable en chaînes octyle hydrolysés pendant 4h puis saponifiés et analysés par couplage SEC/RI. $[HA] = 1 \text{ g.L}^{-1}$; $[HAase] = 3 \text{ g.L}^{-1}$; $[NaCl] = 0,15 \text{ mol.L}^{-1}$; $\text{pH} = 4$

La figure 114 présente l'évolution du produit final d'hydrolyse enzymatique en fonction du taux d'estérification en chaîne octyle. Pour les trois esters octylés de HA, nous observons en fin d'hydrolyse un pic majoritaire correspondant au HA_4 et un épaulement correspondant au HA_6 . En diminuant le taux d'estérification en chaînes octyle, nous obtenons les mêmes produits en fin d'hydrolyse. L'aire des pics diminue fortement avec l'augmentation de la longueur du greffon alkyle. Il est possible que la méthode saponification soit moins efficace avec les chaînes alkyle les plus longues. Cependant, différents essais de saponification ont été réalisés et au-delà de $\text{pH} 10$, les chaînes de HA sont dégradées.

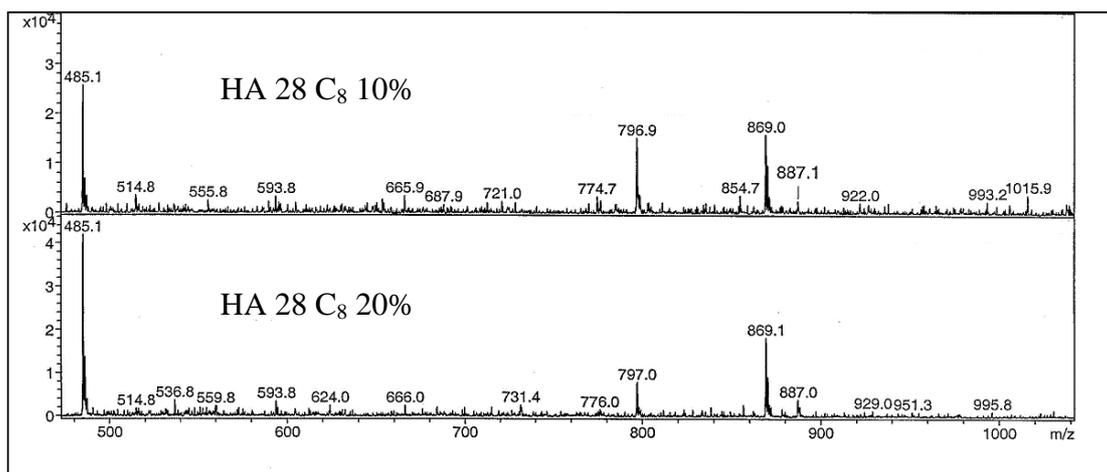


Figure 115 : HA 28 C₈ estérifiés à 10% et 20% hydrolysés pendant 4h puis analysés par spectrométrie de masse electrospray en mode négatif. [HA] = 1 g.L⁻¹ ; [HAase] = 3 g.L⁻¹ ; [NaCl] = 0,15 mol.L⁻¹ ; pH = 4

La figure 115 nous présente les analyses par spectrométrie de masse electrospray pour les HA C₈ 10% et HA C₈ 20%. Les pics prédominants pour les deux spectres correspondent au HA₄ non estérifié de rapport m/z 797 et au HA₄ mono estérifié de rapport m/z 869. Nous n'observons pas d'autre taille d'oligosaccharide.

Nous analysons par la suite des fragments de HA ayant des taux d'estérification plus élevés. Les fragments de HA 23 estérifiés en chaînes éthyle à 40%, 66% et 75% sont hydrolysés, saponifiés et analysés par couplage SEC/RI.

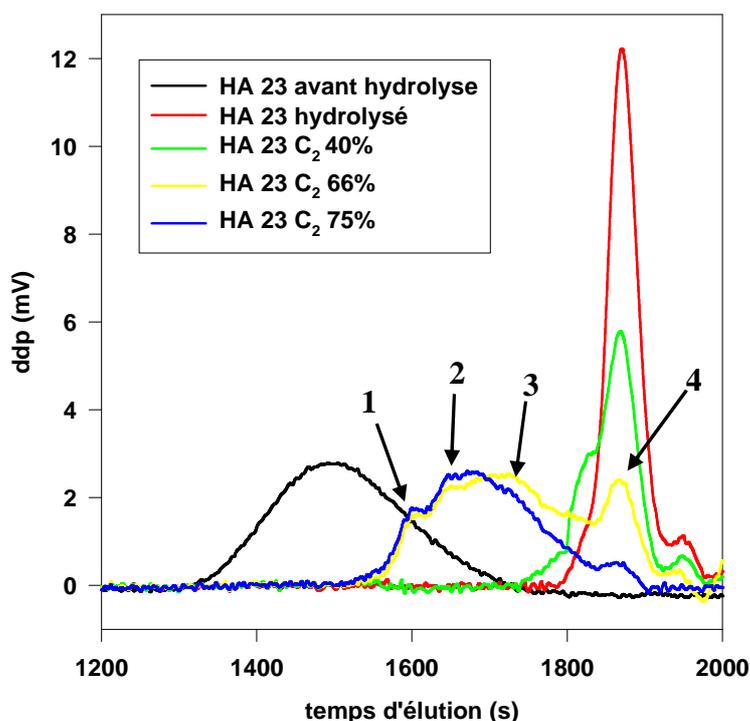


Figure 116 : HA 23 à taux d'estérification variable en chaînes éthyle hydrolysés pendant 4h puis saponifiés et analysés par couplage SEC/RI. [HA] = 1 g.L⁻¹ ; [HAase] = 3 g.L⁻¹ ; [NaCl] = 0,15 mol.L⁻¹ ; pH = 4

La figure 116 présente l'évolution du produit final de l'hydrolyse enzymatique pour différents taux d'estérification en chaînes éthyle. L'analyse par couplage SEC/RI montre des différences importantes lorsque nous augmentons le taux d'estérification. Au-dessus de 40% d'estérification en chaîne éthyle, l'hydrolyse enzymatique n'est que partielle avec une teneur en HA₄ et HA₆ faible et fonction du taux d'estérification est supérieur à 40% et qu'il augmente. Les pics chromatographiques obtenus sont hétérogènes et présentent certains épaulements indiquant des masses molaires majoritaires.

	HA 23 C₂ 66%	HA 23 C₂ 75%
épaulement 1	16 000 g.mol ⁻¹	16 000 g.mol ⁻¹
épaulement 2	8 600 g.mol ⁻¹	8 600 g.mol ⁻¹
épaulement 3	5 100 g.mol ⁻¹	/
épaulement 4	HA ₄	HA ₄

Tableau 21 : Masses molaires des épaulements obtenus à partir de l'analyse par couplage SEC/RI des fragments de HA 23 C₂ 66% et 75% hydrolysés et saponifiés

Le tableau 21 résume les masses molaires obtenues en utilisant l'étalonnage de notre système chromatographique en utilisant le temps d'élution au sommet de chaque épaulement. Les deux premiers épaulements sont communs aux esters HA 23 C₂ 66% et HA 23 C₂ 75%. Nous observons que le HA 23 C₂ 66% possède un épaulement supplémentaire situé vers 1730 s qui correspond à une masse molaire plus faible. Cet épaulement indique que plus le taux d'estérification est important, moins les fragments de HA sont hydrolysés. Nous obtenons également dans le cas de ces deux esters de faibles quantités de HA₄ qui diminue lorsque le taux d'estérification augmente.

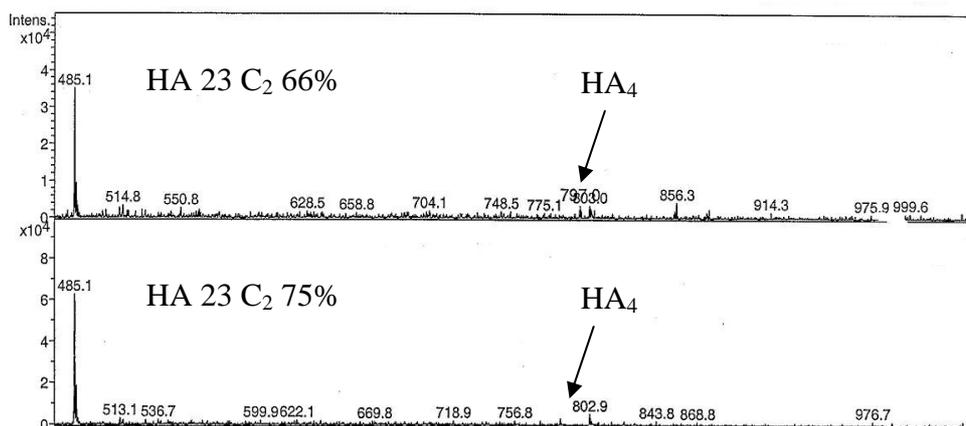
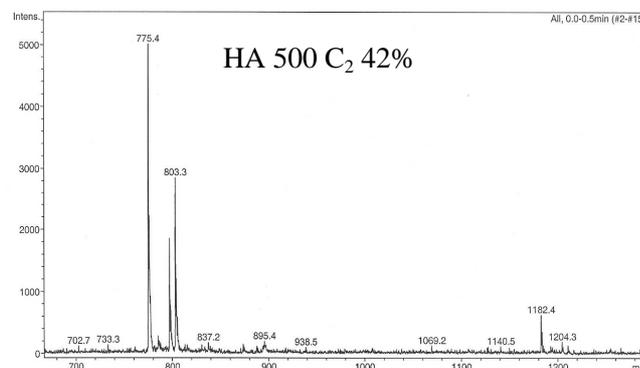
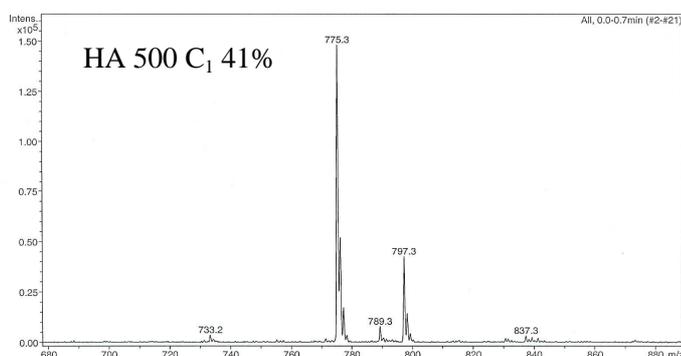


Figure 117 : HA 23 estérifiés en chaînes éthyle à 66% et 75% hydrolysés pendant 4h puis analysés par spectrométrie de masse electrospray en mode négatif. [HA] = 1 g.L⁻¹ ; [HAase] = 3 g.L⁻¹ ; [NaCl] = 0,15 mol.L⁻¹ ; pH = 4

Il ne nous est malheureusement pas possible d'analyser par spectrométrie de masse les masses molaires les plus élevées que nous observons par chromatographie SEC/RI afin de vérifier si ces fragments sont estérifiés. Cependant La spectrométrie de masse par electrospray (figure 117) nous indique la présence de HA₄ non estérifié et mono estérifié.

IV.D.1.f. Analyse des fragments de HA 500 estérifiés

Nous avons également réalisé des essais similaires avec les fragments estérifiés préparés à partir du précurseur HA 500 dans les mêmes conditions enzymatiques que celles utilisées pour les fragments de masses molaires plus faibles. Des essais ont été réalisés sur les fragments HA 500 C₁ 41%, C₂ 42%, C₄ 41% et C₈ 20%.



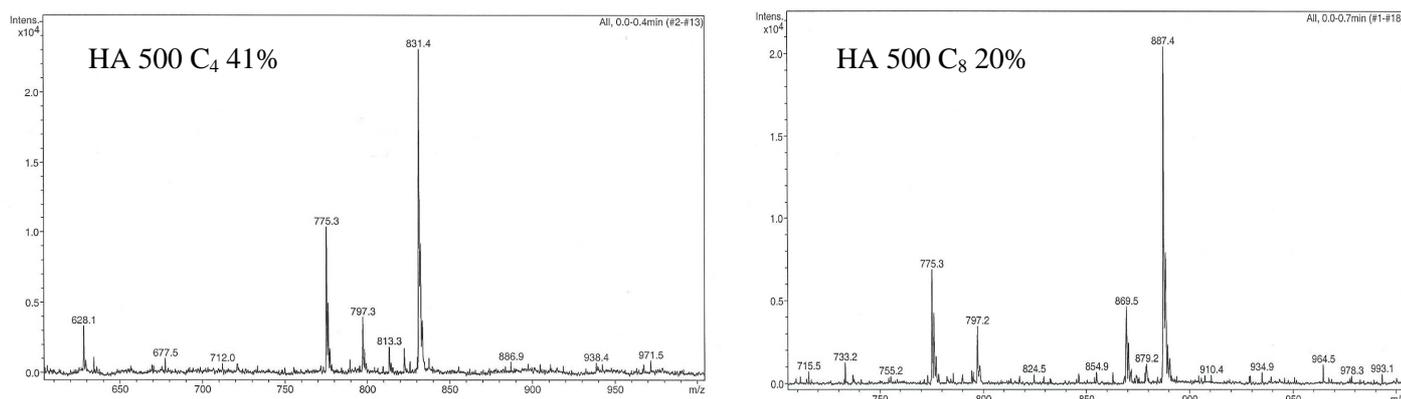


Figure 118 : HA 500 estérifiés en chaînes méthyl, éthyle, butyle et octyle hydrolysés pendant 4h puis analysés par spectrométrie de masse electrospray en mode négatif. $[HA] = 1 \text{ g.L}^{-1}$; $[HAase] = 3 \text{ g.L}^{-1}$; $[NaCl] = 0,15 \text{ mol.L}^{-1}$; $\text{pH} = 4$

La figure 118 présente les analyses obtenues par spectrométrie de masse electrospray des produits de fin de réaction pour les fragments de HA 500 estérifiés à 40% en chaînes méthyle, éthyle et butyle et à 20% en chaînes octyle en se limitant aux fractions de faibles masses molaires. Les ions fragments obtenus correspondent à des oligosaccharides HA_4 , HA_4 estérifiés et HA_6 estérifiés. Il s'agit des mêmes oligosaccharides que ceux obtenus lors de l'hydrolyse complète des HA 23 et HA 28. La masse molaire du fragment de HA avant hydrolyse n'a pas d'influence sur les produits finaux de la réaction d'hydrolyse enzymatique catalysée par la HAase.

IV.D.2. Hypothèses sur la répartition des chaînes alkyle sur les fragments de HA

Les données de la littérature sur l'incapacité la HAase à hydrolyser les liaisons $\beta(1-4)$ adjacentes à un monosaccharide glucuronique estérifié ainsi que les oligomères obtenus par hydrolyse enzymatique des fragments de HA catalysée par la HAase (analyse chromatographique et spectrométrie de masse) nous permettent d'émettre certaines hypothèses sur la répartition le long de la chaîne de HA avant hydrolyse.

Les fragments non estérifiés étudiés ont un motif disaccharidique de 401 g.mol^{-1} . D'après les masses molaires déterminées par couplage SEC/MALLS pour les fragments précurseurs, les HA 23 et 28 possèdent respectivement 60 et 70 motifs en moyenne sur leurs chaînes. A partir de ces données et des taux d'estérification

déterminés par RMN, nous pouvons tenter de schématiser l'hydrolyse enzymatique des fragments estérifiés en répartissant les chaînes alkyle selon deux hypothèses.

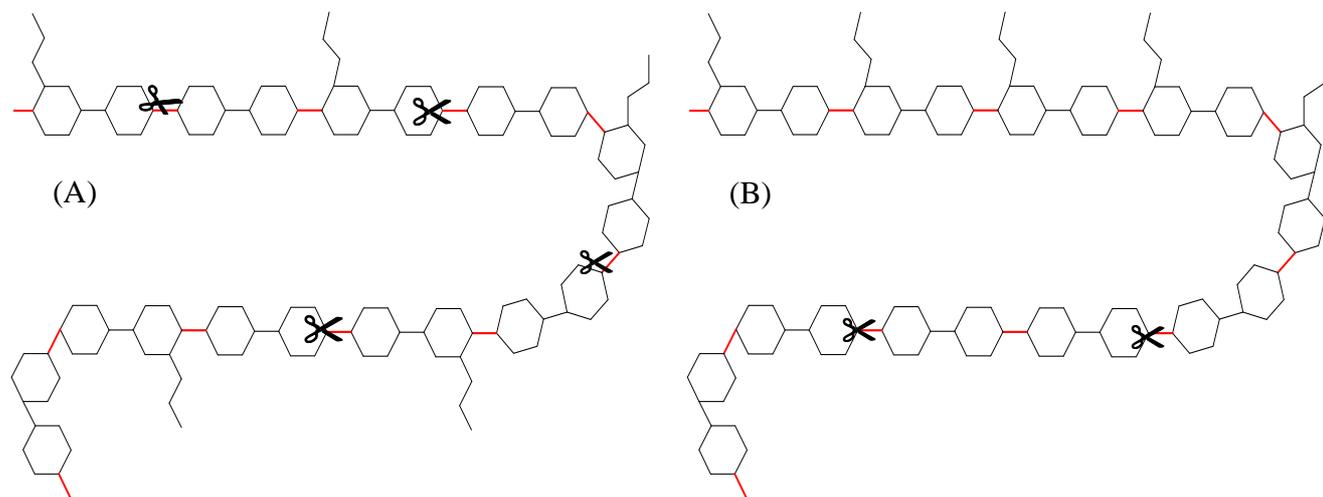


Figure 119 : Représentation schématique de l'hydrolyse enzymatique d'un fragment de HA estérifié avec deux répartitions possibles des chaînes alkyle. Exemple d'un fragment estérifié à 50%. — liaison glycosidique $\beta(1-4)$.

La figure 119 présente les deux hypothèses sur la répartition des chaînes alkyle le long du fragment de HA estérifié à 50%. La chaîne (A) nous montre une représentation statistique associée à un mécanisme d'alkylation aléatoire et la chaîne (B) une représentation en blocs associée à un mécanisme d'alkylation coopératif. Nous savons tout d'abord, grâce aux résultats obtenus pour les précurseurs HA 23 et HA 28, que le produit final de la réaction d'hydrolyse est le HA₄. Nous envisageons donc sur les fragments schématisés des coupures de liaisons glycosidiques tous les tétrasaccharides. Dans le cas de la représentation statistique, tous les oligomères obtenus seraient estérifiés. Dans le cas de la représentation en blocs, nous obtiendrions des oligomères non estérifiés et une longue chaîne totalement estérifiée. En effet, certaines recherches (Hirano *et al.*, 2005) montrent que la HAase n'hydrolyse pas le HA totalement estérifié.

Nous pouvons comparer les résultats que nous obtenons de façon théorique avec ceux obtenus expérimentalement. Lors de l'hydrolyse des fragments de HA estérifiés, nous avons également constaté la présence de HA₄ non estérifié même dans le cas des fragments ayant le taux d'estérification le plus élevé c'est-à-dire 75% en

chaîne éthyle. L'obtention d'oligomères non estérifiés prouve que les fragments de HA ne peuvent pas être estérifiés de manière homogène et donc statistique. Il semble donc que la répartition des chaînes alkyle se rapproche d'une répartition en bloc. Ceci pourrait expliquer le caractère associatif important observé lors des analyses de fluorescence pour le HA 23 et HA 28 octylé dès 40% d'estérification si les chaînes alkyle ajoutées sont proches les unes des autres.

Cependant, il ne peut pas s'agir d'une répartition totalement en bloc car nous obtenons expérimentalement des oligomères de HA₄ monoestérifiés ce qui n'est pas compatible avec une répartition en bloc (tableau 20). Cela montre que le mécanisme est intermédiaire et qu'il existe un caractère coopératif plus important lorsque la chaîne alkyle est plus longue, c'est-à-dire lorsque son caractère hydrophobe est plus intense. Nous savons que la HAase, pour effectuer son complexe spécifique avec le substrat et donc effectuer la réaction d'hydrolyse, doit se fixer sur cinq unités disaccharidiques (Ernst *et al.*, 1995). Notre étude montre que la HAase, est capable de se fixer sur des motifs contenant une fonction carboxyl estérifiée.

CONCLUSION GENERALE

Ce travail de recherche porte sur la préparation et la caractérisation chimique et physico-chimique de dérivés amphiphiles de fragments de HA pour étudier l'influence de la balance hydrophile/hydrophobe (HLB), nous avons synthétisé des fragments de HA portant des chaînes alkyle de longueur et en proportions variables. Ce travail se poursuit par une étude cinétique de l'hydrolyse enzymatique des dérivés de HA préparés catalysée par la hyaluronidase.

Une synthèse bibliographique présente tout d'abord les nombreuses propriétés des deux macromolécules utilisées dans ce travail : le HA et la HAase ainsi que l'intérêt de modifier chimiquement le HA en lui apportant de l'hydrophobie. Les propriétés biologiques du HA sont à l'origine de diverses applications dans les domaines médical et cosmétique et varient selon la masse molaire du HA. Dans ce contexte, nous avons choisi de modifier du HA par réaction de substitution nucléophile semblable à une réaction d'estérification. Les fragments utilisés pour cette modification ont une masse molaire d'environ 30 000 et 500 000 g.mol⁻¹.

Afin de réduire la masse molaire du HA aux valeurs souhaitées, nous avons employé comme technique l'hydrolyse enzymatique catalysée par la HAase. Les thèses précédentes (Astériou, 2002 ; Tranchepain, 2004 ; Levasseur, 2006 ; Lenormand, 2007) ainsi que ce travail permettent de bien connaître les paramètres influençant la réaction : la concentration en HA et en HAase, la force ionique ainsi que le pH. Ces diverses connaissances ont permis d'optimiser le protocole de production. Les deux HAases étudiées par notre équipe sont la HAase testiculaire bovine et la HAase de venin d'abeille qui appartiennent au groupe des hyaluronates 4-glycanohydrolases et qui catalysent l'hydrolyse des liaisons $\beta(1-4)$ du HA. Toutes les deux ont la capacité de former deux types de complexes avec le HA. Le complexe spécifique de type enzyme-substrat (ES) est nécessaire pour activer l'hydrolyse alors que le complexe non-spécifique de nature électrostatique entre le HA et la HAase inhibe la réaction d'hydrolyse. Pour réaliser nos productions de fragments, le choix s'est porté sur la HAase de venin d'abeille pour laquelle la réaction d'hydrolyse enzymatique est prépondérante devant la réaction de complexation. De faibles masses molaires de l'ordre de 30 000 g.mol⁻¹ et de fortes masses molaires de l'ordre de 500

000 g.mol⁻¹ en Mn sont produites afin d'obtenir des comportements enzymatiques très différents.

La réaction utilisée pour modifier chimiquement les fragments de HA est une substitution nucléophile bimoléculaire entre les groupements carboxylates d'une chaîne de HA et un halogénure d'alkyle. Cette réaction s'effectue dans le DMF à 60°C pendant 24h. Par cette méthode, nous avons estérifié les fragments de HA en greffant des groupes alkyle allant du méthyle à l'octyle. La détermination du taux d'estérification est possible de manière précise par RMN ¹H pour la plupart des esters de HA excepté dans le cas du greffage de la chaîne méthyle où la méthode conductimétrique est employée. Afin de conserver la RMN ¹H comme méthode de détermination du taux d'estérification pour le greffage de la chaîne méthyle, il serait intéressant d'envisager une détermination indirecte en conservant les contre ions TBA visibles en RMN. Une large gamme de taux d'estérification est obtenue allant de 3% à 75% selon la chaîne alkyle pour les fragments de HA de masses molaires faibles et de 3% à 40% pour les fragments de masses molaires importantes. Afin de ne conserver que les polymères hydrosolubles, le HA 500 C₈ 40%, n'étant pas soluble dans l'eau, n'a pas été davantage étudié par la suite.

Le comportement physicochimique des esters de HA a été étudié via des analyses de séparation par couplage SEC/MALLS/DRI, AF4/MALLS/DRI, par viscosimétrie ainsi que par fluorescence. La présence d'agrégats est mise en évidence par l'ensemble des techniques utilisées. Les proportions de ces agrégats varient selon la chaîne alkyle, le taux d'estérification et la masse molaire du HA choisi. Pour les fragments de HA de faibles masses molaires, les quantités d'agrégats deviennent importantes pour les esters de HA greffés en chaînes octyle et pour l'ester HA 23 C₂ 75%. Dans ce cas, les interactions mises en jeu sont de type intermoléculaire entre les chaînes alkyle greffées. La probabilité d'interaction hydrophobe augmente donc avec le taux d'estérification et la longueur de la chaîne alkyle. L'effet agrégatif s'accroît avec l'augmentation de la masse molaire des fragments de HA puisque les agrégats sont observables en quantité importante dès la présence de 40% de méthyle dans le cas du HA 500. La présence de chaînes alkyle modifie la conformation du HA en solution diluée. Pour les deux tailles de fragments utilisés, les chaînes de HA hydrophobisées forment des structures plus compactes que leur précurseur. L'augmentation de la masse molaire des fragments de HA induit en plus des

interactions hydrophobes intermoléculaires existantes, des interactions de type intramoléculaire. L'augmentation de la température ainsi que la force ionique ne font que renforcer le phénomène de compacité des chaînes de HA étudiées. Elargir la gamme de concentration étudiée et ainsi comprendre le comportement en solution des HA hydrophobisés pour chaque régime serait intéressant par la suite.

L'hydrolyse enzymatique des différents esters de HA préparés ainsi que des précurseurs a été suivie par la méthode de Reissig et la chromatographie par couplage SEC/RI pour obtenir les cinétiques. Dans le cas du HA non modifié, les valeurs de M_n obtenues après hydrolyse sont semblables par les deux méthodes ce qui n'est pas le cas pour les HA estérifiés. La présence d'hydrophobie sur les chaînes de HA crée des interactions non spécifiques avec des parties hydrophobes de la HAase hors du site actif ainsi que des interactions spécifiques défavorables à l'étape d'hydrolyse qui suit. Une inhibition de nature mixte se met en place. De plus, les conformations très compactes des HA hydrophobisés empêche la HAase d'accéder à des segments de la chaîne de HA pouvant être hydrolysés. Les interactions hydrophobes inhibent donc partiellement l'activité catalytique de la HAase comme le font dans certaines conditions les interactions électrostatiques (Deschrevel *et al.*, 2008, Lenormand *et al.*, 2009). L'activité de la HAase est donc sensible à différents types d'interactions. Cependant, alors que les interactions électrostatiques peuvent rendre la HAase totalement inactive, les interactions hydrophobes empêchent l'hydrolyse totale des fragments de HA estérifiés mais ne la rendent pas inactive vis-à-vis de HA non estérifié présent dans le même milieu.

Une étude approfondie du produit final d'hydrolyse des esters de HA ainsi que des fragments de HA précurseurs a été réalisée.

Concernant les HA non modifiés, les études réalisées jusqu'à présent sur le produit final de l'hydrolyse enzymatique présentent toute le HA₄ comme produit majeur de cette réaction accompagné d'une quantité importante de HA₆ (Meyer, 1971 ; Roden *et al.*, 1989 ; Payan *et al.*, 1993 ; Kakisaki *et al.*, 2010). Payan *et al.* (1993) montrent que la proportion de HA₄ et HA₆ varie selon les conditions de réaction d'hydrolyse et Kakisaki *et al.* (2010) démontrent que le HA₆ est un substrat de la HAase testiculaire. Ceci suggère que le mélange HA₄ et HA₆ ne correspond pas au produit final de la réaction d'hydrolyse catalysée par la HAase. Notre étude du produit final met en évidence que pour l'hydrolyse des fragments précurseurs HA 23,

HA 28 et HA 500, le produit final obtenu est uniquement du HA₄. Il est probable qu'utiliser des fragments de HA au lieu de HA natif permette d'obtenir le produit final de la réaction enzymatique. En effet, Tranchepain et al. (2006) montrent que le comportement cinétique du couple HA/HAase est différent selon la masse molaire du HA utilisé comme substrat. La vitesse initiale peut être plus rapide lorsque les fragments ont des masses molaires plus faibles au départ.

Concernant les esters de HA, cette étude permet de conclure que la répartition des chaînes alkyle le long de la chaîne de HA ne s'effectue pas de manière homogène. Nous avons également mis en évidence qu'il existe un caractère associatif lors de l'étape d'estérification. Ce caractère associatif est dépendant de la longueur de la chaîne alkyle et du taux d'estérification choisi. Le mécanisme de répartition des chaînes alkyle est donc intermédiaire. Les esters de HA préparés présentent donc une hétérogénéité de la répartition des chaînes alkyle. Les chaînes alkyle étant proches dans l'espace, les associations hydrophobes sont favorisées ainsi que la formation d'agrégats observés lors des analyses précédentes. La répartition hétérogène ainsi que les nouvelles conformations dues aux interactions hydrophobes ne permettent pas à la HAase d'effectuer une hydrolyse complète des fragments de HA. Des études ont permis d'observer dans le cas de chitosanes alkylés que la présence simultanée d'interactions électrostatique et hydrophobe crée des systèmes interagissant de façon plus stable avec des membranes mimant la membrane plasmique. (Ercelen *et al.*, 2006). Il serait donc important de réaliser des études cinétiques d'hydrolyse enzymatique des esters de HA sans ajout de sel dans le milieu réactionnel afin d'observer l'influence de la présence simultanée d'interactions électrostatiques et hydrophobes sur la réaction enzymatique.

Ce travail de recherche s'inscrit dans une étude beaucoup plus large qui va de l'aspect chimie et physicochimie avec le HA et ses oligosaccharides au domaine médical. L'activité de la HAase contrôle la balance entre les longues et les courtes chaînes de HA et celles-ci pourraient être présentes dans les tissus avec des inhibiteurs qui permettraient alors l'activité ou l'inactivité de l'enzyme. Cependant, même si quelques activités inhibitrices de la HAase ont été détectées (Mio et Stern, 2002), les structures moléculaires et les mécanismes d'action des inhibiteurs de la HAase sont très peu connus. Les fonctions biologiques du HA étant liées à sa taille de chaîne, contrôler l'activité de la HAase signifierait favoriser certaines fonctions et inhiber les autres. Les premières études effectuées au laboratoire en collaboration avec le

laboratoire MERCI sur les esters de HA (Levasseur, 2006) ont montré une influence de l'estérification sur les phénomènes d'invasion tumorale et de prolifération cellulaire. Le HA estérifié par des chaînes octyle à 40%, composé le plus riche de notre gamme en microdomaines hydrophobes, diminue significativement le potentiel invasif et le potentiel de prolifération des cellules cancéreuses. L'hydrolyse partielle de ce HA octylé, montrée dans notre étude, ne permet pas d'obtenir les tailles de HA nécessaires à ses phénomènes biologiques.

Des perspectives plus générales sont envisageables à partir de ces travaux de recherche. Il serait intéressant d'étudier davantage le phénomène de complexation hydrophobe mis en évidence entre le HA hydrophobisé et la HAase dans le but d'obtenir des inhibiteurs. David *et al.* (2004 ; 2008) ont montré que les hydrogels de HA sont des systèmes appropriés à l'étude de culture cellulaire. En préparant des hydrogels à partir d'esters de HA, des structures tridimensionnelles contenant des hétérogénéités par la présence de microdomaines hydrophobes se formeraient. Ces hydrogels seraient plus ou moins sensibles à l'activité de la HAase. Des micro-hétérogénéités de leurs propriétés permettraient localement de limiter la diffusion d'espèces favorisant la prolifération cellulaire. Ces microdomaines pourraient également être utilisés pour piéger des molécules hydrophobes actives sur les processus biologiques. Il serait alors possible d'étudier leur influence sur les mécanismes de différenciation ou de prolifération cellulaire.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aboughalia A. H. (2006) Elevation of hyaluronidase-1 and soluble intercellular adhesion molecule-1 helps select bladder cancer patients at risk of invasion, *Archives of medical research*, 37:109-116

Adam N. and Gosh P. (2001) Hyaluronan molecular weight and polydispersity in some commercial intra-articular injectable preparations and in synovial fluid, *Inflammation Research*, 50 : 294-299

Adams M.D., Celniker S.E., Holt R.A., Evans C.A., Gocayne J.D., Amanatides P.G., Sherer S.E., Li P.W., Hoskins R.A. and Galle R.F. (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*, *Science*, 287 : 2185-2195

Alberts (2008) Cell junction, cell adhesion and the extracellular matrix. In: *Molecular biology of the Cell*, New York and London: Garland Science, 1131-1204

Allalouf D., Ber A. and Ishay J. (1975) Properties of testicular hyaluronidase of the honey bee and oriental hornet: Comparison with insect venom and mammalian hyaluronidases, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 50:331-337

Almond A., Brass A. and Sheehan J.K. (1998) Dynamic exchange between stabilized conformations predicted for hyaluronan tetrasaccharides: comparison of molecular dynamics simulations with available NMR data, *Glycobiology*, 8 : 973- 980

Almond A., Brass A. and Sheehan J.K. (2000) Oligosaccharides as model systems for understanding water-biopolymer interaction: hydrated dynamics of a hyaluronan decamer, *J. Phys. Chem. B*, 104, 5634-5640

Almond A., DeAngelis P.L., and Blundell C.D., Hyaluronan: The Local Solution Conformation Determined by NMR and Computer Modeling is Close to a Contracted Left-handed 4-Fold Helix, *Journal of Molecular Biology*, 358 : 1256-1269

Almond A., Sheehan J.K. and Brass A. (1997) Molecular dynamics simulations of the two disaccharides of hyaluronan in aqueous solution, *Glycobiology*, 7 : 597-604

Anadere I., Chmiel H. and Laschner W. (1979) Viscoelasticity of normal and pathological synovial fluid, *Biorheology*, 16 : 179-184

Antonietti M., Burger C. and Thünemann A. (1997) Polyelectrolyte-surfactant complexes : A new class of highly ordered polymer materials, *Trends in polymer science*, 5:262-267

Asari A. and Miyauchi S. (2000) Medical applications of hyaluronan, <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA12/HA12E.html>

Astériou T. (2002) Thèse de doctorat : cinétique de la réaction d'hydrolyse du hyaluronane catalysée par la hyaluronidase testiculaire bovine. Transposition à une hyaluronidase extraite de tumeurs cancéreuses humaines, Laboratoire PBM, Université de Rouen

Astériou T., Deschrevel B., Delpech B., Bertrand P., Bultelle F., Merai C. and Vincent J. C. (2001) An improved assay for the N-acetyl-D-glucosamine reducing ends in the presence of proteins, *Anal. Biochem.*, 293:53-59

Astériou T., Vincent J. C., Tranchepain F. and Deschrevel B. (2006) Inhibition of hyaluronan hydrolysis catalysed by hyaluronidase at high substrate concentration and low ionic strength, *Matrix Biology*, 25:166-174

Atkins E.D.T., Meader D. and Scott J.E. (1980) Model for hyaluronic acid incorporating four hydrogen bonds, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2 : 318-319

Aubry T. and Moan M. (1994) Rheological behavior of a hydrophobically associating water soluble polymer, *J. Rheol.*, 38 : 1681-1692

Balazs E.A. and Denlinger, J.L. (1993) Viscosupplementation: a new concept in the treatment of osteoarthritis, *J. Rheumatology*, 39 : 3-9

Balazs E.A., Bland P.A., Denlinger J.L., Goldman A.I., Larsen N.E., Leshchiner E.A., Leshchiner A. and Morales B. (1991) Matrix engineering, *Blood coagul. Fibrinolysis*, 2 : 173-178

Band P. (1985) Effective use of hyaluronic acid, *Drug and cosmetic industry*, 54-57

Band P.A. (1998) Hyaluronan derivatives : chemistry and clinical applications, in *Chemistry, Biology and Medical Applications and its derivatives*; Laurent T.C., Ed.; Portland press : London, 33-42

Barbucci R., Magnani A., Casolaro M., Marchettini N., Rosi C. and Bosco M. (1995) Modification of hyaluronic acid by insertion of sulfate groups to obtain a heparin-like molecule. Part I. Characterization and behavior in aqueous solution towards H⁺ and Cu²⁺ ions, *Gazz. Chim. Ital.*, 125 : 169-180

Barzu T., Level M., Petitou M., Lormeau J.C., Choay J., Schols D., Baba M., Pauwels R., Witvrouw M. and Declercq E. (1993) Preparation and anti-HIV activity of O-acylated heparin and dermatan sulfate derivatives with low anticoagulant effect, *Journal of Medicinal Chemistry*, 36 : 3546-3555

Berriaud N., Milas M. and Rinaudo (1998) Characterization and properties of hyaluronic acid (hyaluronan). In polysaccharides : structural diversity and functional versatility, (ed. S. Dumitriu), Marcel Dekker, Inc., New York, 313-334

Biggs S., Selb J. and Candau F.; *Langmuir*, 1992, 8 : 838-847

Binana-Limbele W., Clouet F. and François J. (1993) Hydrophobically end-capped poly (ethylene oxide) urethanes. Part 3: Effect of sodium dodecyl sulphate on their association in aqueous solution, *Colloid & Polymer Science*, 271:748-758

Binana-Limbele W., Clouet F., and François J. (1993) Hydrophobically end-capped poly (ethylene oxide) urethanes. Part 3: Effect of sodium dodecyl sulphate on their association in aqueous solution, *Colloid Polym. Sci.*, 271 : 748-758

Bock J., Valint Jr P.L., Pace S.J., Siano D.B., Schulz D.N., and Turner, S.R., (1988) Water-Soluble Polymers for Petroleum Recovery. G. A. Stahl, D. N. Schulz, *Plenum Press*, Chap 9, 147, New York

Botzki A. (2004) Thèse de doctorat : Structure-based design of hyaluronidase inhibitors. Laboratoire der Naturwissenschaftlichen Fakultät IV – Chemie und Pharmazie – der Universität Regensburg

Brown M.B. and Jones S.A. (2005) Hyaluronic acid: a unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin, *JEADV*, 19 : 308-318

Brun P., Abatangelo G., Radice M., Zacchi V., Guidolin D., Daga Gordini D. and Cortivo R. (1999) Chondrocyte aggregation and reorganization into three-dimensional scaffolds, *J. Biomed. Mater. Res.*, 46 : 337-346

Bunting J.W. and Myers C.D. (1973) Reversible Inhibition of Carboxypeptidase A. IV. Inhibition of Specific Esterase Activity by Hippuric Acid and Related Species and other Amino Acid Derivatives and a Comparison with Substrate Inhibition, *Can. J.Chem.*, 53

Burd D.A., Greco R. M., Regauer S., Longaker M.T., Siebert J.W. and Garg, H.G. (1991) Hyaluronan and wound healing: a new perspective, *J. Plast. Surg.*, 44 : 579-584

Campoccia D., Doherty P., Radice M., Brun P., Abatangelo G. and Williams D.F. (1998) Semisynthetic resorbable materials from hyaluronan esterification, *Biomaterials*, 19 : 2101-2127

Carvalho A.J.F. and Curvelo A.A.S., (2003) Effect of sulfonation level on solubility and viscosity behavior of low to medium charged sulfonated polystyrenes, *Macromolecules*, 36 : 5304-5310

Chain E. and Duthie E. S. (1939) A mucolytic enzyme in testis extracts, *Nature*, 144:977-978

Chajara A., Raoudi M., Delpech B. and Levesque H. (2003) Inhibition of arterial cells proliferation in vivo in injured arteries by hyaluronan fragments, *Atherosclerosis*, 171 : 15-19

Chao K. L., Muthukumar L. and Herzberg O. (2007) Structure of human hyaluronidase-1, a hyaluronan hydrolyzing enzyme involved in tumor growth and angiogenesis, *Biochemistry*, 46:6911-6920

Chen W.Y. and Abatangelo G. (1999) Functions of hyaluronan in wound repair, *Wound Repair Regen.*, 7 : 79-89

Chen, F., Kakizaki, I., Yamaguchi, M., Kojima, K., Takagaki, K., and Endo, M. (2009). Novel products in hyaluronan digested by bovine testicular hyaluronidase, *Glycoconjugate Journal*, 26: 559-566

Cherr G. N., Yudin A. I. and Overstreet J. W. (2001) The dual functions of GPI-anchored PH-20: hyaluronidase and intracellular signaling, *Matrix Biology*, 20:515-525

Chytil M. and Pekar M. (2009) Effect of new hydrophobic modification of hyaluronan on its solution properties : evaluation of self-aggregation, *Carbohydrate polymers*, 76:443-448

Cifonelli J.A. and Mayeda M. (1957) The purification of hyaluronic acid by the use of charcoal, *biochimica et Biophysica Acta*, 24 : 397-400

Cohen J., Priel Z. and Rabin Y. (1988) Viscosity of dilute polyelectrolyte solution, *Journal of chemical Physics*, 88 : 7111-7116

Colinet I., Dulong V., Hamaide T., Le Cerf D. and Picton L. (2009) Unusual rheological properties of a new associative polysaccharide in salt media, *Carbohydrate Polymers*, 77 : 743-749

Cornish-Bowden A. and Eisenthal R. (1974) Statistical considerations in the estimation of enzyme kinetic parameter by the direct linear plot and other methods, *Biochem. J.*, 139 : 721-730

Cowman M.K., Cozart K., Nakanishi K. and Balazs E.A. (1984) ¹H NMR of glycosaminoglycans and hyaluronic acid oligosaccharides in aqueous solution : the amide proton environment, *Arch. Biochem. Biophys.*, 230 : 203-212

Cramer J.A., Bailey L. C., Bailey C. A. and Miller R. T. (1994) Kinetics and mechanistic studies with bovine testicular hyaluronidase, *Biochem. Biophys. Acta*, 1200:315-321

Cramer J.A., L.C. Bailey, C.A. Bailey and R.T. Miller (1994). Kinetics and mechanistic studies with bovine testicular hyaluronidase. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1200 : 315-321

Creuzet C., Kadi S. and Rinaudo M. (2006) New associative systems based on alkylated hyaluronic acid : Synthesis and aqueous solution properties, *Polymer*, 47:2706-2713

Csoka A. B., Frost G. I. and Stern R. (2001) The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes, *Matrix Biology*, 20:499-508

Csoka, A. B., Frost, G. I., & Stern, R. (2001). The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genome, *Matrix Biology*, 20 : 499-508

Dausse Y., Grossina L., Miralles G., Pelletier S., Mainard D., Hubert P., Baptiste D., Gillet P., Dellacherie E., Netter P. and Payan E. (2003) Cartilage repair using new polysaccharidic biomaterials: macroscopic, histological and biochemical approaches in a rat model of cartilage defect, *Osteoarthritis and Cartilage*, 11 : 16-28

David L., Dulong V., Le Cerf D., Cazin L., Lamacz C. and Vannier J.P. (2008) Hyaluronan hydrogel: An appropriate three-dimensional model for evaluation of anticancer drug sensitivity, *Acta Biomaterialia*, 4 : 256-263

David L., Dulong V., Le Cerf D., Chauzy C., Norris V., Delpech B., Lamacz M. and Vannier J-P. (2004) Reticulated hyaluronan hydrogels: a model for examining cancer cell invasion in 3D, *Matrix Biology*, 23 : 183-193

Davidson and Meyer (1954) Chondroitin, a new mucopolysaccharide, *J. Biol. Chem.*, 211 : 605

Deed R., Rooney P., Kumar P., Norton J.D., Smith J., Freemont A.J. and Kumar S. (1998) Early-response gene signalling is induced by angiogenic oligosaccharides of hyaluronan in endothelial cells. Inhibition by non-angiogenic, high-molecular-weight hyaluronan, *International of cancer*, 71 : 251-256

Della Valle F. and Romeo A. (1990) Polysaccharide esters and their salts. Brevet n° 4,965,353

Delpech B., Maingonnat C., Girard N., Chauzy C., Oliver A., Manoury R., Tayot J. and Creissard P. (1993) Hyaluronan and hyaluronectin in the extracellular matrix of human brain tumour stroma, *European Journal of Cancer*, 29 : 1012-1017

Denuziere A., Ferrier D., and Domard A. (2000) Interactions between chitosan and glycosaminoglycans (chondroitin sulfate and hyaluronic acid), *physicochemical and biological studies. Ann. Pharm. Fr.*, 58 : 47-53

Deschrevel B., Lenormand H., Tranchepain F., Levasseur N., Astériou T. and Vincent J-C. (2008) Hyaluronidase activity is modulated by complexing with various polyelectrolytes including hyaluronan, *Matrix Biology*, 27:242-253

Dixon M. and Webb E.C. (1979) Enzymes, *Academic Press Inc., New York*

Domon B. and Costello C.E. (1988) A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates, *Glycoconjugate journal*, 5 : 397-409

Dowd J.E. and Riggs D.S. (1965) A comparison of estimates of Michaelis-Menten kinetic constants from various linear transformations, *Journal of Biological Chemistry*, 240 : 863-869

Dragan S. and Ghimici L. (2001) Viscometric behaviour of some hydrophobically modified cationic polyelectrolytes, *Polymer*, 42 : 2887-2891

Eadie G.S. (1942) The inhibition of cholinesterase by Physostigmine and Prostigmine, *Journal of Biological Chemistry*, 146 : 85-89

Eilers H. (1941) Die Viskosität von Emulsionen hochviskoser Stoffe als Funktion der Konzentration , *Colloid & Polymer Science*, 97:313-321

Elson L. and Morgan W. (1933) A colorimetric method for the determination of glucosamine and chondrosamine, *Biochem. J.*, 27:1824-8

Ercelen S., Zhang X., Duportail G., Grandfils C., Desbrières J., Karaeva S., Tikhonov V., Mély Y. and Babak V. (2006) Physicochemical properties of low molecular weight alkylated chitosans: A new class of potential nonviral vectors for gene delivery, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 51:140-148

Ernst S., Langer R., Cooney C. L. and Sasisekharan R. (1995) Enzymatic degradation of glycosaminoglycans, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 30:387-444

Eyler, R. W., Klug, T. S.; Siephuis, F.,(1947) Determination of degree of substitution of sodium carboxymethylcellulose, *Anal. Chem.*, 19 : 24

Fedors R. F. (1979) An equation suitable for describing the viscosity of dilute to moderately concentrated polymer solutions, *Polymer*, 20:225-228

filtration, *Biopolymers*, 13 : 1357-1366

Finck C. (2008) thèse de doctorat : Implantation de hayluronanes estérifiés lors de la microchirurgie des lésions cordales bénignes, université de Liège Belgique

Finck C. and Lefebvre P., (2005) Implantation of esterified hyaluronic acid in microdissected reinke's space after vocal fold microsurgery: first clinical experiences, *The Laryngoscope*, 115 : 1841-1847

Finck C., Harmegnies B., Remacle A. and Lefebvre P. (2009) Implantation of esterified hyaluronic acid in microdissected reinke's space after vocal fold microsurgery : short and long term result, *Journal of voice*, DOI 10.1016/j.jvoice.2008.12.015

Fouissac E., Milas M., Rinaudo M. and Borsali R. (1992) Influence of the ionic strength on the dimensions of sodium hyaluronate, *Macromolecules*, 25 : 5613-5617

Frohberg C. and Koch R. (2006) Process and means for the production of hyaluronan, European Patent 1640457

Frost, G. I., and Stern, R. (1997b). A microtiter-based assay for hyaluronidase activity not requiring specialized reagents, *Analytical Biochemistry*, 251 : 263-269

Frost, G. I., Csoka, A. B., Wong, T., & Stern, R. (1997a). Purification, cloning, and expression of human plasma hyaluronidase, *Biochemical Biophysical Research Communications*, 236 : 10-15

Fuoss R. M. (1948) The physical chemistry of polymers, *Am Sci.*, 36:75-101

Gacesa P., Savitsky M. J., Dodgson K. S. and Olavesen A. H. (1981) A recommended procedure for the estimation of bovine testicular hyaluronidase in the presence of human serum, *Analytical Biochemistry*, 118:76-84

Gaskell S.J. (1997) Electrospray: Principles and Practices, *J. Mass Spectrom.* 32:677-688

Gibbs D.A., Merrill E.W., and Smith K. (1968) Rheology of hyaluronic acid, *Biopolymers*, 6 : 777-791

Girish K.S. and K. Kemparaju, (2005) Inhibition of *Naja naja* venom hyaluronidase by plant-derived bioactive components and polysaccharides, *Biochem. (Moscow)*, 70:948-952

Girish K.S. and Kemparaju K. (2007) The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase : a biological overview, *Life Science*, 80 : 1921-1943

Glinel, K., Laschewsky A. and Jonas A. M.(2001) Ordered polyelectrolyte "multilayers". 3. Complexing clay platelets with polycations of varying structure. *Macromolecules*, 34 : 5267-5274

Gmachl M. and Kreil G. (1993) Bee venom hyaluronidase is homologous to a membrane protein of mammalian sperm, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90:3569-3573

Goa K. and Benfield P. (1994) Hyaluronic acid. A review of its pharmacology and use as a surgical id in ophtalmology, and its therapeutic potential in joint disease and wound healing, *Drugs*, 47 : 536-566

Gouanvé F., Picton L., Le Cerf D., Dugast J.Y., Dulong V., Mocanu G. et Muller G. (2001) Synthèse, caractérisation et dégradation chimique de Carboxyméthylpullulane et de deux dérivés amphiphiles, *Chem. Bull.* , "Politechnica" Univ. (Timisoara), 46 : 25-35

Grais M.L. and D. Glick (1948) Mucolytic enzyme systems. II. Inhibition of hyaluronidase by serum in skin diseases, *Journal of Clinical Dermatology*, 11:259-273

Graves M.V., Burbank D.E., Roth R., Heuser J., DeAngelis P.L. and Van Etten J.L. (1999) Hyaluronan synthesis in virus PBCV-1-infected chlorella like green algae, *Virology*, 257 : 15-23

Gunter G. S. (1949) The determination of spinnbarkeit of synovial fluid and its destruction by enzymic action, *Australian journal of experimental biology and medical science*, 27:265-274

Haas E. (1946) On the mechanism of invasion, *The journal of biological chemistry*, 163:63-88

Hanes C.S. (1932) Studies of plant amylases. I. The effect of starch concentration upon the velocity of hydrolysis by the amylase of germinated barley, *biochem. J.*, 26 : 1406-1421

Hara S., Yoshida K. and Ishibara M. (2003) Process for producing desulfated polysaccharide and desulfated heparin, US patent 6545136

Harris T. N. and Harris S. (1950) Turbidimetric measurement of streptococcal antihyaluronidase in the sera of patients with streptococcal infection and rheumatic fever, *Journal of immunology*, 63:249-260

Haxaire K., Braccini I., Milas M., Rinaudo M. and Pérez S. (2000) Conformational behavior of hyaluronan in relation to its physical properties as probed by molecular modelling, *Glycobiology*, 10 : 587-594

Haxaire K., Maréchal Y., Milas M. and Rinaudo M. (2003) Hydration of hyaluronan polysaccharide observed by IR spectrometry. I.Preliminary experiments and bands assignments, *Biopolymers (Biospectroscopy)*, 72 : 10-20

Heatley F., and Scott J.E. (1988) A water molecule participates in the secondary structure of hyaluronan, *Biochem. J.*, 254 : 489-493

Hill A., Candau F. and Selb J. (1993) Properties of hydrophobically associating polyacrylamides : influence of the method of synthesis, *Macromolecules*, 26:4521-4532

Hirano K., Sakai S., Ishikawa T., Avci F.Y., Linhardt R.J. and Toida T. (2005) Preparation of the methyl ester of hyaluronan and its enzymatic degradation, *Carbohydrate Research*, 340, 2297-2304

Hirano S. and Kondo S. (1973) Molecular conformational transition of hyaluronic acid in solution, *J. Biochem.*, 74 : 861-862

Hirano S. and Kondo-Ikeda S. (1974) Molecular conformation of polysaccharides in solution. Changes in the optical rotation and in the elution pattern of gel filtration, *Biopolymers*, 13 : 1357-1366

Hofstee B. H. N. (1959) Non-inverted versus inverted plots in enzyme kinetics, *Nature* 184 : 1296-1298

Hofstee BH. (1959) Non-inverted versus inverted plots in enzyme kinetics, *Nature*, 184:1296-1298

Honek T., Hausnerova B. and Saha P. (2004) Relative viscosity models and their application to capillary flow data of highly filled hard-metal carbide powder compounds, *Polymer Composites*, 26:29-36

Huggins M.L. (1942) Theory of solutions of high polymers, *J. Am. Soc.*, 64:1712-1719

Humphrey, J.,and Jaques, R. (1953) Hyaluronidase: correlation between biological assay and other methods of assay, *Biochemical Journal*, 53 : 59-62

Ikegami-kawai M. and Takahashi T. (2002) Microanalysis of hyaluronan oligosaccharides by polyacrylamide gel electrophoresis and its application to assay of hyaluronidase activity, *Analytical biochemistry*, 311:157-165

Jackson P. (1990) The use of polyacrylamide-gel electrophoresis method for analysis of hyaluronan molecular weight distribution, *Anal. Biochem.*, 219 : 278-287

Jaques, R. (1953) A biological assay of hyaluronidase, *Biochemical Journal*, 53: 56-59

Jeanloz R. and Flowers H. (1962) The isolation and synthesis of the methyl ester-methyl α glycoside of 3-o- β -D-glucuronosyl-N-acetyl-D-glucosamine (hyalobiuronic acid), *J. Am. Chem. Soc.*, 84 : 3030

Jedrzejas M. J. and Stern R. (2005) Structures of vertebrate hyaluronidases and their unique enzymatic mechanism of hydrolysis, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 61:227-238

Kakisaki I., Nobuyuki I., Kaoru K., Masanori Y., and Masahiko E. (2010) Mechanism for the hydrolysis of hyaluronan oligosaccharides by bovine testicular hyaluronidase, *FEBS*, 277 : 1776-1786

Kalyanasundaram K. and Thomas J.K. (1977) Environmental effects on vibronic band intensities in pyrene monomer fluorescence and their application in studies of micellar systems, *J. Am. Chem. Soc.*, 99 : 2039-2044

Khanum S. A., Murari S. K., Vishwanth B. S. and Shashikanth S. (2005) Synthesis of benzoyl phenyl benzoates as effective inhibitors for phospholipase A2 and hyaluronidase enzymes, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 15:4100-4115

King S.R., Hickerson W.L. and Proctor, K.G. (1991), Beneficial actions of exogenous hyaluronic acid on wound healing, *Surgery*, 109 : 76-84

Kobayashi Y., Okamoto, A. and Nishinari, K. (1994) Viscoelasticity of hyaluronic acid with different molecular weights, *Biorheology*, 31 : 235-244

Kumari K., Baggenstoss B.A., Parker A.L. and Weigel P.H. (2006) Mutation of two intramembrane polar residues conserved within the hyaluronan synthase family alters hyaluronan product size, *Journal of biological chemistry*, 281 : 11755-11760

Laurent T.C. and Fraser J.R. (1992) Hyaluronan, *Faseb J.*, 6 : 2397-2404

Leach J.B. and Schmidt E. (2004) Hyaluronan, *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*, Marcel Dekker, New York 779–789

Lee J.Y., Spicer A.P. (2000) Hyaluronan : a multifunctional, megaDalton, stealth molecule, *Current Opinion in Cell Biology*, 12 : 581-586

Lenormand H., Deschrevel B., Tranchepain F. and Vincent J-C. (2008) Electrostatic interactions between hyaluronan and proteins at pH 4: How do they modulate hyaluronidase activity, *Biopolymers*, 89 : 1088-1103

Lenormand H., thèse de doctorat (2007), L'activité enzymatique de la hyaluronidase sous le dépendance de la complexation non-spécifique entre le hyaluronane et les protéines, laboratoire PBS, université de Rouen

Lenormand H., Tranchepain F., Deschrevel B. and Vincent J. C. (2009) The hyaluronan—protein complexes at low ionic strength: How the hyaluronidase activity is controlled by the bovine serum albumin, *Matrix biology*, 28:365-372

Levasseur N. (2001) Rapport d'activité de DEA : Acide hyaluronique/hyaluronidase et cancer: influence du micro-environnement sur l'hydrolyse de l'acide hyaluronique catalysée par la hyaluronidase, Universités Rouen-Caen

Levasseur N. (2006). Thèse de doctorat : Hyaluronane : hydrolyse enzymatique, méthode d'obtention de ses fragments applicable à l'industrie, modification chimique de ses fragments et étude de leurs propriétés biologiques. Laboratoire PBM, université de Rouen

Liëflander M. and Stegemann H. (1968) Enzyme electrophoresis in embedding polymerizates of acrylamide. C. Testicular hyaluronidases, *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.*, 349:157-160

Lin K.F. and Cheng H.L. (2000) A simple method to estimate chain conformations of polyelectrolyte in the semidilute regime, *Macromolecules*, 33 : 4961-4965

Lin, Y., Mahan, K., Lathrop, W. F., Myles, D. G., and Primakoff, P. (1994) A hyaluronidase activity of the sperm plasma membrane protein PH-20 enables sperm to penetrate the cumulus cell layer surrounding the egg, *Journal of Cell Biology*, 125 : 1157-1163

Lindahl U., Lidohlt K., Spillmann D. and Kjellen L. (1994) More to "heparin" than anticoagulation, *Thrombosis Research*, 75 : 1-32

Lineweaver H. and D. Burk (1935) Determination of enzyme dissociation constants, *J. Am. Chem. Soc.*, 56:658-666

Linhardt R.J., Ampofo S.A., Fareed J., Hoppensteadt D., Mulliken J.B. and Folkman J. (1992) Isolation and characterization of human heparin, *Biochemistry*, 31 : 12441-12445

Lisegang T.J. (1990) Viscoelastic substances in ophtalmology, *Surv. Ophtalmol.*, 34 : 268-293

Lokeshwar V. B., Cerwinka W. H., Isoyama T. and Lokeshwar B. L. (2005) HYAL1 Hyaluronidase in Prostate Cancer: A Tumor Promoter and Suppressor, *Cancer Research*, 65:7782-7789

Lokeshwar V., Obek C., Pham H., Wei D., Young M., Duncan R., Soloway M. and Block N. (2000) Urinary hyaluronic acid and hyaluronidase : markers for bladder cancer detection and evaluation of grade, *The journal of Urology*, 163 : 348-356

Luit G. and Cui K. (1996) Carboxyl-reduced hyaluronan : preparation and enzymatic assay, *Carbohydrate Research*, 285, 167-172

Machiah D. K., Girish K. S. and Veerabasappa Gowda T. (2006) A glycoprotein from a folk medicinal plant, *Withania somnifera*, inhibits hyaluronidase activity of snake venoms, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 143: 158-161

Magny B., Lafuma F. and Iliopoulos I. (1992) Determination of microstructure of hydrophobically modified water-soluble polymers by ¹³C n.m.r, *Polymer*, 33:3151-3153

Maksimenko A.V., M.L. Petrova, E.G. Tischenko and Y.V. Schechilina (2001) Chemical modification of hyaluronidase regulates its inhibition by heparin, *European Journal of Pharmacology and Biopharmacology*, 51:33-38

Maréchal Y., Milas M. and Rinaudo M. (2003) Hydration of hyaluronan polysaccharide observed by IR spectrometry.III. Structure and mechanism of hydration, *Biopolymers (Biospectroscopy)*, 72 : 162-173

Markovic-Housley Z., Miglierini G., Soldatova L., Rizkallah P. J., Müller U. and Schirmer T. (2000) Crystal Structure of Hyaluronidase, a Major Allergen of Bee Venom, *structure*, 8:1025-1035

Matzuda T., Moghaddam M.J., Miwa H., Sakurai K. Iida F. (1992) Photoinduced prevention of tissue adhesion, *ASIAO J.*, 38 : M154-M157

McCormick C.L., Nonaka T. and Johnson C.B (1988) Water-soluble copolymers: 27. Synthesis and aqueous solution behaviour of associative copolymers, *Polymer*, 29 : 731-739

Menzel E. and Farr C. (1998) Hyaluronidase and its substrate hyaluronan: biochemistry, biological activities and therapeutic uses, *Cancer Letters*, 131 : 3-11

Menzel E. J. and Farr C. (1998) Hyaluronidase and its substrate hyaluronan: biochemistry, biological activities and therapeutic uses, *Cancer Letters*, 131:3-11

Meyer K. (1947) The biological significance of hyaluronic acid and hyaluronidase, *Physiol. Rev.*, 27:335-359

Meyer K. (1971) In the Enzymes (ed. P.D. Boyer), 3rd edition, 5:307-320

Meyer K. and Chaffee (1941) Mucopolysaccharides of skin, *J. Biol. Chem.*, 138 : 491

Meyer K. and Palmer J. (1934) The polysaccharide of the vitreous humour, *J. Biol. Chem.*, 114 : 689-703

Meyer K. and Rapport M. M. (1952) Hyaluronidases, *Adv Enzymol Relat Subj Biochem.*, 13:199-236

Meyer K. and Rapport M.M. (1952) Hyluronidase, *Adv. Enzymol. Relat. Subj. Biochem.*, 13 : 199-236

Meyer M. F., Kreil G. and Aschauer H. (1997) The soluble hyaluronidase from bull testes is a fragment of the membrane-bound PH-20 enzyme, *FEBS Letters*, 413:385-388

Michaelis L. and M. Menten (1913) Kinetics of invertase reaction, *Biochem. Z.*, 49:333-369

Michel F., Thibeault J.F. and Doublier J.L. (1984) Viscosimetric and potentiometric study of high-methoxyl pectins in the presence of sucrose, *Carbohydrate Polymers*, 4 : 283-297

Mikkelsen S. R. and Corton E. (2004) Bioanalytical Chemistry, *J. Chem. Educ.*, 81:1270

Miller R., Steward D., Tami T., Sillars M., Seiden S., Shete M., Paskowski C. and Welge J. (2003) The clinical effects of hyaluronic acid ester nasal dressing (merogel) on intranasal wound healing after functional endoscopic sinus surgery, *Otolaryngology - Head and Neck Surgery*, 128:862-869

Mio K, O. Carette, H.I. Mailbach and R. Stern (2000) Evidence that the serum inhibitor of hyaluronidase may be a member of the inter-alpha-inhibitor family, *Journal of Biology Chemistry*, 275:32413-32421

Mlcochova P., Hajkova V., Steiner B., Bystricky S., Koos M., Medova M., Velebny V. (2007) Preparation and characterization of biodegradable alkylether derivatives of hyaluronan, *Carbohydrate Polymers*, 69, 344-352

Moczar E., and Hornebeck W. (1991) A lipophilic heparin derivative protects elastin against degradation by leucocyte elastase, *International Journal of biological Macromolecules*, 13 : 261-262

Moi K. and Stern R. (2002) Inhibitors of the hyaluronidases, *Matrix Biology*, 21:31-37

Mosely R., Waddington R.J., and Embery G. (2002) Hyaluronan and its potential role in periodontal healing, *Hyaluronan*, 223-228

Mravec F., Pekar M. and Velebny V. (2008) Aggregation behavior of novel hyaluronan derivatives : a fluorescence probe study, *Colloid and polymer science*, 286:1681-1685

Muckenschnabel I., Bernhardt G., Spruss T., Dietl B. and Buschauer A. (1998) Quantitation of hyaluronidases by the Morgan–Elson reaction: comparison of the enzyme activities in the plasma of tumor patients and healthy volunteers, *Cancer Letters*, 131:13-20

Nadkarni V.D., Toida T., Van Gorp C.L., Shubert R.L., Weiler J.M. Hansen K.P., Caldwell E.E. and Linhardt R.J. (1996) Preparation and biological activity of N-sulfonated chondroitin and dermatan sulfate derivatives, *Carbohydrate Reseach*, 290 : 87-96

Nagata H., Kojima R., Sakurai K., Sakai S., Kodera Y., Nishimura H., Inada Y. and Matsushima A. (2004) Molecular-weight-based hyaluronidase assay using fluorescent hyaluronic acid as a substrate, *Analytical Biochemistry*, 330:356-358

Nakajima N., and Ikada Y. (1995) Mechanism of amide formation by carbodiimide for bioconjugate in aqueous media, *Bioconjugate Chemistry*, 6 : 123-130

- Nehls V. and Hayen W. (2000) Are hyaluronan receptors involved in three-dimensional cell migration?, *Histol. Histopathol.* 15 : 629-636
- Nishida K., Kaji K., Kanaya T. and Fanjat N. (2001) Determination of intrinsic viscosity of polyelectrolyte solution, *Polymer*, 43 : 1295-1300
- Noble P.W. (2002) Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair, *Matrix Biology*, 21 : 25-29
- Padmanabha N., Hourdet D., Badiger M. V., Chassenieux C., Perrin P. and Wadgaonkar P. P. (2005) Synthesis and swelling behaviour of hydrophobically modified responsive polymers in dilute aqueous solutions, *Polymer*, 46:12190-12196
- Pattanaargson S. and Roboz J. (1996) Determination of hyaluronidase activity in venoms using capillary electrophoresis, *Toxicon*, 34:1107-1117
- Payan E., J.Y. Jouzeau, F. Lopicque, N. Muller and P. Netter (1993) Hyaluronidase degradation of hyaluronic acid from different sources : influence of the hydrolysis conditions on the production and the relative proportions of tetra- and hexasaccharides produces, *Int. J. Biochem.*, 25 : 325-329
- Peiffer D.G. (1990) , *Polymer*, 31 : 2353-2360
- Pelletier S., Hubert P., Lopicque F., Payan E. and Dellacherie E. (2000) Amphiphilic derivatives of sodium alginate and hyaluronate : synthesis and physico-chemical properties of aqueous dilute solutions, *Carbohydrate Polymers*, 43 : 343-349
- Petitou M., Lormeau J.C., and Choay J., (1990) Fr patent 2634485
- Peyron J.G. (1993) A new approach to the treatment of osteoarthritis : viscosupplementation, *Osteoarthr. Cartil.*, 1 : 85-87
- Picton L., Mocanu G., Mihai D., Carpov A. and Muller G. (1995) Chemically modified exopolysaccharide pullulans: physico-chemical characteristics of ionic derivatives, *Carbohydrate Polymers*, 28 : 131-136

Podhajecka K., Prochazka K. and Hourdet D. (2007) Synthesis and viscoelastic behavior of water-soluble polymers modified with strong hydrophobic side chains, *Polymer*, 48:1586-1595

Ponedel'kina I.Y., Lukina E.S. and Odinkov V.N. (2007) Acid glycosaminoglycans and their chemical modification, *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 34 : 1-23

Posey J. T., Soloway M. S., Ekici S., Sofer M., Civantos F., Duncan R. C. and Lokeshwar V. B. (2003) Evaluation of the Prognostic Potential of Hyaluronic Acid and Hyaluronidase (HYAL1) for Prostate Cancer, *Cancer Research*, 63:2638-2644

Pozo M.A., Balazs E.A. and Belmonte C. (1997) Reduction of sensory responses to passive movements of inflamed knee joints by hylan, a hyaluronan derivative, *Exp. Brain Res.*, 116 : 3-9

Preswitch G.D. (2001) Biomaterials from chemically-modified hyaluronan, on <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA18/HA18E.html>

Price K.N., Tuinman A., Baker D.C., Chisena C. and Cysyk R.L. (1997) Isolation and characterization by electrospray-ionization mass spectrometry and high-performance anion-exchange chromatography of oligosaccharides derived from hyaluronic acid by hyaluronate lyase digestion: Observation of some heretofore unobserved oligosaccharides that contain an odd number of units, *Carbohydrate Research*, 303 : 303-311

Rai S. K., Duh F. M., Vigdorovich V., Danilkovitch-Miagkova A., Lerman M. I. and Miller A. D. (2001) Candidate tumor suppressor HYAL2 is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored cell-surface receptor for jaagsiekte sheep retrovirus, the envelope protein of which mediates oncogenic transformation, *PNAS*, 98:4443-4448

Rapport M. M., Meyer K. and Linker A. (1950) Correlation of reductimetric and turbidimetric methods for hyaluronidase assay, *The Journal of Biological Chemistry*, 186:615-623

Rehakova M., Bako D.A., Soldan M. and Vizarova K. (1994) Depolymerization reactions of hyaluronic acid in solution, *International journal of biological macromolecules*, 16 : 121-124

Reissig J. L. (1955) A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars, *The Journal of Biological Chemistry*, 217:959-966

- Rigden, D. J., and Jedrzejewski, M. J. (2003) Structures of Streptococcus pneumoniae hyaluronate lyase in complex with chondroitin and chondroitin sulfate disaccharides. Insights into specificity and mechanism of action, *Journal of Biological Chemistry*, 278 : 50596-50606
- Rinaudo M., Milas M., Jouon N. and Borsali R. (1993) On some original properties of dilute polyelectrolyte solutions at low salt content: sodium hyaluronate example, *Polymer*, 34 : 3710-3715
- Robertson W., Ropes M. and Bauer W. (1940) Mucinase : a bacterial enzyme which hydrolyzes synovial fluid mucin and other mucins, *J. Biol. Chem.*, 133:261-276
- Roden L., Campbell P., Fraser T.C., Laurent T.C., Pertoft H. and Thompson J.N. (1989) Enzymatic pathways of hyaluronan catabolism, *ciba Found Symposium*, 143 : 60-73
- Rotureau E., Dellacherie E. and Durand A. (2005) Concentration dependence of aqueous solution viscosities of amphiphilic polymers *Macromolecules*, 38 : 4940-4941
- Rotureau E., Dellacherie E. and Durand D. (2006) Viscosity of aqueous solutions and hydrophobically modified polysaccharides : application of Fedors equation, *European Polymer Journal*, 42 : 1086-1092
- Rotureau E., Marie E., Dellacherie E. and Durand D. (2007) From polymeric surfactants to colloidal systems (3): Neutral and anionic polymeric surfactants derived from dextran, *Colloid and surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects*, 301 : 229-238
- Roure I., Rinaudo M., and Milas M. (1996) Viscometric behavior of dilute polyelectrolytes. Role of electrostatic interactions, *Ber. Bunsenges.*, 100 : 703-706
- Rousseau B., Sohn J., Montequin D. W., Tateya I. and Bless D. M. (2004) Functional outcomes of reduced hyaluronan in acute vocal fold scar, *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 113:767-776
- Sall I. and Féraud G. (2007) Comparison of the sensitivity of 11 crosslinked hyaluronic acid gels to bovine testis hyaluronidase , *Polymer Degradation and Stability*, 92:915-919
- Salmen S, Hoehstetter J, Käsbauer C, Paper DH, Bernhardt G, Buschauer A (2005) Sulphated oligosaccharides as inhibitors of hyaluronidases from bovine testis, bee venom and Streptococcus agalactiae, *Planta Med.*, 71:727-732

Scott J. (1997) Secondary of tertiary structures of hyaluronan in aqueous solution. Some biological consequences,

<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA02/HA02E.html>

Scott J.E. (1992) Supramolecular organisation of extracellular matrix glycosaminoglycans in vitro and in the tissues, *FASEB J.*, 6 : 2639-2645

Scott J.E. and Tigwell M.J. (1978) Periodate oxidation and the shapes of glycosaminoglycuronans in solution, *Biochem. J.*, 173 : 103-114

Scott J.E., Heatley F. and Hull W.E. (1984) Secondary structure of hyaluronate in solution. A ¹H-n.m.r. investigation at 300 and 500 MHz in [2H₆] dimethyl sulphoxide solution, *Biochem. J.*, 220 : 197-205

Scott J.E., Heatley F. and Wood B. (1995) Comparison of secondary structure in water of chondroitin-4-sulfate and dermatan sulfate : implications in the formation of tertiary structures, *biochemistry*, 34 : 15467-15474

Shalaby S.W., McCormick C.L. and Butler G.B., (1991) Water-solubles polymers: synthesis, solution properties and application, *ACS Symposium Series 467, Washington*

Shiller J., Arnhold J., Benard S., Reichl S. and Arnold K. (1999) Cartilage degradation by hyaluronate lyase and chondroitin ABC lyase: a MALDI-TOF mass spectrometric study, *carbohydrate Research*, 318 : 116-122

Shimada E. and Matsumura G. (1980) Degradation process of hyaluronic acid by *Streptomyces hyaluronidase*, *J. Biol. Chem.*, 88:1015-1023

Sholchaga L.A., Dennis J.E., Goldberg V.M. and Caplan A.I. (1999) Hyaluronic acid based polymers as cell carriers for tissue engineering repair of bone and cartilage, *J. Orthop. Res.*, 17 : 205-213

Shuster N., Dunker N., and Krieglstein K. (2002) Transforming growth factor- β induced cell death in the developing chick retina is mediated via activation of c-jun N-terminal kinase and downregulation of the anti-apoptotic protein Bcl-XL, *neuroscience letters*, 330 : 239-242

Simon S., Picton L., LeCerf D. and Muller G. (2005) Adsorption of amphiphilic polysaccharides onto polystyrene latex particles, *Polymer*, 46 : 3700-3707

Simon, S., J. Y. Dugast, D. Le Cerf, L. Picton & G. Muller (2003) Amphiphilic polysaccharides. Evidence for a competition between intra and intermolecular associations in dilute system, *Polymer*, 44 : 7917-7924

Skov L. K., Seppala U., Coen J. J. F., Crickmore N., King T. P., Monsalve R., Kastrup J. S., Spangfort M. D. and Gajhede M. (2006) Structure of recombinant Ves v 2 at 2.0 Å resolution: structural analysis of an allergenic hyaluronidase from wasp venom, *Acta Cryst*, 62:595-604

Smeds K.A., Pfister-Serres A., Hatchell D.L. and Grinstaff M.W. (1999) Synthesis of a novel polysaccharide hydrogel, *J. Macromol. Sci.Part A, Pure Appl. Chem.*, A36 (7 and 8), 981-989

Snively G.G. and D. Glick (1950) Mucolytic enzyme systems. X. serum hyaluronidase inhibitor in liver disease, *Journal of Clinical Investigation*, 29:1087-1090

Soltes S., Kogan G., Stankovska M., Mendichi R., Rychly J., Shiller J. and Gemeiner P. (2007) Degradation of high molar mass hyaluronan and characterization of fragments, *Biomacromolecules*, 8 : 2697-2705

Souguir Z., Roudesli S., About-Jaudet E., Picton L. and Le Cerf D. (2009) Novel cationic and amphiphilic pullulan derivatives II: pH dependant physicochemical properties, *Carbohydrate Polymers*, 80 : 123-129

Souguir Z., Roudesli S., Picton L., Le Cerf D. and About-Jaudet E. (2007) Novel cationic and amphiphilic pullulan derivatives I: Synthesis and characterization, *European Polymer Journal*, 43:4940-4950

Souguir Z., Roudesli S., Picton L., Le Cerf D. and About-Jaudet E. (2007) Novel cationic and amphiphilic pullulan derivatives II: pH dependant physicochemical properties , *Carbohydrate Polymers*, 80:123-129

Stern R. (2004) Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway, *European Journal of Cell Biology*, 83:317-325

Stern R. (2005) Hyaluronan metabolism: a major paradox in cancer biology, *Pathologie Biologie*, 53:372-382

Stern R. and Jedrzejak J. (2006) Hyaluronidases: Their Genomics, Structures, and Mechanisms of Action, *Chem. Rev.*, 106:818-839

Stern R., Asari A.A. and Sugahara K.N. (2006) Hyaluronan fragments : an information-rich system, *Eur. J. Cell Biol.*, 85 : 699-715

Stern R., Kogan G., Jedrzejak M.J. and Soltes L. (2007) The many ways to cleave hyaluronan, *Biotechnology Advances*, 25 : 537-557

Suzuki A., Toyoda H., Toida T. and Imanari T. (2001) Preparation and inhibitory activity on hyaluronidase of fully O-sulfated hyaluro-oligosaccharides, *Glycobiology*, 11 : 57-64

Suzuki, K., Terasaki, Y., Uyeda, M. (2002). Inhibition of hyaluronidases and chondroitinases by fatty acids, *Journal of Enzyme Inhibition Medicinal Chemistry*, 17, 183-186

Takagaki K., Nakamura T., Izumi J., Saitoh H., Endo M., Kojima K., Kato I. and Majima M. (1994) Characterization of Hydrolysis and Transglycosylation by Testicular Hyaluronidase Using Ion-Spray Mass Spectrometry, *Biochemistry*, 33:6503-6507

Takahashi T., Ikegami-Kawai M., Okuda R. and Suzuki K. (2003) A fluorimetric Morgan-Elson assay method for hyaluronidase activity, *Anal. Biochem.*, 322:257-263

Takehisa M., Minoo M. and Katsukiyo S. (1998) Photocurable glycosaminoglycans derivatives, crosslinked glycosaminoglycans and method of production thereof, US patent 5763504

Thanford C., (1980) *The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes*, ed. John Wiley, New York

Thibeault S. L., Rousseau B., Welham N. V., Hirano S. and Bless D. M. (2004) Hyaluronan levels in acute vocal fold scar, *The Laryngoscope*, 114:760-764

Thuresson A. C., Aström J., Aström A., Grönvik K. O. and Virtanen A. (1994) Multiple forms of poly(A) polymerases in human cells, PNAS, 91:979-983

Toida T., Maruyama T., Ogita Y., Suzuki A., Toyoda H., Imanari T., and Linhardt R.J. (1999) Preparation and anticoagulant activity of fully O-sulphonated glycosaminoglycans, International Journal of Biological Macromolecules, 26 : 233-241

Toida T., Y. Ogita, A. Suzuki, H. Toyoda, and T. Imanari (1999) Inhibition of fully O-sulfonated glycosaminoglycans, Arch. Biochem. Biophys, 370:176-182

Tokita Y. and Okamoto A. (1995) Degradation of hyaluronic acid. Kinetic study and thermodynamics, European Polymer Journal, 32 : 1011-1014

Tranchepain F. (2004) Thèse de doctorat : interactions hyaluronane-protéines : hydrolyse du hyaluronane catalysée par la hyaluronidase et complexation non-spécifique hyaluronane-protéines. Influence de la longueur de chaîne de hyaluronane, Laboratoire PBM, université de Rouen

Tranchepain F., Deschrevel B., Courel M-N., Levasseur N., Le Cerf D., Loutelier-Bourhis C. and Vincent J-C. (2006) A complete set of hyaluronan fragments from hydrolysis catalysed by hyaluronidase : application to studies of hyaluronan mass distribution by simple HPLC devices, Analytical Biochemistry, 348 : 232-242

Utracki L. and Shima R. (1963) Corresponding states relations for the viscosity of moderately concentrated polymer solution, Journal of polymer science Part A, 1 : 1089-1098

Venter A., Sojka P. E. and Cooks R. G. (2006) Droplet Dynamics and Ionization Mechanisms in Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry, Anal. Chem., 78:8549-8555

Vercruyse K.P., Lauwers A. R. and Demeester J. M. (1994) Kinetic investigation of the degradation of hyaluronan by hyaluronidase using gel permeation chromatography, J. Chromatogr. B Biomed. Appl., 656:179-190

Vigdorovich V., Miller A. D. and Strong R. K. (2007) Ability of Hyaluronidase 2 To Degrade Extracellular Hyaluronan Is Not Required for Its Function as a Receptor for Jaagsiekte Sheep Retrovirus, Journal of Virology, 81:3124-3129

Vincent J.C. and Lenormand H. (2009) How hyaluronan–protein complexes modulate the hyaluronidase activity: The model, *Biophysical chemistry*, 145 : 126-134

Vincent J.C., Astériou T. and Deschrevel B. (2003) Kinetics of the hyaluronan hydrolysis catalysed by hyaluronidase, *J. Biol. Phys. Chem.*, 88:1015-1023

Volpert E., Selb J., Candau F., Green N., Argillier J-F. and Audibert A. (1998) Adsorption of hydrophobically associating polyacrilamides on clay, *Langmuir*, 14 : 1870

Weissman B. and Meyer K. (1954) The structure of hyalobiuronic acid and of hyaluronic acid from umbilical cord, *J. Am. Chem. Soc.*, 76 : 1753-1757

West D.C. and Fan T-P. D. (2002) Hyaluronan oligosaccharides promote wound repair, In *the New Angiotherapy*, 177-188

Whitehouse C.M., Dreyer R. N., Yamashita M. and Fenn J. B. (1985) Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers, *Anal. Chem.* 57:675

Wootton S. K., Halbert C. L. and Miller A. D. (2005) Sheep retrovirus structural protein induces lung tumours, *Nature*, 434:904-907

Xie, X., Hogen-Esch, T.E.; *Macromolecules*, 1996, 29 : 1734-1745

Yamada T. and Kawasaki T. (2005) Microbial synthesis of hyaluronan and chitin : new approaches, *Journal of bioscience and bioengineering*, 99 : 521-528

Yamagato T., Saito H., Habuchi O. and Suzuki S. (1968) Purification and properties of bacterial chondroitinases and chondrosulfatases, *J. Biol. Chem.*, 243 : 1523-1535

Yekta A., Xu B., Duhamel J., Adiwigjaja H. and Winnik M. A. (1955) Fluorescence Studies of Associating Polymers in Water: Determination of the Chain end Aggregation Number and a Model for the Association Process, *Macromolecules*, 28:956-966

Yudin A. I., Li M. W., Robertson K. R., Cherr G. N. and Overstreet J. W. (2001) Characterization of the active site of monkey sperm hyaluronidase, *Reproduction (Cambridge)*, 121:735-743

Yun Y.H., Goetz D.J., Yellen P. and Chen W. (2004) Hyaluronan microspheres for sustained gene delivery and site-specific targeting, *Biomaterials*, 25 : 147-157

Zhang M. and James S.P. (2005) Silylation of hyaluronan to improve hydrophobicity and reactivity for improved processing and derivatization, *Polymer*, 46 : 3639-3648

Zhao X.B., Fraser J.E., Alexander C., Lockett C. and White B.J. (2002) Synthesis and characterization of a novel double crosslinked hyaluronan hydrogel, *J. Mater. Sci., Mater. Med.*, 13 : 11-16

Zhong S.P., Campoccia D, Doherty P.J., Williams R.L., Benedetti L. and Williams D.F. (1994) Biodegradation of hyaluronic acid derivatives by hyaluronidase, *Biomaterials*, 15, 359-365

Zimm B.H. (1956) Dynamics of polymer molecules in dilute solution : viscoelasticity, flow birefringence and dielectric loss, *Journal of chemical physics*, 24 : 269-278

Résumé

Grâce à son ensemble unique de propriétés physico-chimiques, le hyaluronane (HA) est utilisé dans l'élaboration de biomatériaux. Malgré son utilisation dans de nombreuses applications médicales, ses domaines d'application peuvent être plus vastes en modifiant chimiquement ses groupements fonctionnels afin de modifier et contrôler ses propriétés physico-chimiques.

L'objectif de cette étude a été d'étudier l'activité de la hyaluronidase (HAase) sur le HA hydrophobiquement modifié à différents taux d'estérification et avec différentes longueurs de chaînes alkyle. Les fragments de HA sont obtenus par voie enzymatique catalysée par la HAase. L'estérification dans le diméthylformamide implique la formation d'un sel de tétrabutylammonium suivie d'une réaction avec un halogénure d'alkyle. Les HA hydrophobisés sont soumis à l'action de la HAase testiculaire bovine qui appartient à la même classe que les HAases humaines. Les cinétiques d'hydrolyse sont étudiées via la détermination de la vitesse initiale d'hydrolyse et la masse molaire des HA hydrophobisés obtenus en fin d'analyse. En modifiant le taux d'estérification et la longueur de la chaîne alkyle, la balance hydrophile/lipophile est modifiée et des interactions hydrophobes apparaissent. Nos résultats ont montré qu'il n'est pas possible pour la HAase de dégrader totalement les HA hydrophobisés. De plus, L'analyse des HA hydrophobisés hydrolysés par la HAase a permis d'étudier la répartition des groupements esters le long de la chaîne de HA.

Mots clés : Hyaluronane, Hyaluronidase, association hydrophobe, cinétique d'hydrolyse enzymatique

Abstract

Because of its unique physicochemical properties, hyaluronan (HA) is used to build biomaterials. Despite the utilization of HA in many medical applications, its field of applications can be further broadened by a modification of its numerous functional groups to change and control physicochemical properties.

The aim of this study was to examine the hyaluronidase (HAase) activity on HA hydrophobically modified HA with various degrees of esterification and alkyl chain length. HA fragments were obtained by kinetically-controlled HA enzymatic hydrolysis. The esterification involved generation of tetrabutylammonium salts of HA in dimethylformamide, and its subsequent reaction with alkyl halide. Hydrophobic HA were submitted to bovine testicular HAase action which belong to the same class as human HAase. The hydrolysis kinetics were studied measuring the initial hydrolysis rate and molecular weight of the hydrophobic HA at the end of the analysis. To vary the degree of esterification and the alkyl chain length, the lipophilic-hydrophilic balance was modified and hydrophobe interaction appears. Our results obtained indicated that HAase is not able to degrade totally the hydrophobic HA studied. In addition, the analysis of hydrophobic HA hydrolysed by HAase allowed to investigate the distribution of ester groups along HA chains.

Keywords : Hyaluronan, Hyaluronidase, hydrophobic associations, enzymatic hydrolysis kinetics
