

Titre: Fabrication et caractérisation d'hydrogels thermosensibles pour des applications de livraison ciblée de médicament et d'embolisation
Title: fabrication et caractérisation d'hydrogels thermosensibles pour des applications de livraison ciblée de médicament et d'embolisation

Auteur: Jacinthe Lapointe
Author: Jacinthe Lapointe

Date: 2012

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Lapointe, J. (2012). Fabrication et caractérisation d'hydrogels thermosensibles pour des applications de livraison ciblée de médicament et d'embolisation [Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie.
Citation: Lapointe, J. (2012). Fabrication et caractérisation d'hydrogels thermosensibles pour des applications de livraison ciblée de médicament et d'embolisation [Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie.
<https://publications.polymtl.ca/936/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/936/>
PolyPublie URL: <https://publications.polymtl.ca/936/>

Directeurs de recherche: Sylvain Martel, & L'Hocine Yahia
Advisors: Sylvain Martel, & L'Hocine Yahia

Programme: Génie biomédical
Program: Génie biomédical

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

FABRICATION ET CARACTÉRISATION D'HYDROGELS
THERMOSENSIBLES POUR DES APPLICATIONS DE LIVRAISON CIBLÉE
DE MÉDICAMENT ET D'EMBOLISATION

JACINTHE LAPOINTE

INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES

(GÉNIE BIOMÉDICAL)

AOÛT 2012

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé:

FABRICATION ET CARACTÉRISATION D'HYDROGELS THERMOSENSIBLES POUR
DES APPLICATIONS DE LIVRAISON CIBLÉE DE MÉDICAMENT ET D'EMBOLISATION

présenté par : LAPOINTE Jacinthe

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès Sciences Appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. VIRGILIO Nick, Ph. D, président

M. MARTEL Sylvain, Ph. D., membre et directeur de recherche

M. YAHIA L'Hocine, Ph.D., membre et codirecteur de recherche

M. ZHU Julian X., Ph.D, membre

REMERCIEMENTS

Merci à mon directeur Sylvain Martel pour l'opportunité de travailler au sein de son laboratoire et au sein d'une équipe exceptionnelle. Merci également à tous les membres du laboratoire de nanorobotique pour l'ambiance de travail exceptionnelle, l'entraide et l'esprit d'équipe. Plus particulièrement merci à Charles Tremblay, pour les nombreux encouragements, conseils et son aide avec mes différents montages expérimentaux. Merci également à Nisryn Mokrani pour son expertise en microbiologie et pour son aide avec le microscope ainsi qu'avec certaines manipulations. Un merci spécial à Nasr Tabatabei, pour son expertise en magnétisme ainsi qu'avec les nanoparticules ferromagnétiques. Finalement, merci à Benjamin Conan, pour son support, ses relectures et ses conseils.

RÉSUMÉ

Le présent mémoire de maîtrise porte sur l'utilisation d'un matériau thermosensible chargé de nanoparticules magnétiques comme vecteur de livraison ciblée de médicament. Ce projet s'inscrit dans le cadre du projet MR-Sub (Magnetic Resonance Submarine) du laboratoire de Nanorobotique qui consiste à guider des instruments médicaux ferromagnétiques à l'intérieur du réseau vasculaire, à l'aide des forces produites par les gradients magnétiques d'un système d'imagerie à résonance magnétique clinique pour le ciblage de tumeurs.

Plusieurs matériaux thermosensibles sont envisagés, et les hydrogels de poly(N-isopropylacrylamide) sont retenus en raison du changement de volume discontinu se produisant autour d'une température de transition ainsi que de la possibilité de les charger de nanoparticules ferromagnétiques. La température à laquelle cette transition s'opère est d'environ 34°C, et peut être ajustée par la copolymérisation du N-isopropylacrylamide avec un monomère hydrophile : on obtient une température de transition de 42°C pour une concentration d'acide acrylique de 5%. L'utilisation de ce type d'hydrogel chargé de nanoparticules superparamagnétiques permettra non seulement le guidage et la localisation du dispositif, mais également l'activation de la libération d'un agent thérapeutique préalablement encapsulé dans la structure de l'hydrogel, par l'application d'un champ magnétique alternatif.

Les particules sont synthétisées à l'aide d'un réseau interpénétré d'alginate et d'un champ électrostatique, et permet d'obtenir des diamètres de particules reproductibles et modulables dans un intervalle de 90 µm à 2 mm. Les hydrogels synthétisés sous forme de particules mettent environ 15 minutes à se stabiliser, lorsque la température est élevée au dessus de la température de transition, ce qui est acceptable pour une application clinique.

Enfin, des nanoparticules de Fe₃O₄ sont encapsulées dans les hydrogels, et l'application d'un champ magnétique alternatif sur ces particules a permis de mettre en évidence l'augmentation de la température causée par leur présence. Une concentration de nanoparticules de 100 mg/ml mène à une augmentation de température de 8°C en 30 minutes. Les résultats présentés dans ce mémoire justifient donc l'utilisation des hydrogels de poly(N-isopropylacrylamide) pour un microdispositif de livraison ciblée de médicament.

ABSTRACT

This thesis explores the possibility of using ferromagnetic particles embedded in a thermosensitive material as a vector for targeted drug delivery. This project is part of the MR-sub (Magnetic Resonance Submarine) platform developed by the Nanorobotics Lab, aiming to use a modified clinical MRI scanner to steer and propel ferromagnetic medical devices inside the vascular network for the targeting of tumors.

Several thermosensitive materials are evaluated, and poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels are selected, because of their ability to change volume around a given transition temperature and the possibility to use them as carriers for ferromagnetic particles. This transition temperature is about 34°C, and may be adjusted by copolymerization of N-isopropylacrylamide with an hydrophilic monomer. We are able to reach a transition temperature of 42°C for a 5% acrylic acid concentration. Using this superparamagnetic nanoparticles-loaded kind of hydrogel allows both propulsion and tracking of the device as well as the remote-controlled liberation of a therapeutic agent, triggered by application of an alternative magnetic field.

Hydrogel particles are synthesized using an alginate interpenetrated network and an electrostatic field. This technique allows to reproducibly produce particles with a flexible diameter from 90 μm to 2 mm. Such hydrogel particles take about 15 minutes to stabilize, when their transition temperature is reached, which is acceptable for clinical use.

Finally, Fe₃O₄ nanoparticles are encapsulated inside the hydrogels, and alternative magnetic fields are applied to generate heat. A nanoparticles concentration of 100 mg/ml leads to an 8°C rise of the temperature in 30 minutes. The results displayed in this thesis demonstrate poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels potential as targeted drug delivery microcarriers.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	III
RÉSUMÉ.....	IV
ABSTRACT	V
TABLE DES MATIÈRES	VI
LISTE DES TABLEAUX.....	IX
LISTE DES FIGURES.....	X
LISTE DES FIGURES.....	X
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XIII
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1 MATÉRIAUX.....	3
1.1 Objectifs	3
1.2 Hydrogels et thermosensibilité.....	5
1.2.1 Polymères	5
1.2.2 Hydrogels et dérivés.....	6
1.2.3 Hydrogels sensibles.....	7
1.2.4 PNIPA et copolymère de PNIPA	9
1.3 Matériaux à mémoire de forme	12
1.4 Polymérisation et synthèse hydrogel.....	14
1.5 Synthèse de particules	15
1.6 Utilisation d’alginate	17
1.6.1 Stratégie de diminution de la taille des particules.....	18
CHAPITRE 2 MAGNÉTISME, NANOPARTICULES ET HYPERTHERMIE.....	20
2.1 Hyperthermie.....	20

2.2	Magnétisme et nanoparticules magnétiques.....	22
2.3	Nanoparticules et matériaux thermosensibles.....	24
CHAPITRE 3 BIOCOMPATIBILITÉ		26
3.1	Hydrogel.....	26
3.2	Hydrogel chargé de nanoparticules magnétiques.....	27
3.3	Stérilisation.....	27
CHAPITRE 4 MATÉRIEL ET MÉTHODE		29
4.1	Synthèse de l'hydrogel	29
4.1.1	Distillation de l'acide acrylique	30
4.2	Synthèse des particules d'hydrogel.....	32
4.2.1	Synthèse de particules d'alginate	32
4.2.2	Synthèse de particules alginate/PNIPA.....	35
4.2.3	Synthèse de particules alginate/PNIPA chargées de nanoparticules.....	37
4.3	Propriétés de l'hydrogel	38
4.3.1	Hydrogel sous forme de volume	38
4.3.2	Hydrogel sous forme de particules.....	40
4.4	Propriétés du microdispositif	41
4.4.1	Propriétés des nanoparticules magnétiques.....	41
4.4.2	Chauffage par champ magnétique alternatif	41
CHAPITRE 5 RÉSULTATS ET DISCUSSION.....		43
5.1	Synthèse de l'hydrogel	43
5.2	Synthèse de particules d'hydrogel.....	43
5.2.1	Synthèse de particules d'alginate	43
5.2.2	Synthèse de particules de PNIPA.....	48

5.2.3	Synthèse de particules de PNIPA chargées de nanoparticules.....	51
5.3	Propriétés de l'hydrogel	51
5.3.1	Synthèse simple.....	51
5.3.2	Synthèse de particules	55
5.4	Propriétés du microdispositif	58
5.4.1	Propriétés des nanoparticules magnétiques.....	58
5.4.2	Chauffage par champs magnétiques alternatifs.....	59
5.5	Discussion	61
5.5.1	Synthèse et propriétés de l'hydrogel de PNIPA	61
5.5.2	Synthèse de particules d'hydrogel	63
5.5.3	Propriété du microdispositif	66
CONCLUSION		68
BIBLIOGRAPHIE		71

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 4.1: Composés nécessaires à la synthèse de PNIPA et leur proportion, dilués dans 10 ml d'EDI.....	30
Tableau 5.1: Diamètres et écarts types des particules d'alginate obtenues en modifiant la valeur du champ électrostatique appliqué, avec un débit de la solution d'alginate de 5 ml/h.....	46
Tableau 5.2: Diamètres et écarts types des particules d'alginate obtenues en modifiant la valeur du champ électrostatique appliqué, avec un débit de la solution d'alginate de 1 ml/h.....	46
Tableau 5.3: Diamètres et écarts types de particules obtenues pour 3 synthèses effectuées dans les mêmes conditions	47
Tableau 5.4: Augmentation de la température moyenne des échantillons de particules d'hydrogel chargées de nanoparticules magnétiques.....	60

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1: Illustration de l'action du microdispositif de PNIPA chargé de médicament et de nanoparticules magnétiques	3
Figure 1.2: Illustration de l'effet du microdispositif injecté dans la circulation et guidé vers une tumeur [5].....	4
Figure 1.3: Molécule de poly(N-isopropylacrylamide).....	9
Figure 1.4: Illustration du changement de configuration réversible du PNIPA à des températures au-dessous et au-dessus du LCST	10
Figure 1.5: Illustration du changement de volume d'un hydrogel à base de PNIPA, comportant différents ratio PEO/PNIPA dans un réseau semi-IPN, tiré de [23].	11
Figure 1.6: Illustration du comportement du CHEM en fonction du temps et de la température. Tiré de [24].....	12
Figure 1.7: Illustration du processus de gélification des chaînes d'alginate	17
Figure 4.1: Tête Hickman.....	31
Figure 4.2: Réfrigérant de type «cold finger».....	31
Figure 4.3: Synthèse de particules d'alginate avec flux d'air coaxial	33
Figure 4.4: Montage expérimental pour la synthèse de particules d'alginate avec champ électrostatique.....	34
Figure 4.5: Montage de synthèse de particules d'alginate/PNIPA	36
Figure 4.6: Synthèse de particules d'alginate/PNIPA avec application d'un champ électrostatique	37
Figure 4.7: Montage expérimental pour l'étude des propriétés des différents échantillons d'hydrogel (synthèse simple).....	39
Figure 5.1: Hydrogel synthétisé chargé de nanoparticules magnétiques	43
Figure 5.2: Illustration des particules d'alginate synthétisées.....	44

Figure 5.3: Distribution de taille des particules d'alginate synthétisées avec 1.75% d'alginate, selon un débit de 5 ml/h, avec une aiguille 25G et avec un voltage appliqué de 5 kV	45
Figure 5.4: Distribution de taille des particules d'alginate synthétisées avec 1,75% d'alginate, selon un débit de 5 ml/h, avec une aiguille 25G et avec un voltage appliqué de 7,5 kV	45
Figure 5.5: Distribution de taille des particules synthétisées avec 0,8% d'alginate, selon un débit de 5 ml/h, avec une aiguille de 100 μ m et avec un voltage appliqué de 5 kV	47
Figure 5.6: Illustration des particules de PNIPA synthétisées	48
Figure 5.7: Illustration des particules synthétisées chargées de nanoparticules magnétiques	49
Figure 5.8: Diamètres des particules obtenus en fonction de la concentration en agent de réticulation, et pour différents diamètres intérieurs d'aiguilles, avec 1.75% d'alginate et un débit de seringue de 3 ml/h	49
Figure 5.9: Particules synthétisée avec 0,8% d'alginate.....	50
Figure 5.10: Comportement de l'hydrogel lorsque $T > LCST$. ($m_i = 1,62$ g)	52
Figure 5.11: Diminution de masse dans le temps, de 2 échantillons, avec 2 masses initiales différentes.....	52
Figure 5.12: Comportement général du volume d'un échantillon de 0.54 g PNIPA chargé de nanoparticules avec la température	53
Figure 5.13: Changement de volume du PNIPA en fonction de la température, pour différentes concentrations de BIS.....	54
Figure 5.14: Changement de volume en fonction du temps, avec et sans nanoparticules magnétiques.....	55
Figure 5.15: Photo de l'hydrogel chargé de nanoparticules, après stabilisation à $T = 23^\circ C$ ($T < LCST$) et à $T = 37^\circ C$ ($T > LCST$).	55
Figure 5.16: Illustration de la diminution de volume des particules de PNIPA autour de la température de transition.....	56
Figure 5.17: Changement de volume en fonction du temps pour des particules ayant différentes concentrations en agent de réticulation	57

Figure 5.18: Changement de volume en fonction de la température, pour des hydrogels possédant différentes concentrations de AAc	57
Figure 5.19: Résultats obtenus de l'analyse VSM des nanoparticules magnétiques isolées	58
Figure 5.20: Images MET des nanoparticules avec revêtement de PAS	59
Figure 5.21: Augmentation de la température des particules d'hydrogel chargées de nanoparticules magnétiques à une concentration de 50 mg/ml, sous un champ magnétique alternatif de 9 kA/m, $f = 154$ Hz appliqué pendant 30 minutes.	60
Figure 5.22: Augmentation de la température des particules d'hydrogel chargées de nanoparticules magnétiques à une concentration de 99 mg/ml, sous un champ magnétique alternatif de 9 kA/m, $f = 154$ Hz appliqué pendant 30 minutes.	61

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

AAc	Acide acrylique
AAM	Acrylamide
AC	Alternating Current
APS	Persulfate d'ammonium
BIS	N,N-méthylènebisacrylamide
CaCl ₂	Chlorure de calcium
CHEM	Cold Hibernated Elastic Memory
EDI	Eau déionisée
EDTA	Acide éthylène diamine tétra acétique
ETO	Oxyde d'éthylène
Fe ₃ O ₄	Oxyde de fer (magnétite)
IPN	Interpenetrating Polymer Networks
IRM	Imagerie à Résonance Magnétique
LCST	Lower critical solution temperature
MEHQ	Éther monométhylque d'hydroquinone
MR-Sub	Magnetic Resonance Submarine
NIPAm	N-isopropylacrylamide
PDEAAM	Poly(N,N-diéthylacrylamide)
PEO	Poly(ethylene) Oxide
PNIPA	Poly(N-isopropylacrylamide)
PPO	Poly(propylene) Oxide
PVA	Poly Vinyl Acetate
SAR	Specific Absorption Rate

SC	Supercritique
SPG	Shirasu Porous Glass
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethane
MET	Microscope Électronique à Transmission
VSM	Vibrating sample magnetometer

INTRODUCTION

Notre laboratoire étudie depuis quelques années la possibilité d'adapter un système d'imagerie à résonance magnétique (IRM) afin de guider un objet magnétique dans le réseau vasculaire. Le projet, nommé MR-Sub pour *Magnetic Resonance Submarine*, cherche à tirer profit des gradients magnétiques produits par les trois bobines orthogonales du système afin de créer des forces magnétiques sur des objets ferromagnétiques dans les trois directions de l'espace afin de les déplacer. [1-3] Cette approche pourrait permettre de nombreuses applications minimalement invasives au niveau des techniques de diagnostic, d'intervention et de thérapie. Par exemple, les cancers, dont un des traitements actuellement dispensé, la chimiothérapie, implique de nombreux effets secondaires indésirables, puisqu'elle consiste à injecter dans la circulation une substance thérapeutique cytotoxique aussi bien pour les cellules saines que pour les cellules cancéreuses. Le guidage de particules pourrait donc permettre le ciblage des tumeurs par ces substances thérapeutiques. Un tel ciblage permettrait de diminuer la quantité de médicament présente dans la circulation systémique, diminuant de ce fait les effets secondaires et les coûts associés aux traitements tout en permettant l'usage de concentration plus élevées, améliorant ainsi drastiquement l'efficacité des traitements. De plus, l'énergie étant fournie par l'IRM, le design du système serait grandement simplifié, le besoin d'intégrer la source d'énergie au système étant éliminé. Finalement, la disponibilité des systèmes d'IRM dans les hôpitaux et la possibilité de les adapter pour cette application, tout en conservant leurs fonctionnalités d'imagerie est un autre avantage intéressant.

Nous savons que les nanoparticules ferromagnétiques peuvent être contrôlées à l'aide de gradients magnétiques. Elles peuvent également être localisées et visualisées comme des artefacts dans les images prises par IRM. [2, 4] De plus, elles génèrent de la chaleur lorsqu'elles sont soumises à des champs magnétiques alternatifs. [5] On envisage donc l'utilisation d'un matériau sensible à la température, pouvant être synthétisé sous forme de particules et pouvant être chargé de nanoparticules ferromagnétiques, comme vecteur de livraison de médicament. Le dispositif pourra ainsi être guidé dans le réseau vasculaire, et une libération pourra être déclenchée par l'augmentation de température du matériau. Celui-ci devra donc réagir à la température par un changement de sa microstructure. L'utilisation d'un tel matériau, en conjonction avec le chargement de ce matériau avec des nanoparticules magnétiques permettra d'obtenir un

microdispositif multifonctionnel contrôlable : il sera possible de le guider à l'intérieur du réseau vasculaire, de le localiser à l'aide d'images IRM, et de déclencher au moment souhaité, c'est-à-dire lors de l'embolisation, un événement tel que la libération d'un médicament.

Ce projet a donc pour objectif d'identifier un matériau réagissant le plus fortement possible à un changement de température minimal, l'intervalle de température que nous pouvons nous permettre dans l'organisme étant assez mince, soit de 37.5°C, la température normale du corps, à environ 46°C, la température à laquelle les cellules saines commencent à être endommagées. [6] Il faudra également montrer qu'il est possible de synthétiser ce matériau thermosensible sous forme de microparticules, et de les charger de nanoparticules ferromagnétiques, qui pourront permettre leur ciblage à l'aide d'un système d'IRM modifié ainsi que la modulation de leur volume par des champs magnétiques alternatifs.

Le travail sera présenté de la manière suivante. Tout d'abord, nous décrirons les objectifs plus spécifiques relatifs au projet MR-Sub. Ensuite, une revue de la littérature permettra de bien mettre en contexte les différents aspects du microdispositif qui sont en jeu ainsi que de justifier le choix de l'utilisation d'un hydrogel thermosensible à base de poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPA). Nous passerons en revue le matériel et les méthodes employées pour le développement des solutions proposées et décrirons les différents tests effectués sur le matériau choisi ainsi que sur le microdispositif. Suivront la présentation des résultats, la discussion qui fera le lien entre les résultats obtenus et l'application de microdispositif et finalement, la conclusion sur le travail réalisé proposera une ouverture vers de futurs travaux dans ce champ de recherche.

CHAPITRE 1 MATÉRIAUX

1.1 Objectifs

L'idée générale de cette maîtrise est de développer un microdispositif multifonctionnel, pouvant être localisé, guidé, ciblé et déclenché extérieurement par l'application de gradients magnétiques et de champs magnétiques alternatifs. En d'autres mots, il s'agit de faire la preuve qu'il est possible d'encapsuler des nanoparticules ferromagnétiques à l'intérieur de particules d'hydrogel thermosensible permettant ainsi la visualisation et le ciblage de ces particules à l'aide d'un IRM, ainsi que la modulation du volume des particules à l'aide de champs magnétiques alternatifs. Cette hypothèse est originale car on exploite pour la première fois la triple fonctionnalité des nanoparticules dans l'hydrogel, conjointement à l'utilisation d'hydrogels intelligents.

Cet hydrogel doit donc contenir la quantité maximale de nanoparticules ferromagnétiques possible, afin d'optimiser ses propriétés magnétiques et ainsi de le guider efficacement dans les vaisseaux sanguins, jusqu'à la tumeur ciblée. Ces propriétés magnétiques permettront également le chauffage intrinsèque du dispositif, lors de l'application d'un champ magnétique alternatif. Celui-ci devra permettre d'élever la température au-dessus de la température de transition du matériau utilisé, et ce de manière reproductible, sans toutefois l'élever trop rapidement ni trop intensément, ce qui risquerait de détruire les cellules saines environnantes. Finalement, le changement de volume induit par le changement de température devra permettre la libération de la substance médicamenteuse encapsulée dans le dispositif. La Figure 1.1 illustre bien la fonction du microdispositif désiré.

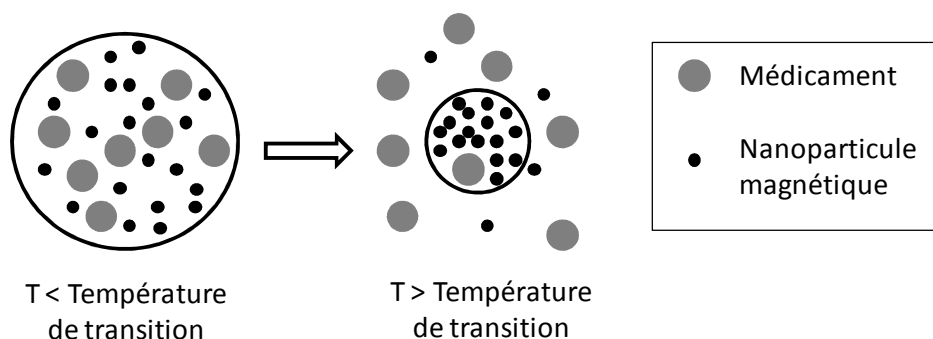


Figure 1.1: Illustration de l'action du microdispositif de PNIPAA chargé de médicament et de nanoparticules magnétiques

La température de transition du matériau devra donc se situer dans un intervalle relativement mince, située entre une température supérieure à la température corporelle humaine, afin que le dispositif ne se déclenche aussitôt qu'il est injecté dans la circulation, et à une température inférieure à la température à laquelle les cellules sont détruites (46°C). Le changement de température devra également s'effectuer le plus rapidement possible et idéalement dans un délai inférieur à 30 minutes, afin de ne pas allonger le traitement inutilement.

Ainsi, tel qu'illustré à la Figure 1.2, les particules seront d'abord injectées dans la circulation sanguine. Les gradients magnétiques de l'IRM dans lequel se trouvera le patient permettra de dévier les particules au travers des différentes bifurcations du système vasculaire, pour se rapprocher le plus près possible de la tumeur cancéreuse. Elles seront entraînées par le débit sanguin, au travers les différentes bifurcations du réseau vasculaire, jusqu'à ce que le diamètre des vaisseaux soit trop petit pour la taille des particules. Il y aura alors embolisation des vaisseaux par les particules. Celles-ci seront bloquées physiquement à l'intérieur des vaisseaux entourant la tumeur, formant ainsi une occlusion du débit sanguin, et donc contribueront à réduire l'approvisionnement de la tumeur en oxygène et en nutriments. [7] À ce moment, le patient pourra être retiré de l'IRM, et placé à l'intérieur d'un dispositif générant des champs magnétiques alternatifs. Les microdispositifs pourront ainsi être activés afin de libérer l'agent thérapeutique qu'ils contiennent.

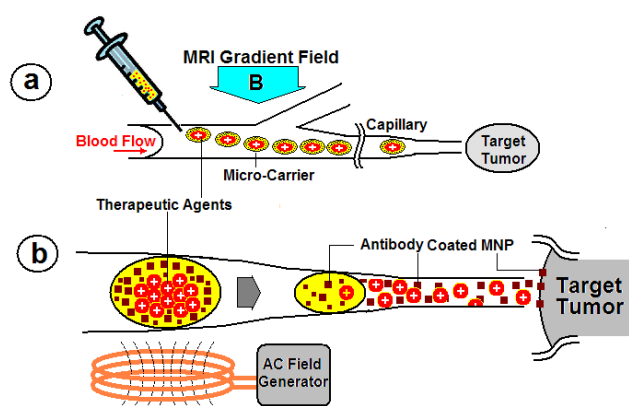


Figure 1.2: Illustration de l'effet du microdispositif injecté dans la circulation et guidé vers une tumeur [5]

L'objectif est donc, plus spécifiquement, l'étude des matériaux réagissant à des changements de température, à savoir, le poly(N-isopropylacrylamide), qui est le matériau thermosensible le plus étudié pour des applications médicales. Il s'agit de développer des méthodes de synthèse de ce matériau sous différentes formes afin d'étudier les différents paramètres de synthèse, et comment ceux-ci affectent les propriétés du PNIPA synthétisé, tant par rapport à sa forme et sa taille qu'à ses propriétés, telles que la température à laquelle la transition survient, la nature et les manifestations de cette transition. Le diamètre des particules doit pouvoir être contrôlé, et se situer entre 40 et 100 μm afin d'assurer l'embolisation à l'arrivée à la tumeur. [8] Des nanoparticules doivent finalement être intégrées, lors de la synthèse, en quantité suffisante pour atteindre les propriétés désirées, mais sans compromettre la polymérisation de l'hydrogel.

1.2 Hydrogels et thermosensibilité

La principale classe de matériaux démontrant une sensibilité à la température est la classe des polymères. Plus particulièrement, les hydrogels peuvent posséder plusieurs types de sensibilités incluant une sensibilité à la température. Nous verrons donc, dans cette section, ce qu'est exactement un polymère, pour ensuite voir de quelle manière ils peuvent réagir à différents stimuli extérieurs.

1.2.1 Polymères

Les polymères sont des molécules très grandes, appelées macromolécules et construites à partir de molécules plus petites, les monomères. Un polymère (ou homopolymère) est composé d'un unique type de monomère. Lorsqu'on est en présence de différents types de monomères, on parle alors de copolymère. L'arrangement des différents monomères peut se faire de différentes manières, avec une incidence directe sur leurs propriétés. Ils peuvent être composés selon différentes proportions et disposés en différents blocs qui alternent dans la chaîne. Par exemple, en considérant A et B comme deux monomères constituant un copolymère, on pourrait avoir une structure telle que $\text{-(-A-)}_n\text{-(-B-)}_m\text{-(-A-)}_p\text{-}$, où n , m et p sont les nombres des unités de répétition dans le polymère. Les monomères peuvent également simplement alterner de manière régulière (-A-B-A-B-A-B-) ou être disposés de manière aléatoire (-A-A-A-B-A-B-B-A-). Enfin, un autre

type de polymère, le polymère greffé, est composé d'une chaîne linéaire d'un type de monomères, avec des branches d'autres types de monomères.

Les paramètres clés servant à déterminer les propriétés d'un polymère sont la longueur des chaînes créées lors de la réaction de polymérisation et leur uniformité, qui sont caractérisés par le poids moléculaire et la distribution de poids moléculaire.

Les polymères peuvent s'arranger en différents types de chaînes et les différentes formes qu'elles peuvent prendre mènent à des classes de matériaux aux propriétés très variées.

Le polymère linéaire est le plus simple des arrangements de monomères. Des chaînes linéaires peuvent également présenter des ramifications. On parle alors de polymères ramifiés. Ces ramifications peuvent être de plusieurs types (courtes, longues ou elles-mêmes ramifiées) et peuvent avoir un effet important sur leurs propriétés. En effet, les polymères linéaires peuvent s'organiser de manière très régulière, ce qui mène à des matériaux plus denses. Au contraire, la présence de ramifications plus ou moins longues et disposées aléatoirement empêche les molécules de s'organiser de la sorte. On obtient donc un matériau possédant une structure plus amorphe, moins cristalline. Ce degré de cristallinité, directement lié à la densité de ramification, affecte les propriétés du polymère telles que la rigidité, la résistance et les propriétés optiques. Finalement, les différentes chaînes de polymère peuvent être liées entre elle, par des liens chimiques (covalents) ou physiques (hydrogènes, ioniques, hydrophobiques). On parle de polymère réticulé. [9]

1.2.2 Hydrogels et dérivés

Les hydrogels sont des réseaux tridimensionnels de polymères hydrophiles ayant la capacité d'absorber de très grande quantité d'eau ou de fluide biologique, sans se dissoudre et sans perdre leur structure. Ce réseau tridimensionnel est formé par la réticulation des chaînes de polymère, par des liens covalents (réticulation chimique) ou par des liens hydrogènes, ioniques ou hydrophobiques (réticulation physique). [10] La présence de groupes hydrophiles dans leur structure, tels que des groupements hydroxyde (-OH-), carboxyle (-COOH-), amide (-CONH- ou -CONH₂-) ou sulfonique (-SO₃H-), permet cette grande absorption d'eau qui les caractérise. La proportion d'eau à l'intérieur de la structure d'hydrogel est caractérisée par trois paramètres

critiques, à savoir la fraction volumique de polymère à l'état gonflé, le poids moléculaire moyen entre deux réticulations ainsi que de la taille de maille du réseau.

La grande quantité d'eau qui les compose leur confère des propriétés semblables à celles des tissus vivants, et les rend donc très intéressants pour des applications biomédicales. Elle détermine également leurs propriétés mécaniques, leur perméabilité, leurs propriétés de surface et leur biocompatibilité. La structure des hydrogels permet également à des molécules de différentes tailles de diffuser vers l'intérieur ou vers l'extérieur du réseau, ce qui les rend intéressants pour des applications de livraison de médicament. La vitesse et les mécanismes de diffusion peuvent être contrôlés en modifiant des facteurs tels que la composition du polymère, la densité de réticulation, le contenu en eau et la cristallinité. [11-14]

Les hydrogels sont donc largement utilisés pour des applications biomédicales telles que la livraison de médicament, la formation de matrice pour la régénération et la réparation de tissus, les implants et les lentilles de contact souples. [15-17]

1.2.3 Hydrogels sensibles

Il existe plusieurs types d'hydrogels, et ceux-ci peuvent démontrer une sensibilité à différents facteurs extérieurs, tels que la température, le pH, la lumière, les champs électriques, la concentration de certaines espèces telles que le glucose, certains antigènes, certains ions, etc.

Les hydrogels démontrant une sensibilité à la température sont les plus étudiés, et sont caractérisés par la présence de groupements hydrophobes, tels que des groupements méthyl ($-CH_3$), éthyl ($-C_2H_5$) et propyl ($-C_3H_7$), en plus des groupements hydrophiles typiques aux hydrogels. Ceux-ci leur confèrent des propriétés de transition autour d'une certaine température, transition au cours de laquelle un changement discontinu de volume a lieu.

Cette thermosensibilité peut se manifester de trois manières, soit de manière négative, c'est-à-dire qu'une augmentation de température mènera à une diminution du volume. Le PNIPA, les copolymères de PNIPA et le poly(N,N-diéthylacrylamide) (PDEAAm) possèdent ce type de sensibilité. [10] La thermosensibilité peut également se manifester de manière positive, où une augmentation de température mènera à une augmentation du volume. Les copolymères d'acide acrylique (AAc) et d'acrylamide (AAm) possèdent ce type de comportement. Le troisième cas est celui des gels réversibles thermiquement, qui démontrent une transition solution-gélation (sol-

gel) à une certaine température, causée par une réticulation physique plutôt que chimique des molécules de polymère. Par exemple, les polymères blocs d'oxyde de poly(éthylène) (PEO) et d'oxyde de poly(propylène) (PPO) possèdent ce type de comportement. [10]

Les hydrogels démontrant une réponse négative à la température, lorsqu'ils sont utilisés comme vecteur de libération de médicament, démontrent généralement un profil de libération de type on-off, c'est-à-dire une libération qui est stoppée par l'augmentation de la température de l'hydrogel. Ce phénomène est causé par la formation d'une couche dense et moins perméable à la surface lorsque la température est augmentée au dessus de la température de transition. Cette barrière se forme car les molécules d'eau se trouvant à la surface de l'hydrogel sont évacuées plus rapidement, formant ainsi une couche plus dense à la surface, qui crée une barrière pour les molécules d'eau ainsi que les molécules de substance thérapeutique se trouvant plus profondément dans la structure.

C'est néanmoins ce type d'hydrogel qui possède le comportement le plus intéressant par rapport à notre application, soit le changement de volume le plus important selon le plus petit intervalle de température. Nous verrons également plus loin que les paramètres de synthèses peuvent être ajustés permettant le design du matériau au niveau moléculaire, modifiant ainsi son comportement afin de mieux l'adapter à l'application visée.

Parmi les autres types de sensibilités pouvant être retrouvées chez différents types de polymères, mentionnons les hydrogels sensibles au pH. Ceux-ci contiennent des groupements acides ou basiques, qui accepteront ou libèreront des protons en réponse à des changements de pH. Leurs principales applications sont la livraison de médicament à des sites spécifiques et la conception de biosenseurs ou d'interrupteur de perméation (*permeation switch*). La principale application des hydrogels sensibles au glucose est la livraison d'insuline de manière régulée. Finalement, les hydrogels électro-sensibles sont constitués de polyélectrolytes qui induisent des changements de volume lorsque soumis à des champs électriques. Ce comportement peut mener à la déformation de l'hydrogel par des changements de volume locaux. Ces matériaux possèdent également de nombreuses applications dans le domaine biomédical. [10, 18]

1.2.4 PNIPA et copolymère de PNIPA

Le poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPA, Figure 1.3) est le plus étudié des hydrogels thermosensibles. Il réagit négativement à un changement de température. Il est utilisé sous diverses formes telles que des chaînes simples en solution, des gels macroscopiques et microscopiques, des membranes ou des couches minces, des revêtements ou des fibres. Les hydrogels à base de PNIPA sont utilisés entre autre pour la livraison ciblée et contrôlée de médicaments, l'immobilisation d'enzymes, la séparation de protéines, etc.

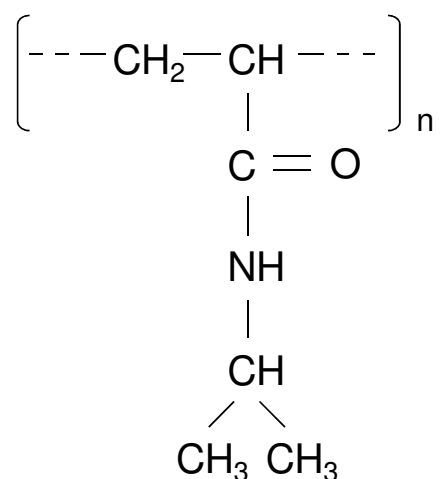


Figure 1.3: Molécule de poly(N-isopropylacrylamide)

Sous forme de gel, le PNIPA démontre un changement de volume discontinu autour d'une température de transition appelée LCST (*Lower Critical Solution Temperature*). Il passe ainsi d'un état gonflé, c'est-à-dire avec une forte concentration en eau, à un état dégonflé, où les molécules d'eau sont éjectées hors de la structure. Cette transition s'explique par la composition du matériau. Le PNIPA est formé d'un mélange de composants hydrophiles et hydrophobes, soit le groupement amide (hydrophile) et le groupement isopropyl (hydrophobe). Lorsque la température se situe sous la température de transition, il y a domination des liens hydrogène se trouvant entre les segments hydrophiles de l'hydrogel et les molécules d'eau. Celles-ci se lient donc aux groupes polaires des molécules d'hydrogel, et l'organisation se fait autour des groupes hydrophobes. La situation se renverse lorsque la température s'élève au dessus du LCST. Les liens hydrogène s'affaiblissent au profit des liens hydrophobes. Les molécules se replient sur elles-mêmes et en conséquence, les molécules d'eau sont éjectées hors de la structure. [10] Cette transition réversible, appelée transition pelote-globule (*coil-globule transition*), est illustrée à la

Figure 1.4. La température à laquelle survient cette transition dépend de la microstructure de l'hydrogel, déterminée par les conditions dans lesquelles il est synthétisé, mais se situe généralement entre 30 et 35°C pour le PNIPA. Cette température de transition très rapprochée de la température du corps humain le rend très intéressant pour des applications biomédicales. [10, 19, 20]

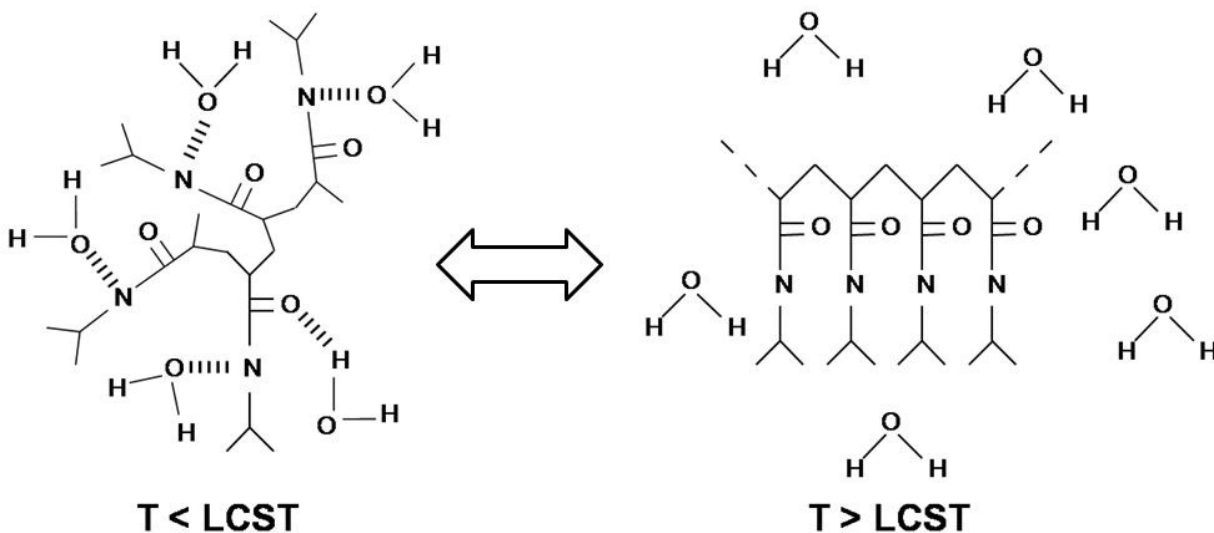


Figure 1.4: Illustration du changement de configuration réversible du PNIPA à des températures au-dessous et au-dessus du LCST

La microstructure de l'hydrogel est influencée par la température à laquelle la polymérisation survient. En effet, Ju et al [21] ont synthétisé le PNIPA à deux températures différentes, soit à 25°C ($T < LCST$) et à 60°C ($T > LCST$). Une différence claire entre les microstructures des deux échantillons a pu être observée. En effet, l'hydrogel synthétisé à une température plus basse que le LCST démontre une microstructure poreuse plus homogène et très dense, alors que l'échantillon synthétisé à 60°C possède une microstructure hétérogène et moins dense, causé par la séparation des molécules d'eau et du réseau de polymère lors de la réaction. Il a été conclu par cette étude que l'homogénéité de la microstructure permet une meilleure transition de volume autour de la température de transition, mais que l'hétérogénéité des échantillons synthétisés à 60°C permet une réponse plus rapide à un même changement de température. Le design de

l'hydrogel et de sa microstructure, c'est-à-dire l'ajustement de la température lors de la synthèse, doit donc se faire en fonction de l'application visée.

Par ailleurs, l'ajustement du ratio groupements hydrophiles/hydrophobes permet de modifier la température de transition. En effet, en augmentant la proportion de composants hydrophiles, par la copolymérisation avec une espèce telle que l'acide acrylique (AAc), les liens hydrogènes seront favorisés au dépend des liens hydrophobes, élevant ainsi la température à laquelle la transition surviendra. [10, 22]

La copolymérisation du NIPA avec d'autres types de monomères, ou la création d'un réseau de polymère interpénétré (IPN) peut également mener à des hydrogels plus polyvalents, possédant une sensibilité à d'autres stimuli, ou démontrant une augmentation de la rapidité de la réponse aux changements de température.

Le comportement typique des hydrogels à base de PNIPA est illustré à la Figure 1.5, où l'on peut observer la transition radicale qui survient autour du LCST. Dans ce cas, la synthèse est effectuée avec un réseau IPN de PNIPA et d'oxyde de polyéthylène (PEO), ce qui augmente la rapidité de la réponse au changement de température. [23]

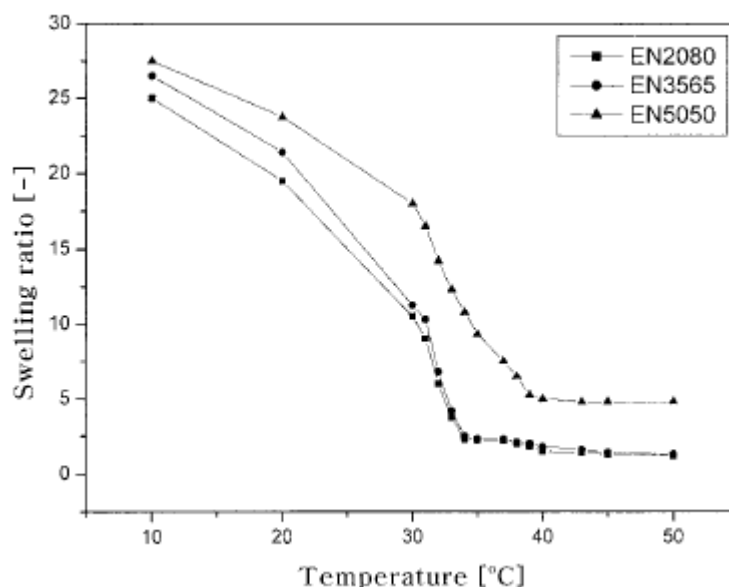


Figure 1.5: Illustration du changement de volume d'un hydrogel à base de PNIPA, comportant différents ratio PEO/PNIPA dans un réseau semi-IPN, tiré de [23].

1.3 Matériaux à mémoire de forme

Un autre type de matériaux possédant une sensibilité à la température sont les polymères à mémoire de forme. Ceux-ci ont la capacité de revenir à une forme originale, à partir d'un état déformé et temporaire mais stable, par l'application d'un stimulus extérieur tel que la température.

Parmi ce type de matériau, le CHEM (*cold hibernated elastic memory*) est un matériau possédant une structure à alvéoles ouvertes, pouvant être maintenu dans une forme stable mais temporaire, et qui peut retrouver son état permanent lorsqu'on lui applique une température suffisamment élevée.

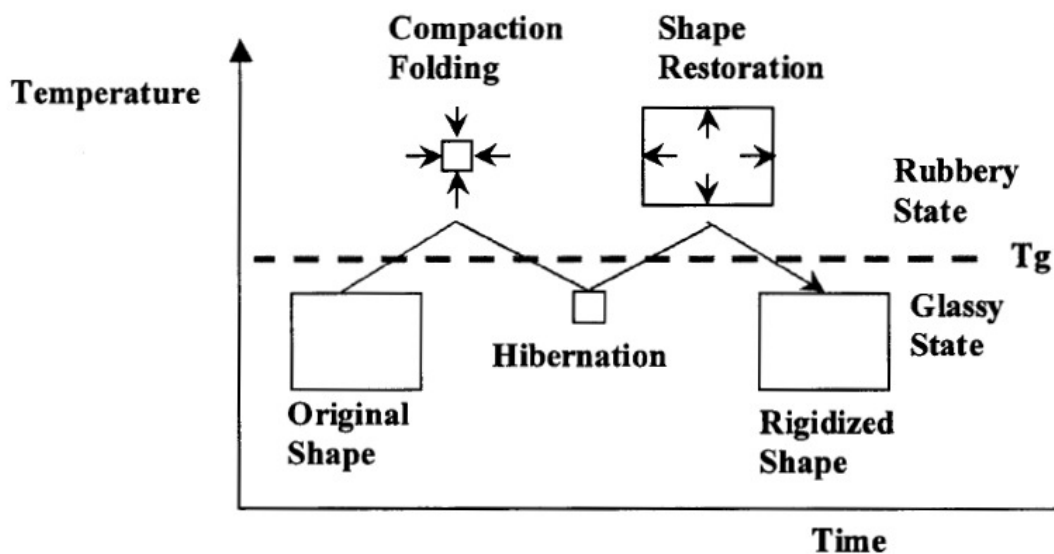


Figure 1.6: Illustration du comportement du CHEM en fonction du temps et de la température.

Tiré de [24].

Concrètement, le matériau possède une température de transition, au-delà de laquelle il peut être compacté sous une forme qu'il conservera lorsque la température sera abaissée en deçà de cette température de transition. Le matériau conservera cette forme tant que la température ne sera pas

ramenée au-dessus de la température de transition. À ce moment, le matériau reviendra à sa forme originale et permanente. Ce phénomène est illustré à la Figure 1.6.

L'explication de ce phénomène se base sur la structure moléculaire et sur le mouvement moléculaire. Le mouvement micro-brownien, possible à des températures supérieures à T_g (état thermo-élastique), permet de déformer le matériau par l'application de contraintes externes, et les chaînes moléculaires peuvent s'orienter dans la direction de la tension appliquée. Si la température est diminuée sous cette température, les mouvements micro-browniens seront gelés et la déformation ainsi que l'orientation des chaînes seront fixées (état vitreux), jusqu'à ce que la température soit augmentée à nouveau au-delà de T_g . Les mouvements micro-brownien reprendront alors et le matériau retrouvera sa forme originale. Par la suite, le matériau peut être refroidi, à température ambiante dans le cas où la température de transition est supérieure, afin de retrouver leur rigidité nécessaire à l'utilisation.

Un des aspects intéressants des structures CHEM est que la température de transition T_g peut être choisie à l'intérieur d'un grand intervalle, soit de -70°C à 70°C , ce qui permet des applications dans de nombreux domaines, allant du biomédical à l'aérospatial. On leur trouve également de nombreuses caractéristiques, pouvant être avantageuses pour un bon nombre d'applications potentielles, comme par exemple leur faible masse, leur faible volume lorsqu'ils sont à l'état d'hibernation (état compacté), l'absence d'effet de conservation à long terme dans leur état compacté, leur grande fiabilité, leur simplicité de fabrication et leur faible coût.

Parmi les applications envisagées dans le domaine biomédical, on parle d'agent d'embolisation, de matériau d'obturation pour les anévrismes ou de dispositif d'embolisation auto-déployable.

En revanche, leur mauvaise conductibilité thermique, considérée comme un avantage pour plusieurs applications, pourrait être nuisible dans notre situation, puisque l'objectif est de chauffer le matériau intrinsèquement, en intégrant des nanoparticules magnétiques à l'intérieur de la structure et en les chauffant. De plus, le fait que le matériau nécessite une contrainte mécanique pour retourner à son état compressé rend le processus irréversible une fois injecté dans le système vasculaire, ce qui peut également s'avérer être un facteur limitant. [24-26]

1.4 Polymérisation et synthèse hydrogel

Nous avons donc déterminé que le PNIPA était le matériau sensible à la température démontrant le plus grand potentiel pour l'application de livraison ciblée de médicament. Nous verrons maintenant les techniques de polymérisation des polymères et nous attarderons sur les techniques de synthèse du PNIPA.

Polymérisation en chaîne

La création de la chaîne de polymère survient par l'addition successive de monomères au site actif se trouvant à l'extrémité de la chaîne en développement. Cette réaction se produit en trois étapes: l'initiation, la propagation et la terminaison. La première étape, l'initiation, consiste en la création du site actif nécessaire à la liaison entre les deux monomères. Ce site actif est obtenu en brisant le lien π de la molécule d'initiateur, et mène à la formation d'un radical neutre, d'un cation ou d'un anion. Le polymère que l'on cherche à polymériser déterminera le type d'initiateur dont on a besoin. La décomposition de l'initiateur peut se faire de diverses manières : initiation thermique, initiation redox, réaction photochimique, initiation par radiations ionisantes, électroinitiation ou initiation par plasma. Le site actif est ensuite décalé, par l'ajout successif de molécules de monomères qui réagissent avec ce site, par une réaction en chaîne, qui se termine finalement au moment où le site actif est détruit par la réaction de deux radicaux, annihilant ainsi le site actif. Il s'agit d'une réaction de terminaison. [9, 27]

Polymérisation du NIPA

Dans le cas de la polymérisation du NIPA, l'APS est utilisé comme initiateur. Il s'agit d'une initiation redox, c'est-à-dire d'une initiation par la réaction d'oxydoréduction d'un composé soluble dans l'eau. Le radical créé est ensuite ajouté au premier monomère de la chaîne, pour produire le monomère initiateur de la chaîne.

Dans le cas des hydrogels, la polymérisation se fait en solution, les produits étant dilués dans l'eau où le pH est stabilisé à l'aide d'un tampon. De plus, afin d'obtenir un réseau tridimensionnel, un agent de réticulation est ajouté aux produits de réaction de polymérisation, afin de créer des liens chimiques entre les chaînes de polymères. La réticulation peut également se faire à partir de liens physiques, c'est-à-dire par des liens ioniques, hydrogène, des interactions

hydrophobes, etc. La réticulation physique sera déclenchée par des facteurs externes tels que la température ou le pH, plutôt que par l'ajout d'un agent de réticulation.

Dans le cas des hydrogels, contrairement aux polymères standards, le solvant n'a pas besoin d'être retiré lorsque la réaction de polymérisation est complétée, celui-ci faisant partie de la structure de l'hydrogel créé. Les hydrogels synthétisés doivent néanmoins être nettoyés à l'eau distillé afin d'éliminer les composants n'ayant pas réagi (agent de réticulation, monomères, initiateur)

1.5 Synthèse de particules

Différentes techniques de synthèse de particules d'hydrogel existent et sont envisagées.

Polymérisation hétérogène

La polymérisation peut se faire de manière hétérogène. Trois types de polymérisation hétérogène peuvent être employés : la dispersion, la précipitation et l'émulsion.

Lors de la polymérisation par dispersion, les composants sont solubles dans la phase continue, mais le polymère produit devient insoluble, conduisant à une dispersion stable de particules polymériques. Cette méthode est principalement utilisée pour les polymères hydrophobes.

Lors de la précipitation par dispersion, les composants, tout comme le polymère créé, sont solubles dans la phase continue. L'ajout d'un agent de réticulation permettra d'isoler les particules. Les particules produites par cette méthode possèdent généralement une forme irrégulière et une grande polydispersité.

Finalement, la polymérisation par émulsion inverse (type « water in oil ») consiste à disperser les composants solubles dans une phase de solvant organique. Une dispersion stable est maintenue à l'aide d'un surfactant soluble dans l'huile, et par agitation mécanique (mini-émulsion) ou par ultrasons (micro-émulsion). La polymérisation survient à l'intérieur des gouttelettes aqueuses, lors de l'ajout d'un initiateur. La taille des particules obtenues par cette technique peut varier de 50 nm à 600 nm, dépendamment des conditions d'agitation lors de la polymérisation. [9]

Ces techniques ont été utilisées pour la synthèse du PNIPA par différentes équipes dont l'objectif était la synthèse de nanoparticules ou de microparticules de diamètres inférieurs à 1 μm . [28] L'application étudiée ici nécessite des particules de diamètres supérieurs, de 50 à 100 μm afin

d'assurer l'embolisation. Les approches de polymérisation hétérogène ne seront donc pas approfondies davantage dans le cadre de ces travaux.

Émulsification par membrane

Une autre méthode, l'émulsification par membrane, permet d'obtenir des particules selon une large gamme de diamètres, allant de quelques μm à plus de 100 μm . Cette méthode consiste en l'application d'une pression uniforme sur une solution, appelée phase dispersée, afin de la faire passer au travers une membrane perméable possédant une porosité uniforme, avec des pores de taille connue, vers une autre solution appelée phase continue. La taille des particules est déterminée par la porosité de cette membrane. Les forces de cisaillement sont inférieures à celles des méthodes d'émulsification décrites précédemment. Elles peuvent résulter de l'agitation de la solution constituant la phase continue ou de la présence d'un débit de cette solution. La présence d'un surfactant dans la phase continue permet de stabiliser les particules formées, et d'éviter leur coalescence. Les membranes les plus utilisées sont les membranes de verre poreux de Shirasu (SPG) et peuvent posséder différents degrés de porosité, allant de 0,1 μm à 20 μm . Ces membranes mènent à des particules de différentes tailles, dépendamment des méthodes de synthèse et du matériau synthétisé. La taille moyenne et la distribution de taille des particules obtenues sont influencées par des facteurs liés à la membrane (matériau, porosité, taille des pores, géométrie), des paramètres de synthèse (pression appliquée sur la phase dispersée, agitation ou débit de la phase continue) et les propriétés des phases (viscosité de la phase dispersée, présence de surfactant dans la phase continue). [29, 30] Cette méthode a été appliquée par l'équipe de Makino et al. [31] pour la synthèse de particules de PNIPA-co-AAc. Une solution aqueuse de NIPA, d'APS, de BIS et d'AAc forme la phase dispersée. Celle-ci passe au travers de la membrane de SPG, vers la phase continue, pour former une émulsion de type inverse (E/H, ou « water in oil »). L'accélérateur est ajouté dans cette émulsion afin de permettre la polymérisation de l'hydrogel. Des particules ont ainsi pu être synthétisées, avec des diamètres allant de 3,4 à 10,3 μm , et ce avec des membranes de porosité allant respectivement de 0,33 à 1,70 μm , c'est-à-dire environ 10 fois plus petite que la taille des particules obtenues. Cette méthode n'a pas été retenue dans le cadre de ces travaux, encore une fois en raison de l'ordre de grandeur des diamètres de particules pouvant être obtenus.

1.6 Utilisation d'alginate

Une autre stratégie étudiée pour la synthèse de particules d'hydrogel est l'utilisation d'alginate. L'alginate est un polymère de source naturelle, composée d'un mélange de deux monomères, l'acide mannuronique et l'acide guluronique. Les chaînes de polymère sont composées de blocs des différents monomères, la proportion et la distribution de ces deux composants déterminant les propriétés de l'alginate une fois gélifié. Comme l'alginate est d'origine naturelle, sa composition varie en fonction des diverses espèces d'algues desquelles il est extrait.

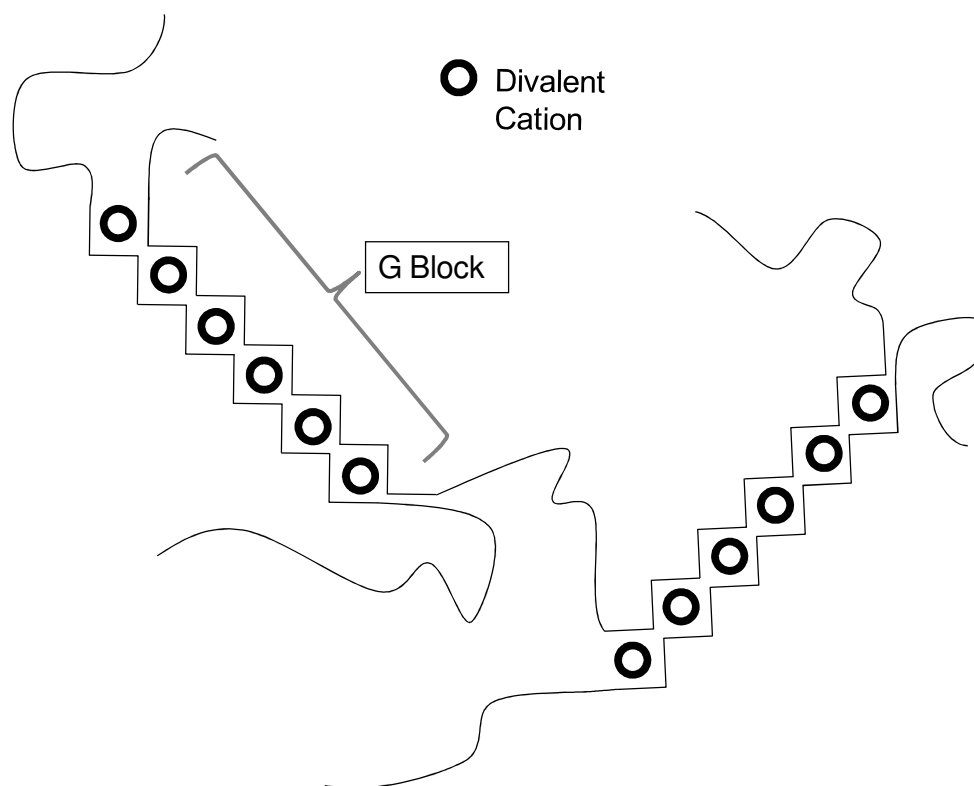


Figure 1.7: Illustration du processus de gélification des chaînes d'alginate

Plus l'alginate est riche en acide guluronique, plus le gel obtenu sera mécaniquement résistant. En effet, la gélification de l'alginate s'effectue par la liaison ionique entre les différents blocs G et des ions divalents tels que des ions Ca^{2+} . Ainsi, le gel comportera plus de liens entre ses chaînes, permettant d'obtenir un matériau plus résistant. [32, 33]

L'alginate est un matériau fréquemment utilisé pour l'encapsulation de cellules, celui-ci offrant un environnement semi-perméable, permettant à certains nutriments d'atteindre la cellule et aux déchets de la cellule d'être évacués, tout en protégeant celle-ci des agressions extérieures. Une

application très courante est l'encapsulation d'îlots de Langerhans pour le traitement du diabète. [34-36]

Dans le cas de la synthèse d'hydrogel, l'alginate peut être utilisé comme un moule afin de permettre à l'hydrogel de polymériser sous forme sphérique. [37, 38] En effet, l'alginate gélifie pratiquement instantanément lorsqu'il est en contact avec une solution d'ions divalents. La polymérisation du PNIPA, quant à elle, s'effectue un peu moins rapidement. Elle peut en fait mettre jusqu'à 24 h avant d'être complétée. En mélangeant à la solution d'alginate les monomères et réactifs nécessaires à la polymérisation de l'hydrogel et en ajoutant à la solution d'ions divalents l'initiateur servant à déclencher la réaction de polymérisation, celle-ci s'enclenchera lors du contact des deux solutions, mais moins rapidement que la gélification de l'alginate. Les monomères de NIPA seront donc emprisonnés dans les particules d'alginate, et polymériseront donc en réseau IPN à l'intérieur de l'alginate.

Par la suite, un simple trempage des particules d'alginate/PNIPA dans une solution d'EDTA permettra de dissoudre l'alginate et ainsi, seul le PNIPA sera conservé. En effet, l'EDTA possède un pouvoir de chélation sur les ions Ca^{2+} , en formant un complexe plus stable avec ceux-ci. Les blocs G de l'alginate, liés entre eux par ces mêmes ions Ca^{2+} , se retrouvent libérés. L'alginate est donc dissous dans la solution, ne laissant que les particules d'hydrogel.

1.6.1 Stratégie de diminution de la taille des particules

Cependant, tout comme pour notre application de microdispositif, les applications habituelles de l'alginate, c'est-à-dire l'encapsulation de cellules, nécessitent que les particules soient de taille inférieure à la taille des particules obtenues par un simple égouttement de la solution au travers d'une aiguille. En effet, comme nous le verrons plus loin, on peut faire varier la taille des particules obtenues par la méthode d'égouttement conventionnel en jouant sur différents paramètres de synthèse tel que le débit de la solution d'alginate ou le diamètre intérieur de l'aiguille utilisée, mais on peut difficilement obtenir des particules de diamètre inférieur à 1 mm. La taille des particules, pour les applications d'encapsulation, doit être semblable à la taille des cellules elles-mêmes afin de ne pas présenter une barrière trop grande à la diffusion des nutriments et à l'évacuation des déchets.

Des stratégies sont donc envisagées afin de diminuer la taille de ces particules, c'est-à-dire diminuer la taille des gouttelettes formées en ajoutant une force vers le bas ou en diminuant la tension de surface de la solution.

Une première stratégie est l'application d'une perturbation mécanique telle qu'une vibration afin de perturber le flux de solution et permettre d'induire la fragmentation du jet et ainsi, d'obtenir des particules de plus petits diamètres.

Une autre stratégie consiste à utiliser un flux d'air coaxial, par l'arrangement d'une colonne autour de l'aiguille par laquelle s'écoule la solution d'alginate, afin d'ajouter une force verticale s'ajoutant à la gravité et permettant aux gouttelettes de s'écouler plus rapidement, et donc de diminuer leur volume.

Finalement, la dernière stratégie étudiée est l'ajout d'un champ électrostatique entre la solution d'ions divalents et la solution d'alginate. Le champ électrostatique induit une charge à la surface du liquide. Les charges mutuelles entre la solution et l'aiguille produit une force de répulsion, et la solution est éjectée hors de l'aiguille. Cette méthode permet donc de diminuer la taille des particules produites. [39] Des équipes ont pu, grâce à cette méthode, obtenir des particules aussi petites que 50 μm . [40] La taille des particules obtenues dépend de différents paramètres : parmi ceux-ci, on retrouve encore une fois, le diamètre intérieur de l'aiguille utilisée et le débit à laquelle la solution d'alginate s'écoule, mais également les paramètres liés au champ électrostatique, c'est-à-dire l'intensité du voltage appliqué et la distance entre les 2 électrodes, à savoir l'aiguille et la solution.

Plusieurs équipes ont privilégié l'utilisation d'alginate pour la synthèse de particules de PNIPA, et sont parvenues à synthétiser des particules très uniformes, de tailles pouvant varier dans notre intervalle d'intérêt. [37, 41] Des particules allant jusqu'à 1 mm ont pu être synthétisées, et à l'aide des stratégies de diminution de la taille des gouttelettes décrites ci-dessus, on atteint des diamètres aussi petits que 50 μm . [40] Par ailleurs, selon une étude comparative des différentes stratégies de diminution de la taille des particules, c'est l'utilisation d'un champ électrostatique qui est considérée comme la plus polyvalente et permettant d'obtenir des particules de petites tailles ainsi qu'un bon contrôle sur la distribution de taille. [42] C'est donc cette approche qui a été sélectionnée et qui sera approfondie dans la suite de ce mémoire.

CHAPITRE 2 MAGNÉTISME, NANOPARTICULES ET HYPERTHERMIE

Dans ce chapitre, nous explorerons, après les avoir défini, les différentes techniques de traitement par hyperthermie, ainsi que les propriétés des nanoparticules magnétiques leur permettant de générer de la chaleur, afin de voir de quelle manière celles-ci pourront être exploitées pour l'application de microdispositifs à base de matériaux thermosensibles.

2.1 Hyperthermie

L'hyperthermie est un moyen prometteur pour le traitement du cancer. Elle consiste à augmenter la température de certaines régions du corps au dessus de la température normale, afin de ralentir ou de stopper la croissance des cellules cancéreuses, la viabilité de celles-ci étant considérablement réduite, et leur sensibilité à la chimiothérapie et aux radiations étant augmentée à des températures supérieures à 41°C. Cette sensibilité à la température est causée par le fait que les réseaux vasculaires et nerveux ne sont pas complètement développés dans les tumeurs, rendant ainsi moins efficace le refroidissement par le flux sanguin par rapports aux cellules saines. Les cellules cancéreuses sont donc sensibles à des températures aussi basses que 43°C alors que les cellules saines peuvent survivre à des températures jusqu'à 46°C. [6] Cependant, les températures obtenues par hyperthermie doivent être bien contrôlées et localisées car elles peuvent entraîner des dommages aux cellules saines. Une trop grande augmentation de la température, au-delà de 46°C et jusqu'à 56°C, est appelé thermoablation et mène à la nécrose cellulaire, à la coagulation et à la carbonisation des tissus. La thermo-ablation mène à une réaction du système immunitaire, et peut mener à un choc toxique causé par la libération de grandes quantités de tissus nécrotiques et de réactions inflammatoires majeures. Cette réaction ne se produit pas lors de l'hyperthermie à plus basse température, puisque dans ce cas, la mort cellulaire se produit par apoptose, et donc sans déclencher de réponse immunitaire. De plus, la température à laquelle la thermoablation des cellules cancéreuses survient est trop proche de celle des cellules normales, et un contrôle trop précis de la température serait nécessaire.

La plupart des équipes se penchent donc sur une hyperthermie plus douce, i.e. à des températures entre 45°C et 46°C. Cette technique cause moins d'effets secondaires, comparativement à la chimiothérapie et à la radiothérapie. De plus, contrairement à ces techniques, il n'y a pas

d'accumulation d'effets secondaires toxiques, ce qui permet un plus grand nombre de répétition du traitement. L'hyperthermie peut également être combinée à des traitements de chimiothérapie ou de radiothérapie et ainsi en améliorer l'efficacité tout en diminuant les doses administrées et la toxicité secondaire. Néanmoins, un effort technique est nécessaire afin de maximiser l'homogénéité et la stabilité thermique, et tenir compte de la spécificité des tissus traités. [43]

Les différentes approches utilisées pour le chauffage ont été classées en trois catégories : le contact direct avec une source chauffée extérieurement, les systèmes d'applications sans contacts tels que les dispositifs à ultrasons, à micro-ondes, à radiofréquences et à infrarouges, et les dispositifs insérés directement tels que des sondes, des antennes, des fibres laser ou des médiateurs. Chacune de ces stratégies permet le chauffage à différents niveaux, soit au niveau du corps dans son ensemble, au niveau d'un organe précis, d'une tumeur, ou encore au niveau cellulaire.

Certains dispositifs sans contact, par exemple des dispositifs à ultrasons focalisés ou à radiations électromagnétiques, sont disponibles commercialement. Cependant, il est encore impossible d'atteindre des régions plus profondes sans endommager les tissus sains environnants. C'est pourquoi d'autres stratégies sont en développement.

Le principe des médiateurs est l'utilisation d'une source d'énergie extérieure et la conversion de cette énergie en chaleur. Ces médiateurs peuvent être chauffés de manière capacitive ou de manière inductive. Le chauffage capacitif exploite la composante électrique du champ électromagnétique. Ce type de chauffage peut mener au chauffage incontrôlé des tissus, ceux-ci possédant une conductivité électrique intrinsèque, ou à des hétérogénéités du champ électrique causées par les différentes perméabilités diélectriques des tissus. C'est pourquoi le chauffage inductif, exploitant la composante magnétique du champ, est favorisé. Celui-ci nécessite des matériaux magnétisables, et aucun matériau magnétique intrinsèque pouvant générer de la chaleur dans un champ magnétique alternatif ne constitue les tissus vivants.

Il est cependant impossible d'éliminer complètement le chauffage capacitif des tissus puisque la composante électrique d'un champ électromagnétique n'est jamais nulle. Il a été démontré que pour le confort du patient, lors d'un traitement d'une durée d'une heure, le produit de la fréquence et de l'amplitude du champ magnétique ne devrait pas être supérieur à $4.85 \times 10^8 \text{ A m}^{-1} \text{ s}^{-1}$. De plus, les fréquences appliquées devraient être supérieures à 50 kHz, afin d'éviter les

stimulations neuromusculaires, mais inférieures à 10 MHz, pour atteindre une profondeur de pénétration suffisante des champs électromagnétiques alternatifs. [43]

Certain médiateurs macroscopiques sont insérés directement dans la tumeur, sous forme de tige ou de grains ferromagnétiques. Bien que certains aient été démontrés comme efficaces dans une grande variété de tumeurs [43], ils démontrent de nombreuses limitations. En effet, ils nécessitent une opération chirurgicale invasive. De plus, il peut être difficile d'accéder à certaines tumeurs et les températures obtenues peuvent être non-uniformes. Ces mêmes limitations sont présentes dans le cas du chauffage direct, par l'injection d'eau chauffée dans la tumeur.

Les médiateurs à l'échelle micro ou nanométrique, quant à eux, sont injectés sous forme de dispersions de particules. L'utilisation de particules magnétiques homogénéise la température. De plus, leurs propriétés magnétiques permettent le suivi de leur distribution dans les tissus grâce à l'imagerie à résonance magnétiques. [43] L'hyperthermie magnétique est généralement appliquée selon l'une des trois stratégies suivantes : l'hyperthermie par embolisation artérielle, c'est-à-dire l'embolisation des particules dans les vaisseaux alimentant la tumeur suivi du chauffage des particules embolisées, l'hyperthermie par injection directe, c'est-à-dire l'injection d'une solution avec les particules magnétiques en suspension, directement dans les tissus tumoraux, et finalement, l'hyperthermie intracellulaire, c'est-à-dire l'injection de particules qui seront captées spécifiquement ou non par les cellules cancéreuses. [43]

2.2 Magnétisme et nanoparticules magnétiques

Les matériaux magnétiques sont reconnus pour leur capacité à générer de la chaleur lorsqu'ils sont soumis à un champ magnétique alternatif. Trois mécanismes sont responsables de cette génération de chaleur: les pertes par hystérésis, les pertes par courant de Foucault et les pertes par relaxation, ce qui inclut la relaxation brownienne et la relaxation de Néel.

L'efficacité de la transformation d'énergie dépend principalement de l'amplitude et de la fréquence du champ magnétique appliqué ainsi que des propriétés des matériaux magnétiques. [6]

La chaleur peut être créée par les courants de Foucault qui apparaissent dans tout matériau conducteur soumis à un champ magnétique. La chaleur ainsi produite est directement liée à la taille du matériau, et devient négligeable dans le cas de nanoparticules.

Le chauffage causé par les pertes par hystérésis survient dans les matériaux possédant plusieurs domaines magnétiques, dits multi-domaines. La présence d'un champ magnétique favorise les domaines possédant la même direction de magnétisation. Ceux-ci prennent donc de l'expansion, au détriment des autres domaines. Ce phénomène est appelé déplacement des parois de domaines magnétiques. Ce phénomène n'est pas réversible, c'est-à-dire que les courbes de magnétisation, lorsque le champ est élevé et lorsqu'il est diminué, ne coïncident pas. On parle donc d'un comportement d'hystérésis. De la chaleur est donc générée lors de l'application d'un champ alternatif. Ce mécanisme n'est pas présent dans le cas de nanoparticules superparamagnétiques, puisque celles-ci ne possèdent qu'un seul domaine.

La chaleur produite par le mécanisme de relaxation de Néel provient de l'énergie dissipée lorsque les moments magnétiques reviennent à leur orientation d'équilibre, après que le champ magnétique alternatif leur ait fourni l'énergie nécessaire pour modifier leur orientation. Ce phénomène est exprimé par l'équation de relaxation de Néel :

$$t_N = t_0 e^{\frac{KV}{kT}} \quad (1)$$

où $t_0 \approx 10^{-9} s$, k est la constante de Boltzmann, T est la température et K est la constante d'anisotropie qui, avec le volume, détermine la barrière d'énergie à surmonter pour changer l'orientation du moment magnétique. Le maximum de chaleur est créé par ce mécanisme lorsque la fréquence ν_N , donnée par $2\pi\nu_N t_N = 1$, est appliquée. Elle correspond à la fréquence du maximum de la composante imaginaire de la susceptibilité magnétique $\chi(\nu) = \chi'(\nu) - i\chi''(\nu)$, qui correspond à la différence de phase entre le champ magnétique appliqué et la magnétisation associée via l'équation $M = \chi H$, où $H = H_0 \cos(\omega t)$ correspond à un champ magnétique alternatif. [44]

Autant dans les matériaux multi-domaines ou mono-domaines, lorsque ceux-ci sont sous forme de particules, le chauffage peut être également être causé par la relaxation brownienne. Il s'agit du mouvement de rotation de la particule sous l'effet du moment exercé par le champ magnétique sur son moment magnétique. Dans ce cas, la barrière d'énergie est déterminée par la friction à l'intérieur du liquide lors de la réorientation de la particule. Le temps de relaxation brownien est déterminé par l'équation suivante :

$$t_B = \frac{3\eta V_B}{kT} \quad (2)$$

où η est la viscosité du milieu environnant et V_B est le volume hydrodynamique de la particules. La fréquence ν_B nécessaire pour la création d'un maximum de chaleur est dans ce cas $2\pi\nu_B t_B = 1$. Cette relaxation survient dans le cas où la particule peut se déplacer librement dans son milieu.

Pour mesurer l'efficacité de chacun de ces mécanismes, on utilise le SAR (taux d'absorption spécifique) défini par

$$SAR = C \frac{\Delta T}{\Delta t} \quad (3)$$

où C est la chaleur spécifique du matériau en J/gK et correspond à puissance de chauffage d'un matériau magnétique par gramme. Il est cependant difficile d'obtenir une expression générale pour le SAR, étant donné qu'il y a différents mécanismes en jeu, chacun d'eux impliquant plusieurs paramètres. La valeur du SAR est néanmoins importante pour ce qui est des applications biomédicales, puisque plus grande elle sera, plus la dose de matériau magnétique injecté au patient pourra être faible. [43]

Il est également important que la distribution de taille des nanoparticules soit la plus uniforme possible afin d'obtenir un chauffage efficace, puisque les différents mécanismes en jeu requièrent différentes gammes de fréquences, déterminées par la taille de ces nanoparticules.

2.3 Nanoparticules et matériaux thermosensibles

L'induction de chaleur de nanoparticules magnétiques est exploitée de différentes manières par différentes équipes. Trois stratégies sont généralement adoptées, soit l'utilisation de nanoparticules en solution, l'utilisation de nanoparticules avec un revêtement d'un matériau thermosensible [45-47], ou l'utilisation de nanoparticules intégrées dans un matériau thermosensible. [6, 48] C'est cette dernière approche qui nous intéressera dans ce mémoire.

Le matériau généralement utilisé est l'oxyde de fer, Fe_3O_4 car il offre une bonne magnétisation à saturation, en plus d'être relativement sécuritaire pour les applications biomédicales et de pouvoir

facilement être synthétisé sous forme de nanoparticules pour être incorporée dans un autre matériau tel qu'un hydrogel. [49]

Dans certains cas, des hydrogels thermosensibles démontrant une transition sol-gel sont utilisés pour maintenir les nanoparticules magnétiques près de la tumeur et ainsi, ne chauffer que des régions spécifiques. [50, 51]

Un autre exemple d'application est le système PVA - oxyde de fer élaboré par Lao et al. [52] pour des applications d'hyperthermie et de livraison de médicament. Les matériaux sont choisis en raison de leur biocompatibilité, et le PVA est chargé avec 2,5 wt% d'oxyde de fer. Ce système leur a permis d'atteindre une température de 43°C, et ce en 5 minutes environ, avec un champ magnétique alternatif de 1,7 kA/m et à une fréquence de 375 kHz. Ces résultats sont intéressants dans le cadre de notre application car le changement de température obtenu se situe dans l'intervalle que nous recherchons, et le temps requis pour atteindre cette température est relativement court, ce qui est important également pour ne pas allonger inutilement le traitement.

De plus, la température maximale obtenue à l'aide de nanoparticules magnétiques peut être contrôlée en ajustant le type de nanoparticules et leur concentration, ou en ajustant le champ magnétique appliqué. Dans notre cas, ce sera plutôt le champ AC qui devra être ajusté, puisque les paramètres de type et de concentration de nanoparticules ferromagnétiques seront déterminés en conséquence de leurs propriétés de guidage.

CHAPITRE 3 BIOCOMPATIBILITÉ

Nous nous intéresserons dans ce chapitre aux aspects de biocompatibilité des matériaux envisagés ainsi qu'aux techniques de stérilisation qui pourront être utilisées avec ces matériaux thermosensibles.

3.1 Hydrogel

Plusieurs études mentionnent le fait que les monomères de N-isopropylacrylamide sont cancérigènes et tératogènes. Cependant, une étude a démontré qu'une fois les monomères polymérisés et sous forme de nanoparticules d'hydrogel (réticulés), ils démontrent une meilleure biocompatibilité.

Wadajkar et al. [53] ont effectués des tests sur des cellules fibroblastes, des cellules musculaires lisses aortiques et des cellules endothéliales microvasculaires humaines. Les cellules ont été incubées pendant 6h avec différentes concentrations de nanoparticules de PNIPA, avec des nanoparticules de différentes tailles, ainsi qu'avec des monomères de NIPA. Les résultats de tests colorimétriques MTS ont démontré que, dans le cas des cellules fibroblastes, la viabilité des cellules n'est pas significativement diminuée lorsqu'elles sont incubées avec les nanoparticules de PNIPA, peu importe la concentration, alors qu'une différence significative était observée dans le cas des monomère de NIPA, à partir de concentrations de 5 mg/ml. Dans le cas des 2 autres types de cellules, une diminution significative de la viabilité des cellules a été observée à partir de concentrations de monomères et de nanoparticules de 5 mg/ml. Dans tous les cas cependant, il a été observé que la biocompatibilité des nanoparticules de PNIPA était supérieure à celle des monomères de NIPA. Il est suggéré que la structure de la surface réticulée de PNIPA diminuerait la cytotoxicité.

Ils ont également étudié l'effet du temps d'exposition, et n'ont observé aucun effet significatif dans le cas des nanoparticules de PNIPA. Finalement, la toxicité modérée observée dans le cas de très grandes concentrations de nanoparticules (10 mg/ml) fut jugée pharmacologiquement négligeable. Selon cette étude, les nanoparticules de PNIPA peuvent donc être envisagées pour les applications de livraison de médicament contrôlée. [53]

3.2 Hydrogel chargé de nanoparticules magnétiques

Une étude de Meenach et al. [54] démontre le fait que les hydrogels contenant des nanoparticules à l'intérieur de leur réseau agissent en fait comme une barrière à la toxicité potentielle de ces nanoparticules. En effet, une différence statistiquement significative était présente entre la viabilité des cellules (fibroblastes murins NIH 3T3) exposées aux nanoparticules de Fe_3O_4 et la viabilité des mêmes cellules exposée aux hydrogels comportant 3 wt % de nanoparticules de Fe_3O_4 . Cette étude a conclu que les nanocomposites d'hydrogel et de nanoparticules d'oxyde de fer démontraient des effets cytotoxiques minimaux et qu'ils pouvaient donc potentiellement être utilisés pour des applications biomédicales.

Par ailleurs, les nanoparticules de Fe_3O_4 sont largement étudiées pour de telles applications puisqu'elles sont reconnues pour être chimiquement stables, non-toxiques et non-cancérigènes. [35, 52]

3.3 Stérilisation

Tous les dispositifs médicaux et implants destinés à entrer en contact avec les patients doivent être décontaminés afin d'éviter tout risque d'infection nosocomiale ou de transmission de maladies. En revanche, les différentes méthodes de stérilisation sont reconnues pour affecter les propriétés des biomatériaux, chacune à leur manière. Ces techniques de stérilisation sont évaluées par rapport à leur efficacité de stérilisation ainsi qu'à l'intégrité du dispositif stérilisé, et il est important de connaître les effets sur les matériaux qui nous intéressent.

Le procédé de stérilisation le plus simple, rapide et efficace est la stérilisation par radiation gamma. Cette technique est effectuée à basse température et est donc appropriée pour des matériaux thermosensibles. Les photons avec des énergies de 1 keV à 10 MeV produisent des dommages aux systèmes biologiques, et éliminent ainsi les microorganismes. Cette méthode, pourtant largement utilisée, produit des radicaux libres, qui mènent à la radiolyse des molécules d'eau. Ces radicaux libres vont réagir avec des molécules cibles, modifiant ainsi les propriétés mécaniques et chimiques des biomatériaux stérilisés, ce qui affectera leurs performances cliniques. Les radiations peuvent également provoquer la réticulation non désirée du polymère. [55]

Une autre technique de stérilisation largement utilisée est la stérilisation par gaz d'oxyde éthylène (EtO). Il s'agit d'un procédé très long, qui peut durer de 2 à 48 h, mais également effectué à basse température ($< 50^{\circ}\text{C}$), ce qui permet son utilisation pour les matériaux thermosensibles, tout comme la stérilisation par radiation gamma. L'inactivation et la mort des microorganismes résultent de l'alkylation des groupements sulfhydryle, amino, carboxyle et hydroxyle des cellules, c'est-à-dire que l'EtO remplace l'atome d'hydrogène labile dans ces groupes. Par contre, l'EtO résiduel sur les dispositifs pose problème puisque celui-ci est toxique et potentiellement cancérigène. [55]

Aucune technique ne peut être appliquée à tous les dispositifs, et les dispositifs constitués de biopolymères sont particulièrement sensibles aux protocoles impliquant de hautes températures, des agents chimiques toxiques ou oxydants ou des radiations. Ceux-ci peuvent effectivement dégrader les performances ou la biocompatibilité des dispositifs. C'est pourquoi de nouvelles techniques de stérilisation sont recherchées. Parmi celles-ci, la stérilisation au dioxyde de carbone comprimé, ou dioxyde de carbone supercritique (SC- CO_2), est attrayante puisqu'elle utilise un gaz ininflammable, non-toxique, sécuritaire physiologiquement, inerte chimiquement et accessible. Elle est particulièrement adaptée aux hydrogels, ceux-ci étant sensibles aux hautes températures ainsi qu'aux radiations.

Lorsque chauffé et comprimé au-dessus d'un point critique ($31,1^{\circ}\text{C}$, $74,8 \text{ atm}$) facilement atteignable avec des équipements simples, le CO_2 démontre une densité semblable à un liquide mais une diffusivité et une viscosité semblable à un gaz, ce qui élimine les considérations de tension de surface. Ces propriétés lui permettent de pénétrer facilement les structures poreuses. Ces mêmes propriétés lui permettent également de facilement être éliminé, par une dépressurisation.

Le CO_2 supercritique démontre donc un potentiel intéressant pour la stérilisation de biomatériaux, son efficacité ayant été démontrée contre plusieurs types de bactérie (gram-positive, gram-négative) ainsi que des spores de bactéries. Beaucoup de travaux sont en cours pour parvenir à prouver son efficacité de stérilisation. [43, 44, 47, 56]

Cette méthode pourrait éventuellement bien s'appliquer à des hydrogels thermosensibles tels que les hydrogels à base de PNIPA étudiés ici.

CHAPITRE 4 MATÉRIEL ET MÉTHODE

Nous passons en revue dans ce chapitre les méthodes permettant la synthèse des hydrogels présentés en introduction. Nous y détaillons le matériel nécessaire, les techniques de synthèse et les protocoles des tests permettant de caractériser ces techniques et d'évaluer leurs performances pour le microdispositif étudié.

La synthèse des hydrogels est effectuée par polymérisation en chaîne (cf section 1.4). Le premier type de synthèse effectué est la synthèse dite simple, c'est-à-dire nous permettant d'obtenir des hydrogels sous forme de volumes ayant la forme du contenant dans lequel on effectue cette synthèse. Des tests de changement de volume de ces hydrogels avec le changement de température permettent ensuite de les caractériser.

Le PNIPA est par la suite synthétisé sous forme de particules et caractérisé afin de bien comprendre le comportement de cet hydrogel thermosensible, ainsi que l'influence de cette méthode de synthèse par rapport à la synthèse simple.

Le PNIPA est également synthétisé en y intégrant les nanoparticules ferromagnétiques, afin d'étudier sa capacité à accepter ces nanoparticules dans sa structure. Finalement, des tests de chauffage par l'application d'un champ magnétique alternatif sont réalisés sur le dispositif (hydrogel avec nanoparticules) afin d'évaluer son potentiel pour l'application décrite précédemment (cf section 1.1).

4.1 Synthèse de l'hydrogel

Les hydrogels sont préparés par polymérisation en chaîne, en dissolvant les monomères de NIPA, l'agent de réticulation (BIS) et l'accélérateur (TEMED) dans 10 ml d'eau DI, selon les proportions illustrées dans le Tableau 4.1. La solution est ensuite barbotée avec de l'azote pendant environ 30 minutes, en insérant une aiguille au travers un septum, afin d'éliminer l'oxygène dissous dans la solution, celui-ci compromettant la polymérisation de l'hydrogel.

La solution est par la suite distribuée dans 10 flacons de 1,5 ml. 34 μ l d'une solution d'APS à 10 wt % est ajouté dans chacun d'eux. Ils sont immédiatement agités vigoureusement à l'aide d'un agitateur de type vortex. Les flacons sont laissés à température ambiante, pendant 24 h, afin que la polymérisation se produise.

Tableau 4.1: Composés nécessaires à la synthèse de PNIPA et leur proportion, dilués dans 10 ml d'EDI

Produit	Nom	Abréviation	Masse molaire (g/mol)	Quantité (mmol)	Masse équivalente (g)
Monomères	N-isopropylacrylamide	NIPA	113,16	7,5	0,8475
Agent de réticulation	N,N'-methylenebisacrylamide	BIS	154,17	0,075	0,012
Accélérateur	N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine	TEMED	116,21	0,075	0,009 (=11µl)
Initiateur	Ammonium persulfate	APS	228,2	0,015	0,003

Les échantillons d'hydrogels sont par la suite retirés délicatement des flacons à l'aide d'une microspatule. Ils sont nettoyés à l'EDI afin d'éliminer les produits n'ayant pas réagi, puis immergés dans l'EDI pendant sept jours, en changeant l'eau une fois par jour, afin de les laisser stabiliser par rapport au volume d'eau absorbé.

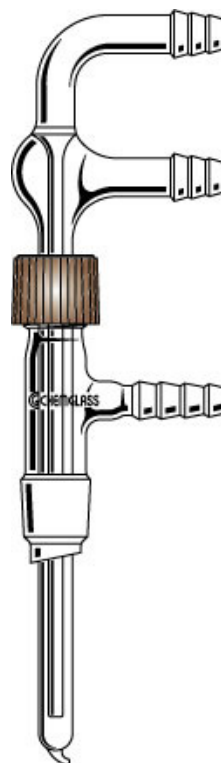
Des échantillons chargés de nanoparticules sont également synthétisés, en remplaçant 40% de l'EDI par une solution de nanoparticules de Fe_3O_4 dispersées dans l'eau et recouvertes d'un revêtement de dextrane (fluidMAG-DX, 50 mg/ml, Chemicell, GmbH, Germany). Des hydrogels avec une concentration de 20 mg/ml en nanoparticules sont ainsi obtenus.

4.1.1 Distillation de l'acide acrylique

L'acide acrylique (AAc) doit être distillé afin de le purifier en éliminant le MEHQ (Hydroquinone Monomethyl Ether) servant d'inhibiteur à la polymérisation. En effet, l'AAc polymérise facilement lorsqu'il est exposé à des radicaux issus de la présence d'impuretés ou de radiations UV. Cette réaction spontanée et fortement exothermique peut être prévenue par l'addition de MEHQ, servant d'inhibiteur à cette réaction. En effet, ce produit stabilise indirectement les radicaux présents, qui réagissent tout d'abord avec l' O_2 pour former des radicaux peroxydes, qui eux peuvent réagir avec des monomères instables. Ce sont donc ceux-ci qui sont stabilisés en réagissant avec le MEHQ. [53]



Figure 4.1: Tête Hickman

Figure 4.2: Réfrigérant de type
«cold finger»

Comme des quantités très faibles sont utilisées (quelques microlitres), un dispositif de microdistillation est utilisé, afin de diminuer le parcours de distillation et ainsi, diminuer les pertes dans le montage. Le montage est composé d'une colonne Hickman (Figure 4.1), d'un réfrigérant de type «cold finger» et d'un adaptateur sous vide (Figure 4.2), connecté à une pompe à vide (Uniweld, UVP4). La distillation doit se faire sous vide, à une température autour de 40°C. [57, 58] Pour ce faire, l'acide acrylique se trouve dans un flacon, plongé dans un bain d'huile maintenu à 40°C à l'aide d'une plaque chauffante (Fisher Scientific). Le liquide s'évapore et se condense sur les parois de la colonne Hickman ainsi que sur le condenseur dans lequel circule, de manière indépendante au reste du système, de l'eau froide provenant du robinet (eau courante). Le condenseur est conçu et orienté de manière à ce que les gouttelettes s'écoulent le long de ses parois et tombent dans le col de la colonne Hickman, où le liquide distillé est récolté à la fin du processus. Un piège à vide est également utilisé afin d'éviter que l'acide acrylique évaporé passe directement dans la pompe avant de se condenser. Celui-ci est plongé dans un vase

Dewar, rempli d'un mélange de glace et d'une solution de NaCl à très grande concentration (à la limite de saturation), permettant de maintenir la température autour de -4°C .

L'AAc ainsi distillé est utilisé la journée même pour la synthèse de P(NIPA-co-AAc), tel que décrit précédemment, en ajoutant différentes proportions d'AAc, de 0 à 10% de la quantité de NIPA (7,5 mmol) pour observer l'effet sur la température de transition.

4.2 Synthèse des particules d'hydrogel

Tel que décrit à la section 1.6, les particules sont synthétisées à partir d'une solution d'alginate afin d'obtenir une géométrie sphérique. Des tests de synthèse sont donc tout d'abord effectués à partir de solution d'alginate simple, afin de développer la méthode et de déterminer l'effet des différents paramètres de synthèse sur la géométrie des particules obtenues. À partir des résultats obtenus, des particules d'hydrogel sont par la suite synthétisées avec les paramètres de synthèses optimaux déterminés précédemment.

4.2.1 Synthèse de particules d'alginate

Des particules d'alginate sont préparées avec d'une solution d'alginate préparée à partir d'une solution tampon de TRIS à 0,01M. L'alginate est ajoutée à cette solution, graduellement et en mélangeant constamment à l'aide d'un agitateur magnétique, afin d'éviter toute agglomération. Des solutions d'alginate à deux concentrations différentes (0,8 et 1,75 wt %) sont utilisées afin de déterminer l'effet de la viscosité de la solution. La solution d'alginate est injectée à débit constant, au travers une aiguille, grâce à une pompe à seringue. Les gouttes s'écoulant de l'aiguille tombent alors dans une solution d'ions divalents, dans notre cas, les ions Ca^{2+} d'une solution de CaCl_2 à 3 w/v %, et ce sous agitation constante. Les particules sont maintenues environ 15 minutes dans cette solution, puis sont nettoyées 3 fois avec de l'eau DI, et transférée dans de l'eau DI pendant 7 jours pour stabilisation.

Différentes particules sont synthétisées en modifiant les paramètres suivants : la taille de l'aiguille (longueur, diamètre intérieur), le type de la pointe de l'aiguille (pointe émoussée ou pointe biseautée), le débit d'écoulement de la solution d'alginate de la pompe à seringue et la viscosité de la solution d'alginate (i.e. sa concentration en alginate).

Afin de diminuer la taille des particules, plusieurs approches ont été considérées, tel qu'expliqué à la section 1.6.1. Deux des approches seront envisagées. La première, consistant en l'application d'un champ coaxial, présente quelques difficultés techniques, principalement par le fait que le système doit demeurer fermé pour éviter la présence d'oxygène qui affecte la polymérisation de l'hydrogel. Le gaz injecté de manière coaxiale doit donc être de l'azote, et doit être injecté par un tube passant au travers le septum fermant le système, et dans lequel est piquée l'aiguille par laquelle s'écoule la solution d'alginate (voir Figure 4.3). Cependant, même dans le cas d'un système ouvert, c'est-à-dire lors de la synthèse de particules d'alginate (sans PNIPA), le matériel ainsi que les installations disponibles au laboratoire ne permettent pas un contrôle fin du débit de gaz, ni un contrôle précis de la position de l'aiguille au travers du tube afin de mener des expériences reproductibles et d'obtenir des résultats satisfaisants. De plus, cette approche est limitée par le flux de gaz appliqué. En effet, afin d'obtenir des particules plus petites, le flux de gaz doit être augmenté. Cependant, lorsque celui-ci devient trop élevé, la solution est vaporisée et la distribution de taille devient très élevée. Aucun résultat reproductible n'a pu être obtenu par cette approche et elle est donc rejetée.

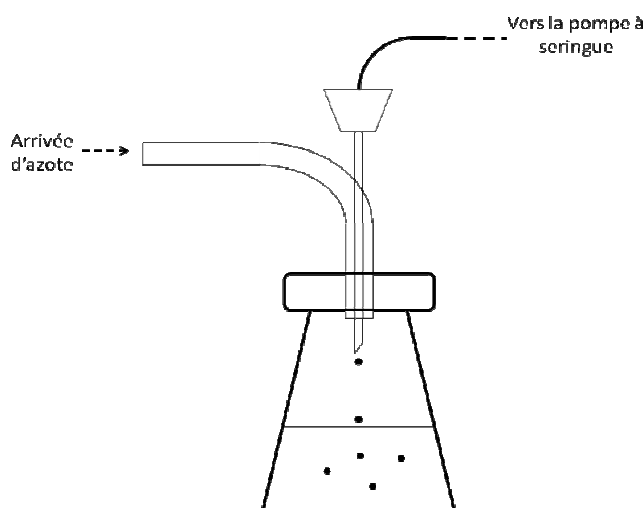


Figure 4.3: Synthèse de particules d'alginate avec flux d'air coaxial

La seconde approche testée consiste à appliquer un champ électrostatique entre la pointe de l'aiguille et la solution de CaCl_2 . Pour ce faire, un générateur de haut voltage est utilisé (Spellman, 230-30R High voltage Power Supply), et une électrode est placée dans la solution de

CaCl_2 . Dans le cas des tests de synthèse de particules d'alginate (sans PNIPA), le système n'a pas besoin d'être fermé. Ainsi, la solution de CaCl_2 est disposée dans un pétri, afin de facilement pouvoir ajuster les paramètres de synthèse. Du ruban de cuivre est collé au fond du pétri avec une extrémité dépassant de la solution par le côté afin d'être utilisé comme électrode négative, l'électrode positive étant l'aiguille par laquelle s'écoule la solution d'alginate. Le montage expérimental est illustré à la Figure 4.4. Les tests sont effectués avec des aiguilles à pointe émoussée, avec une distance solution-aiguille de 250 mm, et les paramètres modulés sont le débit (1 et 5 ml/h) et la viscosité de la solution d'alginate (0,8 et 1,75%), le diamètre intérieur de l'aiguille (100 et 250 μm) et le champ électrostatique appliqué (5 à 10 kV).

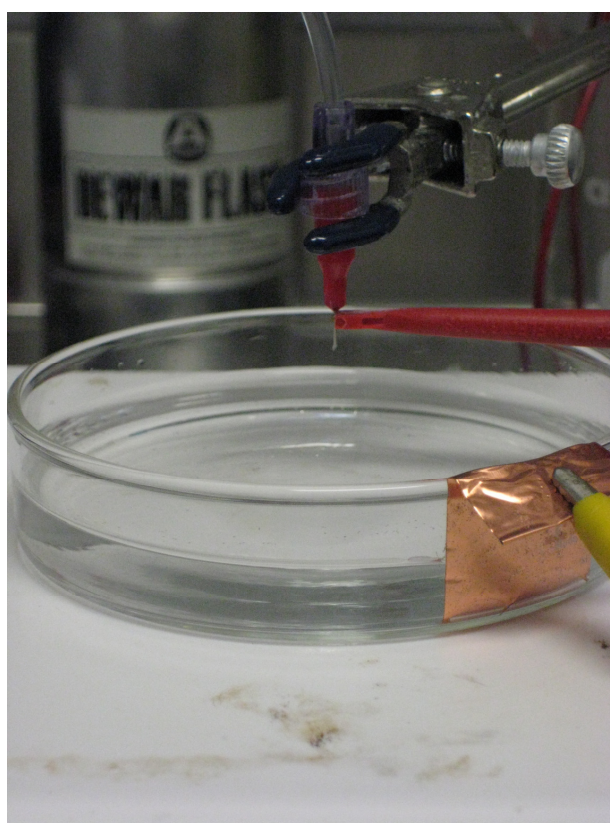


Figure 4.4: Montage expérimental pour la synthèse de particules d'alginate avec champ électrostatique

La distribution de taille des différentes particules obtenues est mesurée, dans le cas des particules de diamètre supérieur à 100 μm , à l'aide d'un appareil photo (Canon, Power Shot SD1000, 7.1 Méga Pixels) et en mesurant les particules (50 ou 100 particules mesurées) sur la photo à l'aide

du logiciel Matlab. Dans ce cas, un papier millimétré est disposé lors de la prise de chaque photo afin de calibrer l'échelle de la photo. Dans le cas où les particules sont trop petites pour être distinguées à l'aide de la caméra, un microscope (Zeiss AxioImager Z1m, objectif LD Epiplan 10x) est utilisé, et les images sont analysées directement avec le logiciel du microscope (Axio Vision LE). Les mesures sont prises sur au moins 50 particules par échantillon (et jusqu'à 100). Les distributions de taille sont déterminées à partir de ces mesures, et sont illustrées à l'aide du logiciel Excel de la suite Microsoft Office, en affichant un histogramme et une courbe cumulative des dimensions pour chaque échantillon.

4.2.2 Synthèse de particules alginate/PNIPA

Les particules de PNIPA sont préparées de la même manière que les particules d'alginate, mais en ajoutant les monomères de NIPA (0,8475 g), l'agent de réticulation (0,035 g) et l'accélérateur (56 µl) à 10 ml de la solution d'alginate. Dans le cas de la synthèse sans champ électrostatique appliqué, le système est fermé à l'aide d'une pellicule de paraffine. Cette solution est barbotée à l'azote pendant 30 minutes.

L'initiateur est quant à lui ajouté à la solution de CaCl_2 afin que le NIPA polymérise à l'intérieur des particules d'alginate. Ainsi, 0,15 g d'APS sont ajoutés à 15 ml de la solution de CaCl_2 , après que celle-ci ait également été barbotée avec de l'azote pendant 30 minutes. Le montage est schématisé à la Figure 4.5. Les particules sont laissées 24 h dans la solution de CaCl_2 /APS afin de laisser le temps à la réaction de polymérisation de se compléter. Les particules sont par la suite rincées 3 fois à l'EDI, puis immergées dans une solution d'EDTA pour 3 h afin de dissoudre l'alginate, et ainsi ne conserver que le PNIPA. La solution d'EDTA est obtenue à partir de 50 ml d'une solution tampon de phosphate (Sigma, Phosphate Buffer Powder, 3,8 L, 0,1 M) à laquelle on ajoute 1,46 g d'EDTA et 0,6 g de NaOH. Le NaOH est présent afin de stabiliser le pH, pour permettre à l'EDTA de se dissoudre, celui-ci ne pouvant être dissout dans une solution dont l'acidité est trop élevée.

Les particules sont ensuite rincées à nouveau à l'EDI, 3 fois, avant d'être immergées dans l'EDI pendant 7 jours afin de laisser le volume des particules stabiliser.

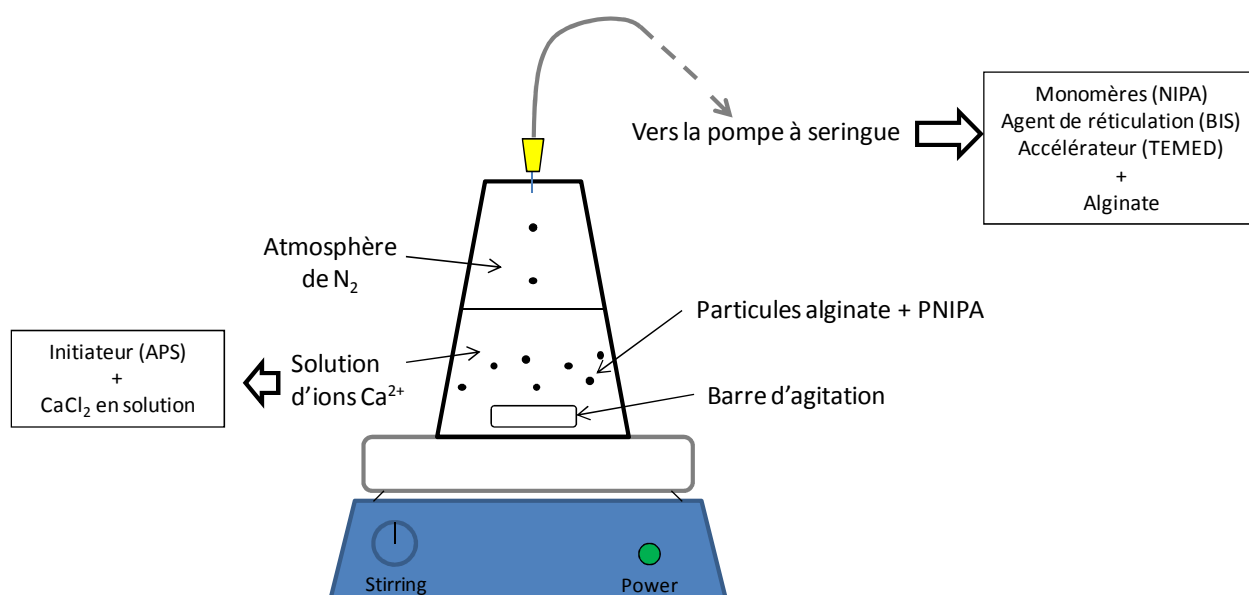


Figure 4.5: Montage de synthèse de particules d'alginate/PNIPA

Dans le cas de la synthèse avec champ électrostatique appliqué, un ballon de 5 ml ou de 10 ml est utilisé pour la solution de CaCl_2 /APS. Un fil en étain est disposé à l'intérieur de ce ballon, de manière à être en contact avec la solution et à dépasser du haut du col du ballon. Un septum est mis en place par-dessus, de manière à ce que le fil dépasse par le côté du col du ballon, et que l'on puisse le connecter à la borne négative de la source de haut voltage. L'aiguille par laquelle la solution d'alginate s'écoule traverse le septum et est connectée à la borne positive. Une barre d'agitation encore une fois disposée à l'intérieur du ballon (voir Figure 4.6).

Des particules sont également synthétisées avec de l'acide acrylique, préalablement distillée tel que décrit précédemment, à des concentrations variant de 0 à 10%, encore une fois par rapport à la concentration de monomères de NIPAA.

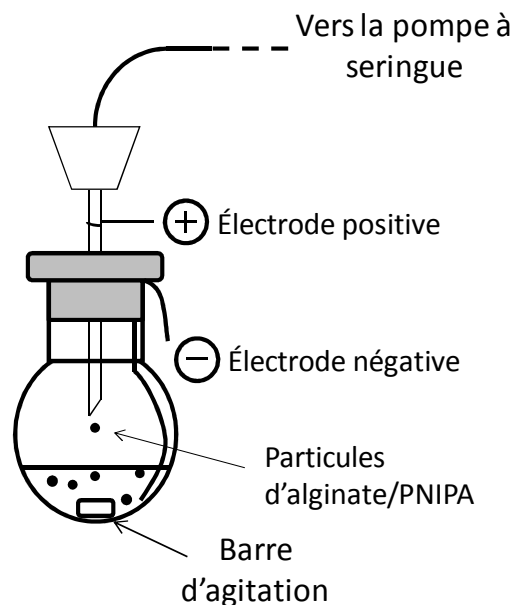


Figure 4.6: Synthèse de particules d'alginate/PNIPA avec application d'un champ électrostatique

4.2.3 Synthèse de particules alginate/PNIPA chargées de nanoparticules

De la même manière que précédemment, des particules de PNIPA sont synthétisées, mais cette fois en ajoutant différentes proportions d'une solution de nanoparticules magnétiques (fluidMAG-PAS, 100 mg/ml, Chemicell, GmbH, Germany) à la solution d'alginate. En raison de la faible quantité de solution de nanoparticules magnétiques disponibles relativement aux coûts élevés associés, des volumes de particules plus petits sont produits. Des échantillons de 1 ml, avec des concentrations de nanoparticules magnétiques de 50 mg/ml et 99 mg/ml sont donc synthétisés. Pour ce faire, une solution à 0,8 wt % d'alginate est préparée à partir de la solution de nanoparticules. Dans le cas de l'échantillon à 50 mg/ml, 0,5 ml de la solution de nanoparticules est utilisé, à laquelle 10 μ l de solution tampon de TRIS (1M) est ajoutée. Le volume est amené à 1 ml en ajoutant de l'EDI. Dans le cas de l'échantillon à 99 mg/ml, 0,99 ml de la solution de nanoparticules est utilisée, à laquelle 10 μ l de solution tampon de TRIS (1M) est ajouté. Le volume est donc de 1 ml, et la concentration réelle en nanoparticules est de 99 mg/ml. Les proportions habituelles de monomères, d'agent de réticulation, d'accélérateur sont ajoutées à la solution d'alginate et de nanoparticules. Afin de bien disperser les nanoparticules, la solution d'alginate et de nanoparticules est agitée à l'aide d'une sonde à ultrason, de manière intermittente

afin d'éviter de réchauffer la solution (Misonix Sonicator 4000, intensité 10%, 2 secondes ouvert – 1 seconde fermé, 4 minutes au total). La solution est par la suite barbotée à l'azote, de la même manière que précédemment. Le ballon est par la suite disposé dans un bain à ultrasons (Elmasonic S 10 H), afin de minimiser la quantité de bulle de gaz à l'intérieur de la solution. La synthèse des particules est effectuée avec et sans agitation magnétique.

4.3 Propriétés de l'hydrogel

L'étude des propriétés des hydrogels obtenus est effectuée, afin de bien comprendre le comportement de ce matériau et d'analyser s'il se prête bien à l'application à laquelle on le destine.

4.3.1 Hydrogel sous forme de volume

Changement de volume dans le temps

Le volume des hydrogels est mesuré indirectement par la mesure de leur masse. Comme le changement de volume des hydrogels est causé par l'évacuation de molécules d'eau, le lien entre la masse et le volume de l'hydrogel peut facilement être fait, considérant que la masse volumique de l'eau est de 1 g pour 1 ml. De plus, le fait d'effectuer des ratios de masse initiale versus masse finale annule le facteur correspondant à la masse volumique. Le résultat est donc le même, que l'on mesure la masse ou le volume. Les masses des échantillons sont donc mesurées en retirant rapidement l'hydrogel de l'eau et en l'épongeant délicatement à l'aide d'un papier absorbant, en le posant sur une nacelle se trouvant sur le plateau de la balance.

Pour connaître le temps nécessaire à la stabilisation des hydrogels avec la température, des tests de changement de volume dans le temps sont effectués. Les différents hydrogels sont plongés dans une solution préchauffée à une température supérieure au LCST ($T > 32^{\circ}\text{C}$). Pour ce faire, une plaque chauffante avec sonde de température permettant une rétroaction, afin d'assurer la stabilité de la température est utilisée. Comme la sonde de la plaque chauffante n'est pas parfaitement calibrée par rapport à la température affichée, une seconde sonde de température est insérée dans la solution afin de mesurer la température réelle de l'eau. La masse des hydrogels est mesurée, tel que décrit ci-haut, à différents intervalles de temps. Le montage expérimental est illustré à la Figure 4.7. Des courbes de l'évolution du volume en fonction du temps sont donc obtenues. Le temps requis à la stabilisation du volume peut donc être mesuré pour différentes

compositions d'hydrogels. Ces données sont par la suite utilisées pour justifier le temps de stabilisation utilisé pour les tests de changement de volume maximal et pour les tests de changement de volume en fonction de la température.

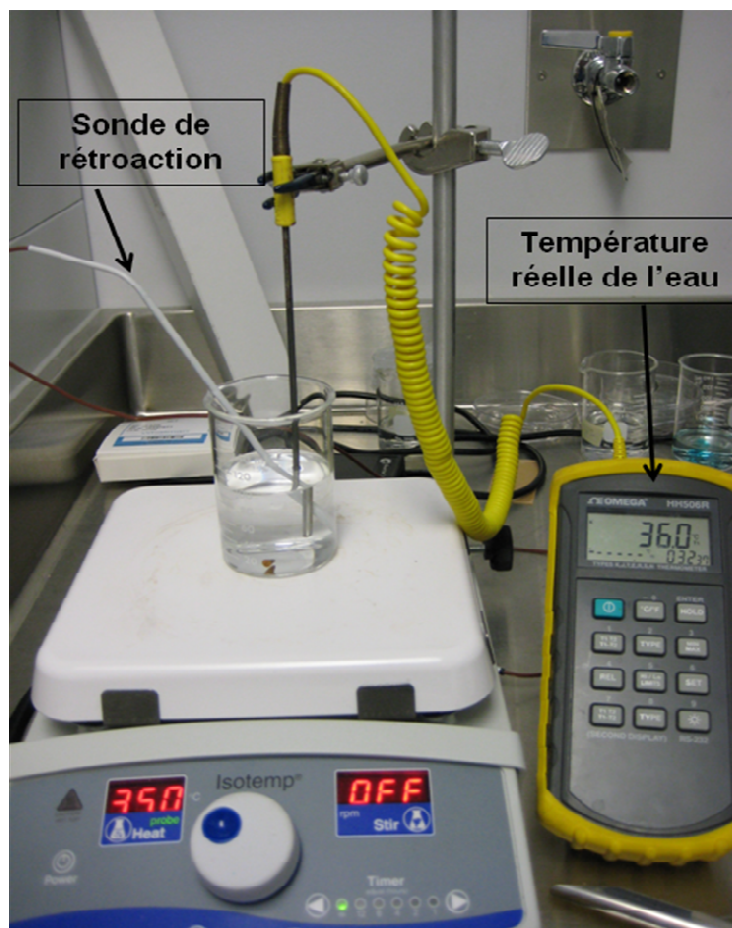


Figure 4.7: Montage expérimental pour l'étude des propriétés des différents échantillons d'hydrogel (synthèse simple)

Changement de volume maximal

Tel que nous verrons au Chapitre 5, aucun changement de volume significatif ne survient après 24 h de stabilisation. C'est donc cette valeur que nous utilisons pour les tests suivants. Le volume des hydrogels est mesuré, de la même manière que précédemment, après stabilisation à température ambiante et après 24 h à une température supérieure au LCST ($T = 36^{\circ}\text{C}$). De cette

manière, le ratio $V_{T>LCST}/V_{T<LCST}$ peut être obtenu, et le changement de volume maximal peut être mesuré sous forme de pourcentage, et comparé pour différentes compositions d'hydrogel.

Changement de volume en fonction de la température

Finalement des mesures du volume des hydrogels sont prises, à différentes températures, toujours après 24 h de stabilisation. Des courbes du volume en fonction de la température sont ainsi obtenues afin d'illustrer le comportement de transition du matériau.

Ces trois premiers tests sont également réalisés avec les échantillons d'hydrogels chargés de nanoparticules afin d'observer l'effet des nanoparticules sur le comportement du matériau. Les nanoparticules utilisées pour la synthèse étaient des nanoparticules de Fe_3O_4 , avec un revêtement de dextrane, avec une concentration finale dans l'hydrogel de 20 mg/ml, tel que mentionné précédemment.

Changement de volume en fonction de la concentration en agent de réticulation

Finalement, des tests de changement de volume en fonction de la température ont également été réalisés pour des échantillons avec différentes concentrations d'agent de réticulation (BIS). Des échantillons avec des concentrations de 1%, 1.5% et 2% ont été synthétisés, et testés de la même manière que précédemment, c'est-à-dire en mesurant leur masse après 24 h de stabilisation à chaque température.

4.3.2 Hydrogel sous forme de particules

Les tests relatifs au comportement de l'hydrogel avec la température sont effectués sur les particules d'hydrogel suffisamment grandes pour être observables à l'aide de l'appareil photo. Le volume des particules est calculé à partir de la mesure du diamètre, obtenue à l'aide du logiciel Matlab. On considère, pour le calcul du volume, que les particules sont sphériques, ce qui est une hypothèse raisonnable, confirmée lors de leur observation.

Des tests de changement de volume en fonction de la température et en fonction du temps sont réalisés sur les différents échantillons de particules synthétisées. Ces tests sont également effectués sur les particules chargées de nanoparticules magnétiques.

Les tests de changement de volume en fonction du temps permettent de déterminer le temps de stabilisation à chaque température. Comme nous le verrons plus loin, celui-ci n'est pas aussi

élevé que pour les hydrogels de volume plus grand, en raison du ratio surface-volume qui est plus élevé pour les particules, et 15 minutes sont suffisantes pour atteindre cette stabilisation.

Les tests sont donc effectués sur les différents échantillons, afin d'observer l'effet de la concentration en agent de réticulation, ainsi que l'effet de la concentration d'AAc sur la température de transition des particules de PNIPA.

4.4 Propriétés du microdispositif

Des tests préliminaires sont effectués afin d'évaluer la faisabilité d'un dispositif pour la livraison ciblée de médicament avec les particules de PNIPA chargées de nanoparticules magnétiques. Des tests de chauffage sont réalisés afin de voir si l'augmentation de température obtenue par des champs magnétiques alternatifs est suffisante pour atteindre la température de transition de l'hydrogel, et ainsi, déclencher le mécanisme de libération une fois les particules injectées dans la circulation. Cette augmentation de température est dépendante de la concentration en nanoparticules ainsi que de la fréquence et de l'intensité du champ magnétique alternatif appliqué.

4.4.1 Propriétés des nanoparticules magnétiques

Les nanoparticules utilisées pour la synthèse de ces particules d'hydrogels sont imagées à l'aide d'un MET (Microscope Électronique en Transmission, Jeol JEM-2100F) afin de déterminer leur taille et leur distribution de taille. Une distribution de taille uniforme permettra une meilleure efficacité de la génération de chaleur, dans le cas de la relaxation de Néel, τ_n étant dépendant du volume des particules (c.f. section 2.2). Leur courbe d'hystérésis est obtenue à l'aide d'un VSM (Vibrating Sample Magnetometer, EV5, Magnetics) afin de caractériser leur comportement magnétique.

4.4.2 Chauffage par champ magnétique alternatif

Les tests sont faits conformément à la procédure établie par Tabatabaei et al. [5] La bobine utilisée pour établir le champ magnétique est une bobine de 67 mm de diamètre, avec $N = 3$ spires. Le champ magnétique créé (2 kW HotShot Induction Amplifier, Ameritherm USA), au centre de la bobine, avec un courant de $I = 200,2$ A est donc de 8,96 kA/m, et la fréquence est fixée à 154 kHz.

$$H = \frac{B}{\mu_0} = \frac{nI}{2R} = \frac{3 \times 200,2}{67 \times 10^{-3}} = 8,96 \text{ kA/m} \quad (4)$$

Le même champ magnétique alternatif est appliqué à tous les échantillons, pendant 15 ou 30 minutes, de manière à observer seulement l'effet de la concentration de nanoparticules. Pour ce faire, les échantillons de particules sont préparés en mettant 0,5 ml de particules dans un flacon de 2 ml, et en ajoutant de l'EDI pour atteindre un volume de 1 ml. Le flacon est placé dans un bain d'huile (silicone oil, Fisher Scientific) afin de minimiser les variations de température extérieure. La température à l'intérieur de l'échantillon ainsi que dans le bain d'huile est mesurée à intervalle régulier et enregistrée, à l'aide d'un dispositif à fibre optique (Reflex, SN: T18 217A, Neoptix[®] Inc, Canada). Le couvercle de chaque flacon est préalablement percé afin de pouvoir y insérer la fibre optique, pour la mesure de la température. Des courbes de la température en fonction du temps sont ainsi obtenues.

CHAPITRE 5 RÉSULTATS ET DISCUSSION

Dans ce chapitre, nous exposons et discutons des résultats obtenus suite aux manipulations décrites au chapitre précédent.

5.1 Synthèse de l'hydrogel

La Figure 5.1 illustre un hydrogel stabilisé, synthétisé dans un flacon de 1.5 ml, chargé d'une concentration de 20 mg/ml de nanoparticules ferromagnétiques. La forme conique de l'hydrogel est due à la forme du flacon dans lequel la polymérisation a lieu.



Figure 5.1: Hydrogel synthétisé chargé de nanoparticules magnétiques

5.2 Synthèse de particules d'hydrogel

Tel que décrit au chapitre précédent, la technique de synthèse de particules est d'abord mise au point par la synthèse de particules d'alginate. Le PNIPA est par la suite intégré à cette technique de synthèse en optimisant les paramètres afin d'obtenir des particules possédant les propriétés désirées.

5.2.1 Synthèse de particules d'alginate

Des particules d'alginate illustrées à la Figure 5.2 sont synthétisées à l'aide de la technique décrite à la section 4.2.1.

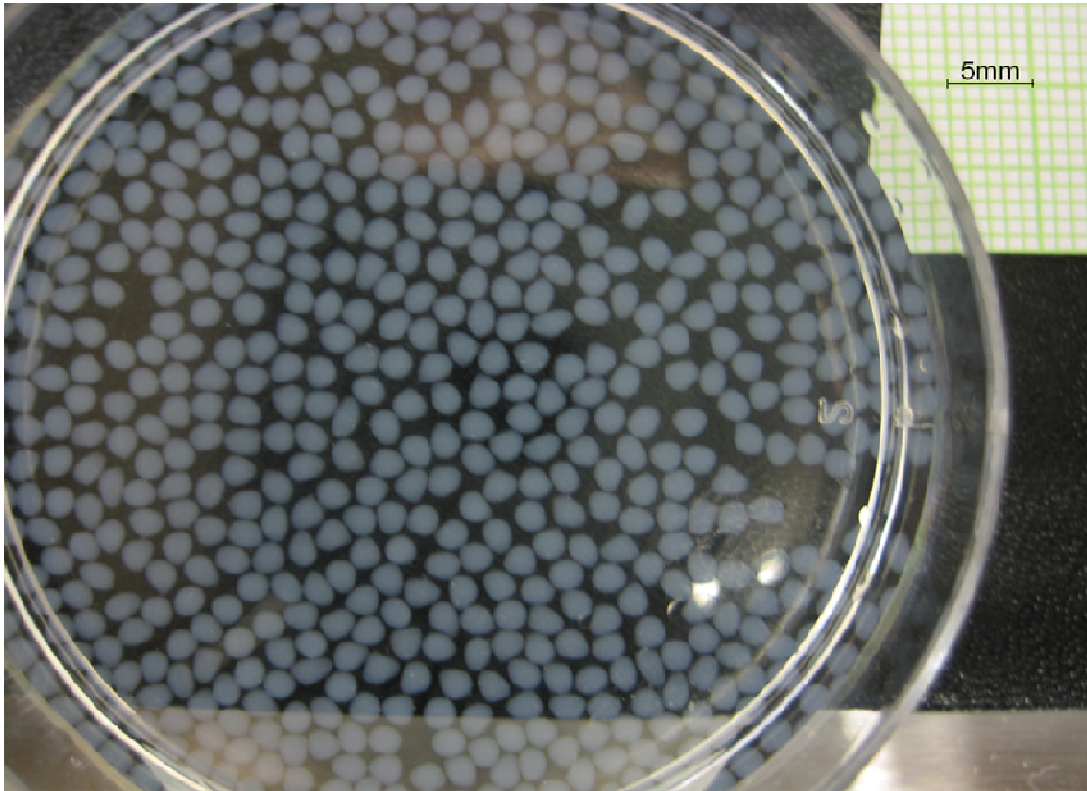


Figure 5.2: Illustration des particules d'alginate synthétisées

Une fois la technique de synthèse de particules d'alginate mise au point, différentes stratégies visant à diminuer la taille des particules sont testées. Ces tests sont réalisés avec une solution composée uniquement d'alginate, pour bien parvenir à maîtriser les paramètres de synthèse et leur influence sur la taille et la forme des particules obtenues.

Ainsi, différents échantillons sont synthétisés en modifiant les paramètres suivants:

- Voltage appliqué: 5, 7,5 et 10 kV
- Débit de la solution d'alginate: 1 et 5 ml/h
- Diamètre intérieur de l'aiguille utilisée : 100 et 250 μm (25G et 32G)
- Concentration d'alginate (viscosité de la solution): 0,8% et 1,75%

Des distributions de taille telles que celles illustrées à la Figure 5.3 sont obtenues.

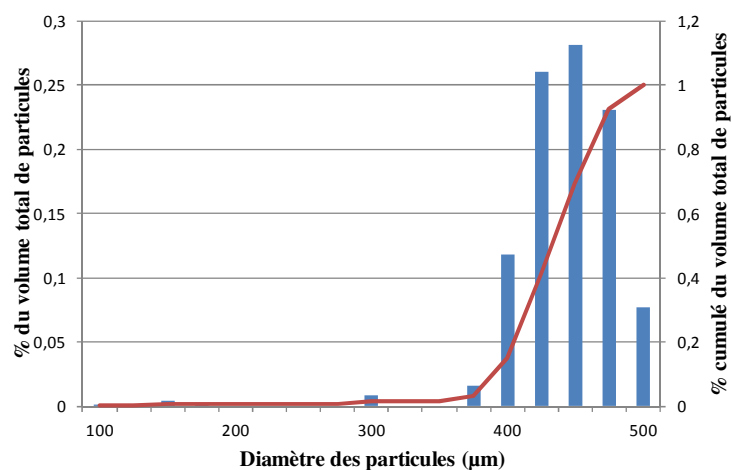


Figure 5.3: Distribution de taille des particules d'alginate synthétisées avec 1.75% d'alginate, selon un débit de 5 ml/h, avec une aiguille 25G et avec un voltage appliqué de 5 kV

Dans certain cas, deux diamètres différents sont obtenus au cours de la même synthèse et sont illustrés à la Figure 5.4, par la présence de 2 pics sur l'histogramme, le premier autour de 275 µm et le second autour de 410 µm.

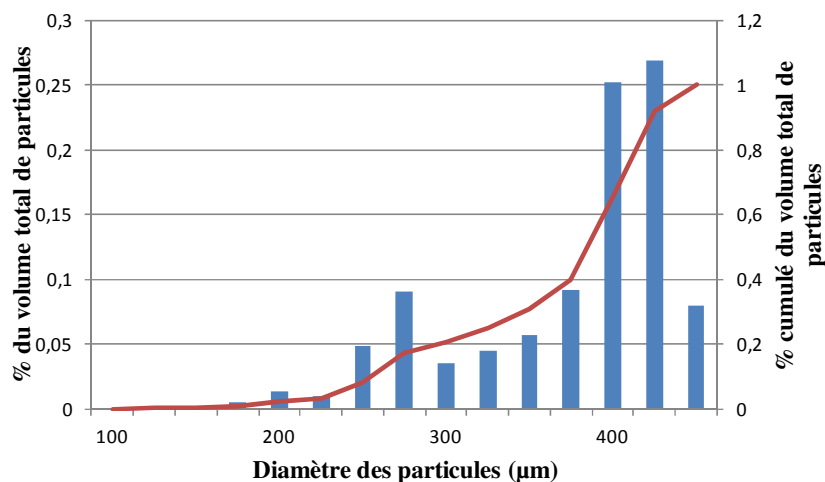


Figure 5.4: Distribution de taille des particules d'alginate synthétisées avec 1,75% d'alginate, selon un débit de 5 ml/h, avec une aiguille 25G et avec un voltage appliqué de 7,5 kV

On observe que plus le voltage appliqué est élevé, plus les particules sont petites. En revanche, lorsque le champ électrostatique est trop fort, l'apparition d'un 2^e pic apparaît, et à l'extrême, les particules sont vaporisées et la distribution de taille des particules devient très grande. Aucune donnée reproductible ne peut donc être obtenue avec notre montage lorsque le champ électrostatique est supérieur à 10 kV. De plus, lorsque nous excédons cette valeur, des décharges surviennent, qui se manifestent par l'apparition d'un arc électrique entre les deux électrodes. Ces décharges, appelées décharges corona, compromettent la polymérisation de l'hydrogel.

Les données obtenues au Tableau 5.1, au Tableau 5.2 et au Tableau 5.3 montrent que moins le diamètre de l'aiguille est élevé et que moins la solution d'alginate est visqueuse, plus le diamètre des particules obtenues est réduit. Les valeurs de s correspondent aux écarts-types.

Tableau 5.1: Diamètres et écarts types des particules d'alginate obtenues en modifiant la valeur du champ électrostatique appliqué, avec un débit de la solution d'alginate de 5 ml/h

Voltage appliqué (kV)	Diamètre intérieur de l'aiguille (mm)	Concentration d'alginate (%)	Débit de la solution d'alginate (ml/h)	1er pic		2e pic	
				d1 (um)	s1	d2 (um)	s2
5	0,25	1,75	5	428,4	28,5	140,3	54,6
5	0,25	1,75	5	399,4	41,1	-	-
7,5	0,25	1,75	5	300,8	88,4	-	-
7,5	0,25	1,75	5	224,9	102,4	-	-
10	0,25	1,75	5	232,9	7,6	71,8	7,0
10	0,25	1,75	5	225,9	7,2	-	-

Tableau 5.2: Diamètres et écarts types des particules d'alginate obtenues en modifiant la valeur du champ électrostatique appliqué, avec un débit de la solution d'alginate de 1 ml/h

Voltage appliqué (kV)	Diamètre intérieur de l'aiguille (mm)	Concentration d'alginate (%)	Débit de la solution d'alginate (ml/h)	1er pic		2e pic	
				d1 (um)	s1	d2 (um)	s2
5	0,25	1,75	1	380,8	27,0	-	-
5	0,25	1,75	1	378,8	35,1	-	-
10	0,25	1,75	1	-	-	206,9	19,2
10	0,25	1,75	1	172,5	12	212,8	7,3

Le Tableau 5.3 démontre également la reproductibilité et l'uniformité des résultats. En effet, les trois synthèses ont été effectuées dans les mêmes conditions, c'est-à-dire avec un voltage appliqué de 5 kV, une aiguille de 0,1 mm de diamètre intérieur, une concentration d'alginate de 0,8% et un débit de la solution d'alginate de 5 ml/h. En plus d'être reproductibles, ces résultats démontrent qu'il est possible d'obtenir des particules possédant un diamètre se trouvant dans l'intervalle souhaité pour l'application de microdispositif, c'est-à-dire autour de 100 μm (Figure 5.5).

Tableau 5.3: Diamètres et écarts types de particules obtenues pour 3 synthèses effectuées dans les mêmes conditions

Voltage appliqué (kV)	Diamètre intérieur de l'aiguille (mm)	Concentration d'alginate (%)	Débit de la solution d'alginate (ml/h)	d1 (μm)	s1
5	0,1	0,8	5	89,3	5,4
5	0,1	0,8	5	91,0	4,8
5	0,1	0,8	5	87,7	7,3

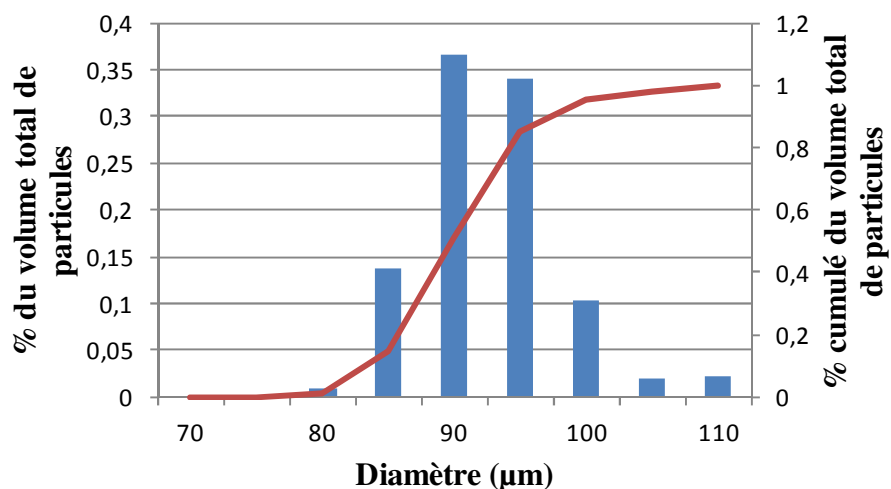


Figure 5.5: Distribution de taille des particules synthétisées avec 0,8% d'alginate, selon un débit de 5 ml/h, avec une aiguille de 100 μm et avec un voltage appliqué de 5 kV

5.2.2 Synthèse de particules de PNIPA

Des essais de synthèse de particules de PNIPA sont à présent réalisés tel que décrit à la section 4.2.2. Le diamètre des particules obtenues varie entre 1 et 2 mm, et est trop élevé pour notre application. Des contraintes techniques liées au fait que le système doit être fermé nous empêchent d'obtenir des particules aussi petites que celles obtenues à l'étape précédente. Comme nous l'expliquerons plus loin, il pourrait être possible d'utiliser un montage ouvert à l'intérieur d'une chambre anaérobie. Ceci permettra d'obtenir des particules de taille comparable aux particules d'alginate obtenues, soit des particules d'environ 100 μm .

Néanmoins, ces essais permettent de mettre au point le montage expérimental. La Figure 5.6 et la Figure 5.7 illustrent bien les particules obtenues par ces premiers essais. On observe une uniformité de taille et de forme. La Figure 5.8 quant à elle, illustre l'effet de la concentration en agent de réticulation ainsi que l'effet du diamètre intérieur de l'aiguille utilisée sur le diamètre des particules obtenues.

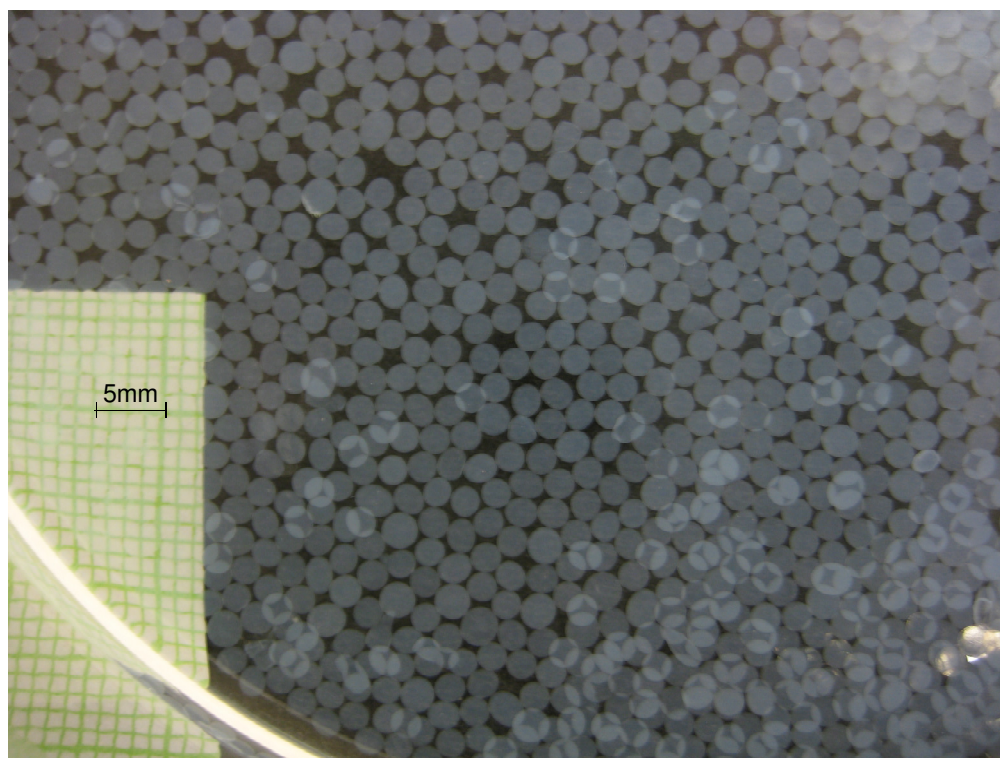


Figure 5.6: Illustration des particules de PNIPA synthétisées

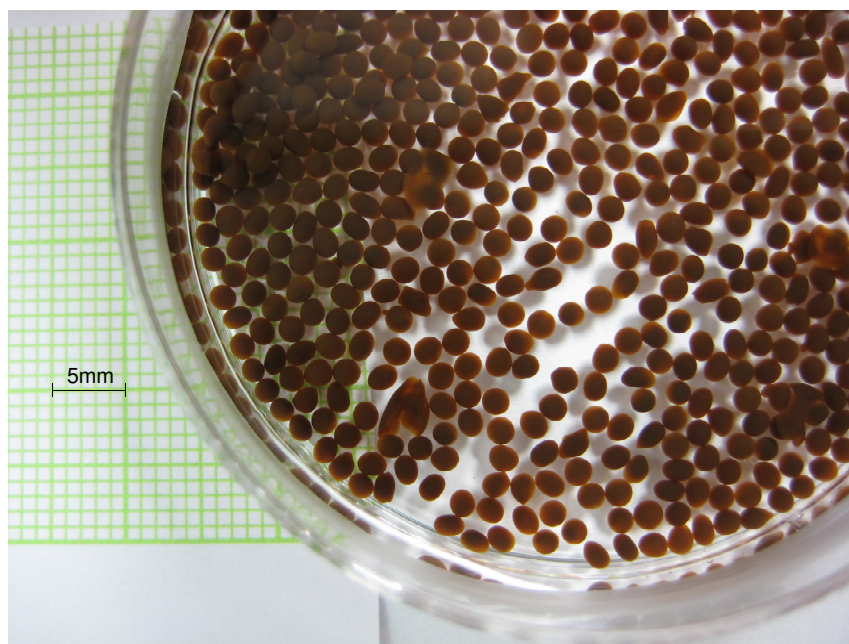


Figure 5.7: Illustration des particules synthétisées chargées de nanoparticules magnétiques

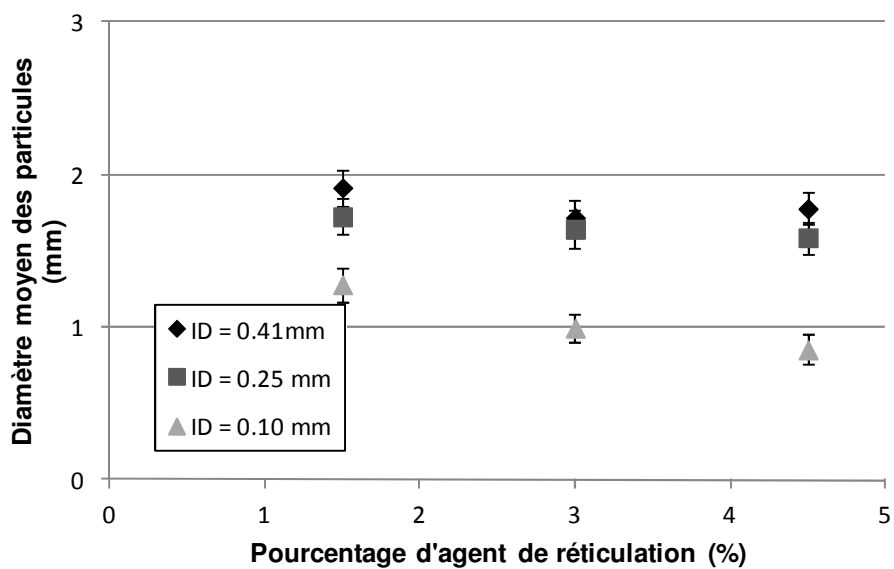


Figure 5.8: Diamètres des particules obtenus en fonction de la concentration en agent de réticulation, et pour différents diamètres intérieurs d'aiguilles, avec 1.75% d'alginate et un débit de seringue de 3 ml/h

Le diamètre des particules progresse inversement à la concentration en agent de réticulation, et de manière plus significative, relativement au diamètre intérieur de l'aiguille utilisée. Un facteur limitant est cependant la taille minimale des aiguilles qu'il est possible de trouver sur le marché, dans ce cas, des aiguilles de 32G, c'est-à-dire avec un diamètre intérieur de 0,10 mm.

Des essais sont également réalisés en diminuant le pourcentage d'alginate de la solution, c'est-à-dire en diminuant la viscosité. Des résultats insatisfaisants sont obtenus car comme on peut l'observer à la Figure 5.9, les particules d'alginate synthétisées sont de forme très irrégulière.

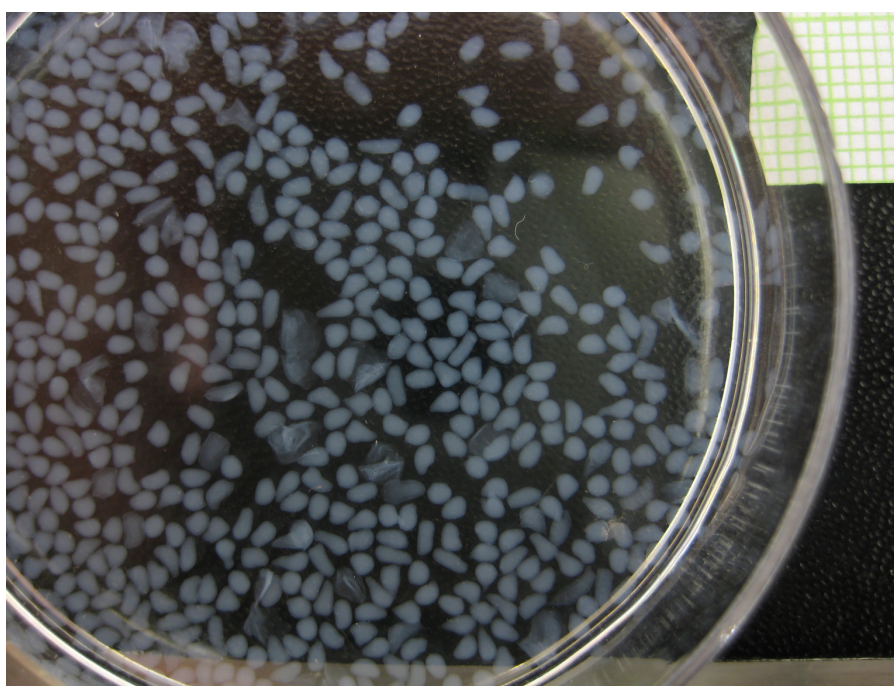


Figure 5.9: Particules synthétisée avec 0,8% d'alginate

L'utilisation d'un ballon de 5 ou de 10 ml pour la synthèse de particules d'hydrogel avec l'application d'un champ électrostatique diminue beaucoup la quantité de particules produites par synthèse. Moins de particules sont donc disponibles pour leur caractérisation. C'est pour cette raison que les particules de diamètre plus élevé, telles que celles de la Figure 5.6, sont utilisées.

De plus, les aiguilles utilisées pour la synthèse de particules d'alginate sont trop courtes pour le montage. Les aiguilles de 32G (diamètre intérieur de 100 μm) d'une longueur supérieure à 0,5 pouce n'étaient pas disponibles sur le marché au moment des expériences. Les hydrogels ont

donc dû être synthétisés avec des aiguilles plus longues (1 pouce), et de diamètres intérieurs plus grands (250 μm).

5.2.3 Synthèse de particules de PNIPA chargées de nanoparticules

Finalement, des particules d'hydrogel sont synthétisées avec différentes concentrations de nanoparticules. Des problèmes apparaissent lorsque les concentrations de nanoparticules sont plus élevées (100 mg/ml). Celles-ci sont alors beaucoup plus difficiles à disperser dans la solution d'alginate. Une sonde à ultrasons est utilisée afin de bien dissoudre tous les composés dans la solution d'alginate. La solution obtenue est très visqueuse et beaucoup de pertes ont lieu sur les parois des flacons. Un autre problème est que l'agitateur magnétique utilisé normalement ne peut pas être utilisé de la même manière. Les particules étant attirées par l'agitateur, celui-ci doit être secoué pour détacher les particules, ce qui les abîme. Dans le cas où la synthèse est faite sans l'agitateur, l'absence de mouvement dans la solution conduit à l'agglomération et à la coalescence des particules entre elles. Somme toute, en retirant les particules irrégulières, abimées, ou celles s'étant agglomérées, il ne reste que très peu de particules exploitables à la fin du procédé. Il a néanmoins été possible d'obtenir assez de particules pour pouvoir effectuer des tests de chauffage, comme nous le verrons à la section 5.4.2.

5.3 Propriétés de l'hydrogel

Des tests de caractérisation sont effectués afin d'étudier le comportement du matériau, autant pour l'hydrogel synthétisé sous forme de volume (synthèse simple) que sous forme de particules.

5.3.1 Synthèse simple

Dans le cas de la synthèse simple, les effets de la température, de la masse initiale et de la concentration en agent de réticulation sur le changement de volume, ainsi que sur le temps de réaction ont été observés. Les effets de la présence de nanoparticules magnétiques et de la concentration en AAc sur le comportement du matériau ont également été étudiés.

La Figure 5.10 illustre le comportement général du PNIPA dans le temps lorsque celui-ci passe de la température ambiante ($\sim 23^\circ\text{C}$) à une température au dessus de sa LCST (37°C).

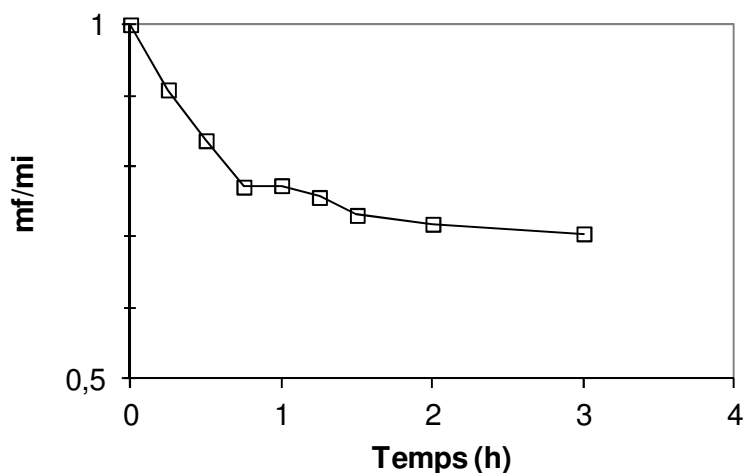


Figure 5.10: Comportement de l'hydrogel lorsque $T > LCST$. ($m_i = 1,62$ g)

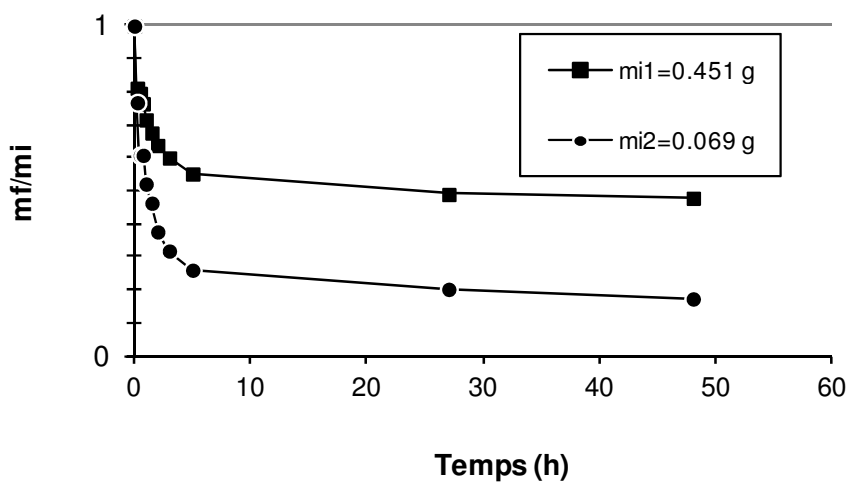


Figure 5.11: Diminution de masse dans le temps, de 2 échantillons, avec 2 masses initiales différentes

La Figure 5.11 illustre quant à elle le comportement en fonction du temps, à une température de 37°C , pour 2 hydrogels de 2 tailles initiales différentes. On peut donc observer que plus la masse initiale est faible, plus le changement de volume est important. En revanche, on peut observer que le temps de réaction n'est pas significativement affecté

par la masse initiale. Cette courbe nous permet de déterminer le temps nécessaire à la stabilisation de l'hydrogel avec la température, afin d'obtenir une courbe du changement de volume en fonction de la température. En effet, aucun changement de volume significatif ne survient après 24h de stabilisation.

C'est donc en laissant les échantillons stabiliser pendant 24h à chacune des températures que les courbes illustrant le changement de volume en fonction de la température ont été obtenues.

La Figure 5.12 illustre bien le comportement général du changement de volume en fonction de la température du PNIPA. La température de transition est clairement mise en évidence, et survient autour de 34°C. La concentration en agent de réticulation (BIS) n'influence pas ce comportement comme on peut le voir à la Figure 5.13.

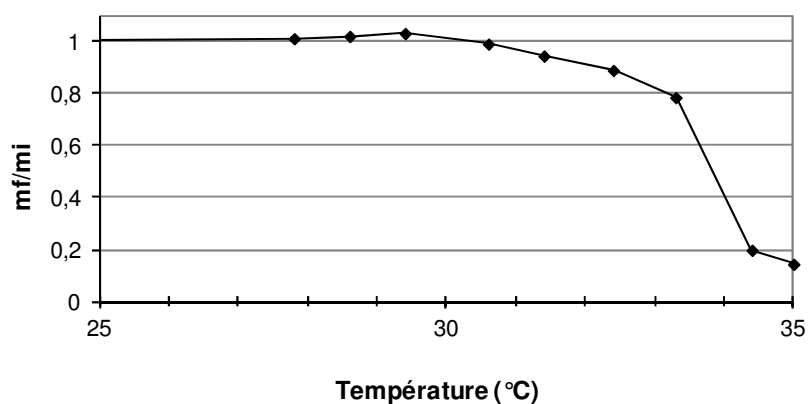


Figure 5.12: Comportement général du volume d'un échantillon de 0.54 g PNIPA chargé de nanoparticules avec la température

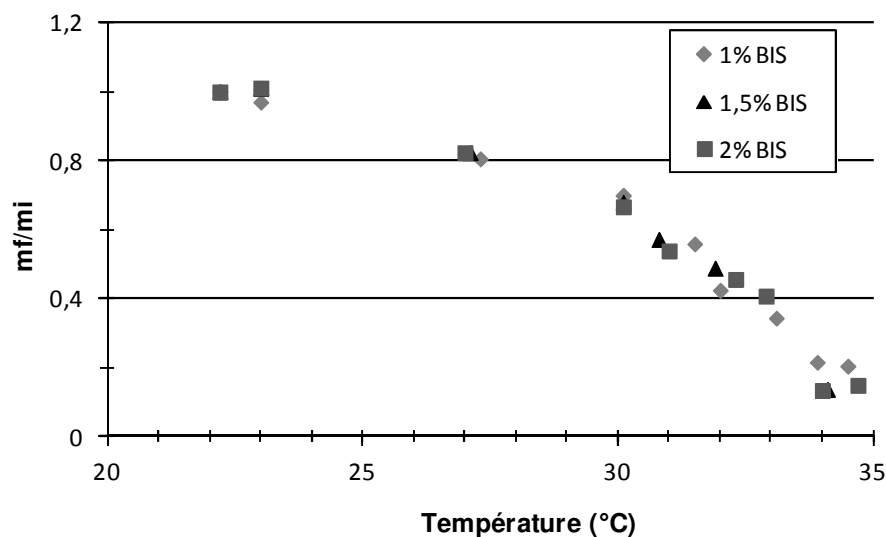


Figure 5.13: Changement de volume du PNIPA en fonction de la température, pour différentes concentrations de BIS

Enfin, la Figure 5.14 illustre la différence de comportement entre un échantillon synthétisé avec et sans nanoparticules magnétiques. La Figure 5.15 illustre l'hydrogel en question, avant et après la transition. On observe que la transition survient beaucoup plus rapidement pour l'échantillon chargé de nanoparticules. L'évacuation des molécules d'eau est donc beaucoup plus efficace pour ce type d'échantillon, probablement en raison de la structure interne de l'hydrogel qui serait modifiée en présence des nanoparticules.

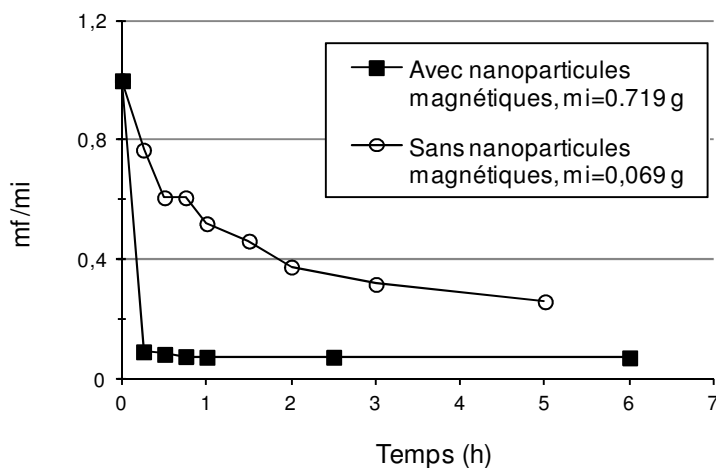


Figure 5.14: Changement de volume en fonction du temps, avec et sans nanoparticules magnétiques



Figure 5.15: Photo de l'hydrogel chargé de nanoparticules, après stabilisation à $T = 23^{\circ}\text{C}$ ($T < \text{LCST}$) et à $T = 37^{\circ}\text{C}$ ($T > \text{LCST}$).

5.3.2 Synthèse de particules

Les mêmes types de tests sont effectués sur les hydrogels synthétisés sous forme de particules, cette fois en mesurant le diamètre des particules, et en calculant le volume à partir de ces mesures. La Figure 5.16 illustre le changement de volume en fonction de la température, pour deux échantillons de particules d'hydrogel, un avec et l'autre sans nanoparticules. La différence

entre les deux courbes est négligeable et la température ainsi que le rythme de transition demeurent les mêmes pour les deux échantillons, contrairement aux résultats obtenus précédemment, avec l'hydrogel sous forme de volume (cf. Figure 5.14).

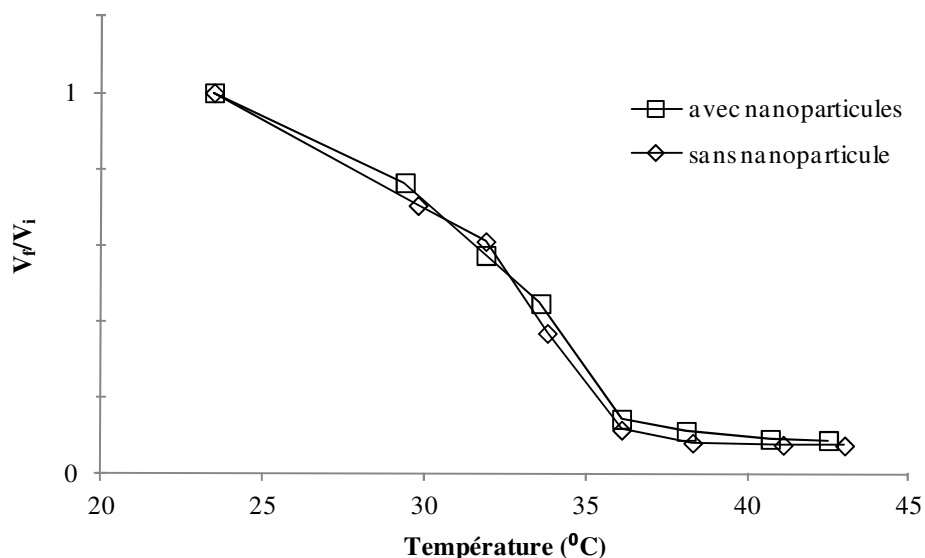


Figure 5.16: Illustration de la diminution de volume des particules de PNIPA autour de la température de transition

La Figure 5.17 montre l'effet de la concentration en agent de réticulation sur le changement de volume des hydrogels. Plus cette concentration est faible, plus le changement de volume est important. On observe également que le temps de stabilisation est plus court comparativement au temps de stabilisation observés précédemment pour les hydrogels sous forme de volume. En effet, 15 minutes sont nécessaires à la stabilisation des particules de 1.5 à 2 mm de diamètre, par rapport aux 24 h nécessaires pour les hydrogels de la section 5.3.1.

Finalement, la Figure 5.18 met en évidence l'augmentation de la température de transition (LCST) à mesure que la concentration en AAc augmente. La concentration d'AAc est relative à la concentration molaire de monomères de NIPA. La température de l'hydrogel synthétisé sans AAc est, tel qu'observé précédemment, autour de 34°C. Celle-ci peut monter au dessus de 45°C pour des concentrations de plus de 5%. On observe cependant qu'à des concentrations plus

élevées (ici, 10%) la transition s'échelonne sur une plus grande plage de température, ce qui n'est pas souhaitable pour notre application de microdispositif.

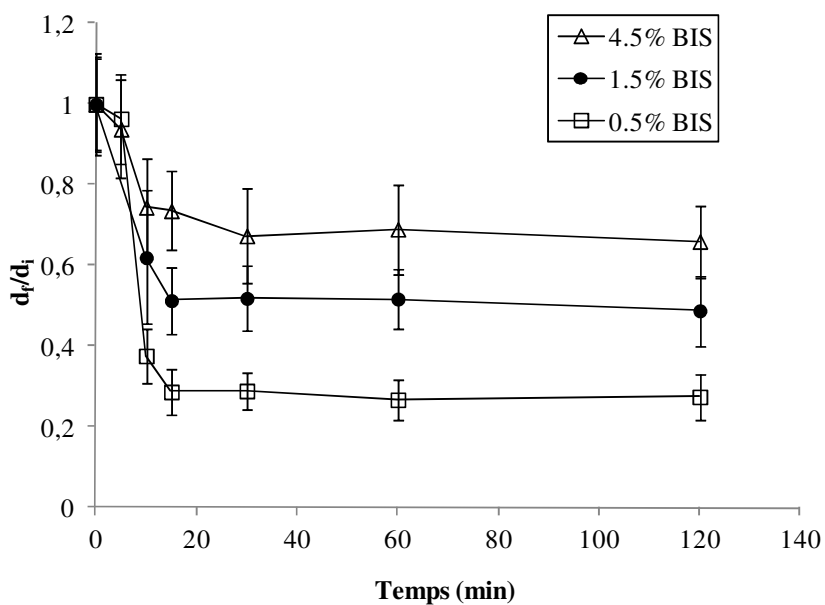


Figure 5.17: Changement de volume en fonction du temps pour des particules ayant différentes concentrations en agent de réticulation

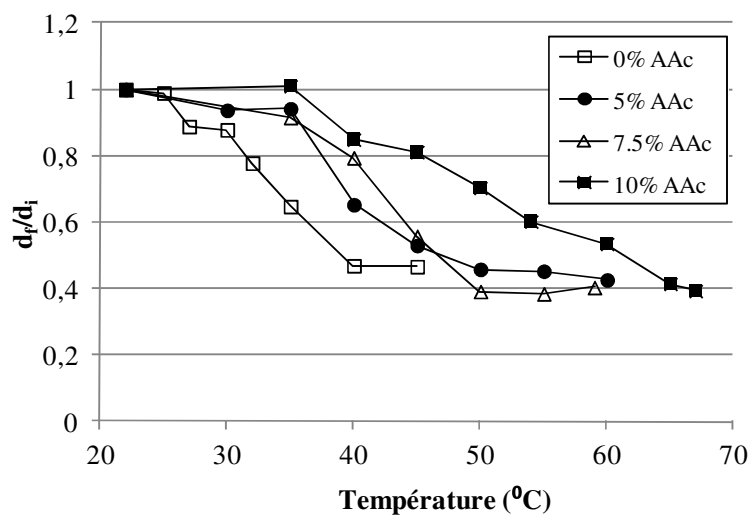


Figure 5.18: Changement de volume en fonction de la température, pour des hydrogels possédant différentes concentrations de AAc

5.4 Propriétés du microdispositif

Des tests relatifs à l'utilisation des particules d'hydrogel chargées de nanoparticules comme microdispositifs sont finalement réalisés. On commence par l'étude des propriétés des nanoparticules utilisées, puis on poursuit par l'étude des capacités de chauffage intrinsèque de ces particules par l'application de champs magnétiques alternatifs.

5.4.1 Propriétés des nanoparticules magnétiques

Les tests VSM (Vibrating Sample Magnetometer) effectués, illustrés à la Figure 5.19, démontrent clairement l'absence d'hystérésis des nanoparticules, et suggèrent leur nature superparamagnétique. De plus, les images provenant du MET (Microscope Électronique à Transmission) (Figure 5.20) démontrent que le diamètre des particules est compris entre 5 et 15 nm.

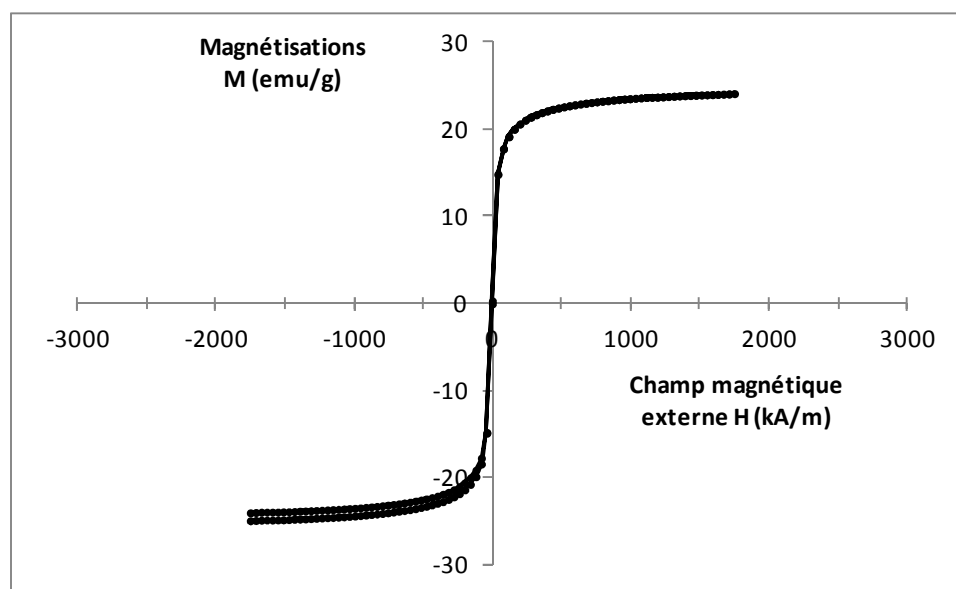


Figure 5.19: Résultats obtenus de l'analyse VSM des nanoparticules magnétiques isolées

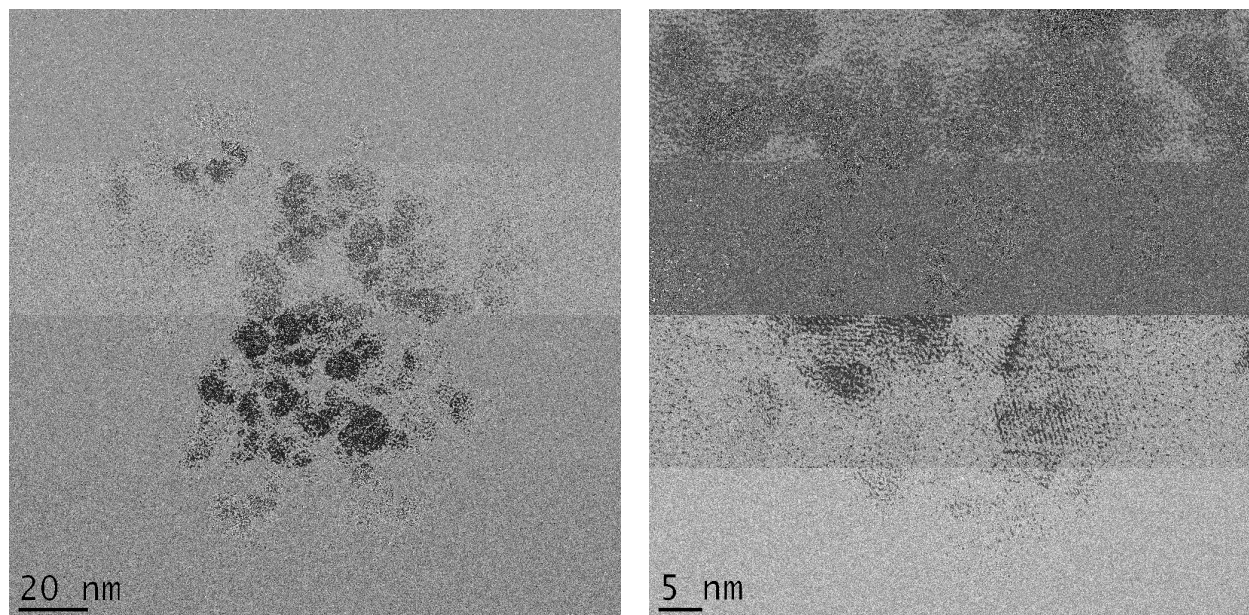


Figure 5.20: Images MET des nanoparticules avec revêtement de PAS

5.4.2 Chauffage par champs magnétiques alternatifs

Les tests de chauffage ont été effectués sur les échantillons de particules d'hydrogel chargées de nanoparticules avec revêtement de PAS, à des concentrations de 50 et 99 mg/ml. Le champ magnétique a été appliqué pendant 30 minutes. Les augmentations de température obtenues, après 15 et 30 minutes, pour les différents échantillons sont répertoriés dans le Tableau 5.4. Ces augmentations de température représentent la valeur moyenne sur les différents tests effectués. La Figure 5.21 et la Figure 5.22 illustrent quant à elles le changement de température dans le temps pour les 30 minutes au cours desquelles les champs sont appliqués. Les courbes identifiées « milieu » correspondent à la température du bain d'huile servant à stabiliser la température du milieu environnant. La légère augmentation de température observée correspond au transfert de chaleur qui survient entre les particules et le milieu.

Tableau 5.4: Augmentation de la température moyenne des échantillons de particules d'hydrogel chargées de nanoparticules magnétiques

Concentration de nanoparticules (mg/ml)	Temps d'application du champ magnétique (min)	
	15	30
50	$4 \pm 0,6$	$7,2 \pm 0,6$
99	$6 \pm 0,7$	$8,7 \pm 0,6$

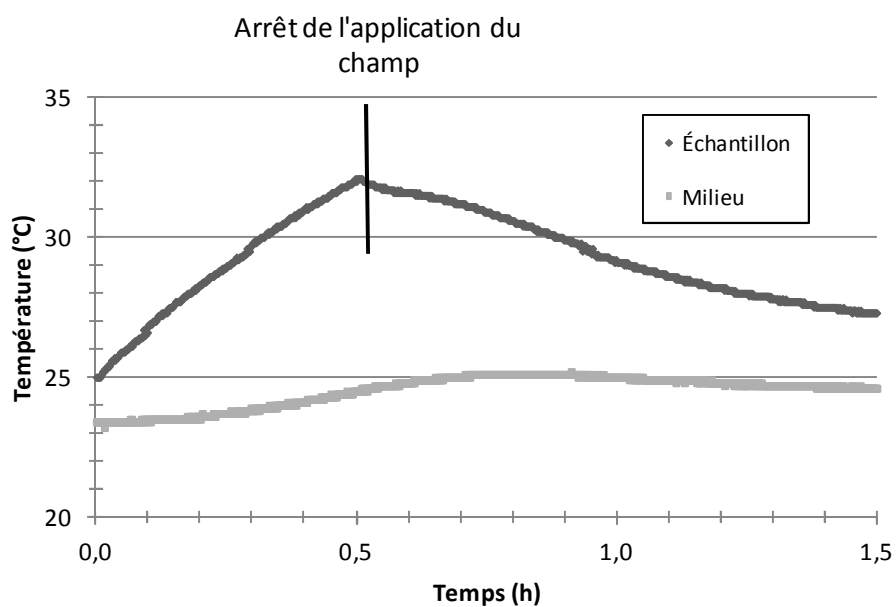


Figure 5.21: Augmentation de la température des particules d'hydrogel chargées de nanoparticules magnétiques à une concentration de 50 mg/ml, sous un champ magnétique alternatif de 9 kA/m, $f = 154$ Hz appliqué pendant 30 minutes.

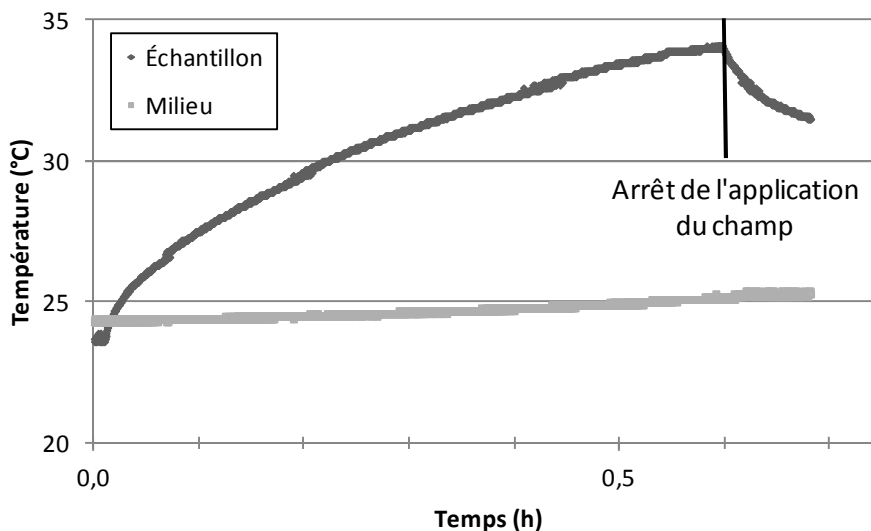


Figure 5.22: Augmentation de la température des particules d'hydrogel chargées de nanoparticules magnétiques à une concentration de 99 mg/ml, sous un champ magnétique alternatif de 9 kA/m, $f = 154$ Hz appliqué pendant 30 minutes.

5.5 Discussion

Les tests effectués ont comme objectifs de valider la possibilité de charger des hydrogels de PNIPA avec des nanoparticules ferromagnétiques afin de les utiliser pour livrer localement un agent thérapeutique à un endroit spécifique, par exemple pour le ciblage d'une tumeur. Nous voyons donc dans ce chapitre comment ces résultats peuvent influencer la faisabilité de cette application.

5.5.1 Synthèse et propriétés de l'hydrogel de PNIPA

La première étape du projet vise à synthétiser et à caractériser le PNIPA afin d'étudier le potentiel de ce matériau.

Il a été difficile au départ d'obtenir la gélification des hydrogels. Ces problèmes sont liés à des fuites d'air dans le système, et donc à la présence d'oxygène résiduel dans la solution, celui-ci compromettant la polymérisation du PNIPA. Cet oxygène peut effectivement s'introduire dans la solution au moment du transfert dans les flacons, après le barbotage avec l'azote. Les

échantillons sont donc transférés le plus rapidement possible, et en refermant immédiatement les flacons. Une fois ce problème résolu, les hydrogels synthétisés sont bien polymérisés, et ont la forme des flacons dans lesquels ils ont été polymérisés, tel qu'on le voit à la Figure 5.1.

Les hydrogels synthétisés sous forme de volume ont ensuite été caractérisés afin d'étudier leur potentiel d'utilisation comme vecteur thérapeutique. L'objectif est d'observer le comportement général du matériau avec les changements de température, comme on l'a vu à la section 1.1, avant de développer une technique de synthèse de ce même matériau sous forme de particules.

Il est confirmé qu'un changement discontinu de volume survient autour d'une température de transition se situant à environ 34°C. Cette transition survient dans un intervalle d'environ 3°C (cf. Figure 5.12).

Il est également observé que plus les hydrogels sont volumineux, moins leur volume change. Ceci s'explique par le fait que les molécules d'eau qui s'échappent de la structure sont tout d'abord celles se trouvant à la surface de l'hydrogel. À mesure que les molécules s'échappent, une couche plus dense se forme à la surface, et les molécules d'eau à l'intérieur se retrouvent prisonnières de cette couche. Ceci explique le temps de stabilisation plus long : les molécules vont mettre plus de temps à traverser cette couche dense. [10] Ainsi, nous pouvons nous attendre à une réduction de volume plus importante et plus rapide dans le cas de synthèses d'hydrogels possédant un rapport surface/volume plus élevé.

Le temps de stabilisation est beaucoup plus rapide pour les hydrogels chargés de nanoparticules magnétiques. En effet, les courbes obtenues montrent que la stabilisation est atteinte après environ 30 minutes, alors qu'il faut plus de 24 h aux échantillons d'hydrogel sans nanoparticules. Ce phénomène, expliqué par Filipcsei et al. [59], est dû au fait que la structure interne et les propriétés de surface de l'hydrogel sont modifiées par la présence des nanoparticules magnétiques, ce qui compromet la formation de la couche plus dense à la surface de l'hydrogel.

Ces résultats préliminaires démontrent bien le potentiel de ce matériau pour l'application de vecteurs thérapeutiques pour la livraison ciblée de médicament. En effet, les changements de volume obtenus peuvent atteindre 80% (Figure 5.11), et ils sont inversement liés au volume des hydrogels. Nous pouvons donc nous attendre à obtenir des changements de volume équivalents ou supérieurs dans le cas de volumes plus petits. Nous pouvons également nous attendre à obtenir des temps de réponse plus courts, car le ratio surface-volume sera supérieur, diminuant ainsi

l'influence de l'apparition de la couche de surface plus dense, d'autant plus que cet effet devient négligeable lorsque l'hydrogel est chargé de nanoparticules.

5.5.2 Synthèse de particules d'hydrogel

La deuxième étape du projet consiste à effectuer la synthèse du matériau sous forme de particules de taille modulable afin d'étudier encore une fois leurs caractéristiques. Les diamètres de particules visés pour l'embolisation sont de 50 à 100 μm , considérant la diminution de volume qu'ils peuvent atteindre (plus de 50% de leur diamètre), et considérant les travaux de P. Bastian et al. [8], qui démontrent que la taille optimale de particules pour l'embolisation de l'artère hépatique d'un lapin pour le traitement d'une tumeur au foie est de 40 μm .

Plusieurs méthodes sont envisagées, mais en raison de la taille des particules, la méthode par réseau IPN d'alginate est retenue. Selon la littérature, celle-ci permet d'obtenir des particules entre 100 μm et 2 mm de diamètre en suivant différentes méthodes décrites à la section 1.6.1. Les autres techniques de synthèse de particules visaient des diamètres trop petits, de l'ordre de la centaine de nanomètres.

Les observations liées aux expériences précédentes (synthèse simple) ont permis de fixer certains paramètres pour la synthèse de particules de ce matériau. Les proportions ont pu être ajustées en fonction de ces résultats. Le diamètre des particules obtenues par la méthode étudiée varie entre 90 μm et 2 mm.

Afin d'étudier l'effet des différents paramètres de synthèse, un montage ouvert a été utilisé pour la synthèse de particules d'alginate, sans PNIPA, celles-ci pouvant gélifier en présence d'oxygène. Un vase de pétri a donc été utilisé afin d'avoir des électrodes plus rapprochées, permettant ainsi d'avoir un champ électrostatique important, sans avoir à appliquer un voltage trop élevé. Le montage utilisé est donc plus polyvalent que celui pour la synthèse de PNIPA, qui doit être fermé, et les effets des paramètres tels que l'intensité du champ électrostatique, la taille de l'aiguille, le débit de la solution alginate peuvent être observés. Les résultats démontrent que la taille des particules diminue avec l'augmentation du champ électrostatique, avec la diminution du diamètre intérieur de l'aiguille, avec la diminution du débit et de la viscosité de la solution d'alginate. En revanche, cette méthode possède certaines limitations, entre autre lors de

l'application d'un champ électrostatique trop élevé, qui résulte en une vaporisation des gouttelettes. Les diamètres des aiguilles disponibles sur le marché sont également limités.

Les contraintes liées à l'utilisation d'un système fermé, nécessaire à la synthèse des particules de PNIPA, nous prive de la possibilité de l'utilisation d'un pétri et nous oblige à utiliser des flacons de petite taille avec un col mince. En effet, le système est fermé à l'aide d'un septum, et l'aiguille doit demeurer proche de la solution de CaCl_2 . Or, cette distance entre l'aiguille et la solution doit être inférieure à la distance entre l'aiguille et la paroi du col du flacon, sinon des décharges apparaissent entre l'aiguille et le col, annihilant ainsi le champ électrostatique permettant la réduction de la taille des gouttelettes. Le montage n'est donc approprié que dans le cadre d'une production à petite échelle.

Par ailleurs, les proportions des différents produits nécessaires lors de la synthèse de particules, relativement à la concentration de monomères, doivent être supérieures à celles de la synthèse simple. En effet, les proportions d'agent de réticulation, d'accélérateur et d'initiateur ont été augmentées afin que la polymérisation se produise. Des produits n'ayant pas réagi se retrouvent dilués dans la solution de CaCl_2/APS , réduisant la proportion effective de produit utilisé.

Il est possible, par cette méthode de synthèse, d'obtenir des résultats reproductibles. Cependant, certaines irrégularités peuvent survenir (impuretés sur la pointe de l'aiguille, décharges corona lors d'application de champs électrostatique trop élevé, coalescence des particules, ...). Ainsi, la méthode demeure très sensible aux conditions expérimentales. Elle permet néanmoins d'obtenir de manière reproductible, des particules possédant des diamètres se trouvant dans l'intervalle recherchés (cf. Tableau 5.3, particules de 90 μm de diamètre).

Il serait possible d'optimiser cette technique en plaçant le montage dans un environnement fermé et sans oxygène, par exemple en utilisant une chambre anaérobie. Les contraintes liées au système fermé seraient ainsi éliminées, et le montage pourrait être simplifié. Le montage utilisé pour la synthèse de particules d'alginate (sans PNIPA) pourrait être utilisé, permettant ainsi plus de souplesse dans l'ajustement des paramètres de synthèse. De cette manière, la technique pourrait éventuellement permettre des synthèses de plus gros volumes de particules. Malheureusement, ces tests n'ont pas pu être effectués, faute de la disponibilité de l'équipement.

Somme toute, cette technique de synthèse est intéressante pour notre application puisqu'elle permet la modulation des paramètres de synthèse afin d'obtenir des hydrogels aux propriétés

pouvant être facilement ajustées. Le voltage appliqué est l'un des principaux paramètres influençant directement la taille des particules obtenues, et la modulation de la valeur de ce champ n'implique pas de modification du montage. Le design des particules peut ainsi être adapté, en fonction du type d'application : les tests préliminaires sur des animaux ou les patients humains.

Pour ce qui est des propriétés des hydrogels, nous avons démontré que, dans le cas des particules, la diminution de la concentration en agent de réticulation optimise la réduction du volume lorsque la température passe au-dessus du LCST (cf. Figure 5.17). Les particules avec une proportion d'agent de réticulation de 0,5% ont démontré une diminution de 98% de leur volume initial. Ce phénomène s'explique par le nombre inférieur de liens présents dans le réseau de l'hydrogel, réduisant la densité de la structure. Ceci permet aux molécules de se contracter davantage. On observe également que le temps de stabilisation demeure le même pour les trois différentes concentrations de BIS.

Ces résultats sont intéressants car le but recherché est d'obtenir un matériau capable de réduire considérablement son volume à l'intérieur du plus petit intervalle de température pour obtenir un microdispositif le plus polyvalent possible. En revanche, une faible concentration en agent de réticulation mènera également à un hydrogel moins résistant mécaniquement. L'ajustement de la concentration d'agent de réticulation sera donc important dans le design du microdispositif, et un compromis devra être fait entre la fonctionnalité et les propriétés mécaniques de celui-ci.

Tel que nous l'avions suggéré à la section précédente, le temps nécessaire à la stabilisation lors de l'augmentation de température est effectivement plus court dans le cas des particules d'hydrogel, que dans le cas des hydrogels synthétisés sous forme de volume. Le rapport surface/volume des particules étant plus élevé que pour les hydrogels plus volumineux, l'évacuation des molécules d'eau se fait plus efficacement.

Enfin, la température de transition peut être modulée en fonction de la concentration en AAc, ce qui permet la conception d'un dispositif réagissant au changement de température désiré (cf. Figure 5.18). Il est également observé que lorsque la concentration en AAc augmente, la transition devient moins abrupte et s'échelonne sur une plus grande plage de température. Il faut donc prendre cette contrainte en considération pour notre application et l'augmentation de température doit être ajustée en conséquence. Une concentration d'AAc de 5% permet d'obtenir

une température de transition d'environ 42°C, la transition se produisant sur un intervalle d'environ 10°C. Les résultats indiquent que la température de transition peut être ajustée de manière à être supérieure à la température du corps humain, de sorte que la transition ne se produira pas aussitôt que les particules seront injectées dans la circulation et qu'un contrôle sera possible. Ce contrôle permettra de délayer la libération de l'agent thérapeutique jusqu'au moment de l'embolisation.

5.5.3 Propriété du microdispositif

La dernière étape du projet consiste à étudier le potentiel des particules d'hydrogel chargées de nanoparticules magnétiques pour la livraison ciblée de médicament. Des particules ont donc été synthétisées en ajoutant des nanoparticules magnétiques à la solution de monomère initiale.

Tout d'abord, la taille et le comportement magnétique des nanoparticules ferromagnétiques ont été caractérisés. L'absence d'hystérésis sur la courbe de VSM démontre le comportement superparamagnétique des nanoparticules. De plus, la taille des nanoparticules observées sur les images MET est uniforme, ce qui permet d'augmenter l'efficacité du chauffage par la relaxation de Néel, celle-ci se produisant de manière optimale à une fréquence précise du champ appliqué. Cette fréquence est déterminée en fonction du volume des particules. Plus la proportion de particules possédant le volume utilisé pour la détermination de cette fréquence optimale sera élevée, plus il y aura de chaleur générée.

Quelques difficultés ont été rencontrées lors de la synthèse de particules d'hydrogel chargées de nanoparticules ferromagnétiques. En effet, des problèmes de viscosités trop élevées et des problèmes de dispersion des nanoparticules, malgré l'utilisation d'une sonde à ultrason, limitent la concentration en nanoparticules. De plus, le peu de particules d'hydrogel obtenues lors des synthèses à plus hautes concentrations en nanoparticules (99 mg/ml) suggère que ces dernières influencent la polymérisation de l'hydrogel en créant des obstacles à la formation de liens entre les monomères. Cette situation est problématique dans le cas de microdispositifs de livraison ciblée de médicament, car une diminution du contenu en matériau magnétique implique une augmentation des gradients magnétiques utilisés pour leur guidage. Ces champs sont eux-mêmes limités par l'IRM utilisé ainsi que par les doses pouvant être administrées aux humains.

Les différents échantillons obtenus ont été comparés lors des tests de chauffage des particules dans le même champ magnétique alternatif. Les résultats obtenus montrent que l'augmentation de température devient plus importante lorsque la concentration en nanoparticules est augmentée. Une augmentation de la température de plus de 8°C (cf. Tableau 5.4) est rendue possible, et ce en 30 minutes, dans un champ magnétique alternatif de 8,96 kA/m à une fréquence de 154 kHz. L'augmentation de température négligeable du bain d'huile servant de milieu environnant démontre que la chaleur est uniquement générée par les nanoparticules ferromagnétiques se trouvant à l'intérieur des hydrogels. Ce changement de température est suffisant pour permettre la transition du PNIPA puisque comme nous l'avons vu, cette transition se produit dans un intervalle de température d'environ 10°C dans le cas de l'hydrogel possédant une température de transition aux environs 42°C. Ainsi, cette augmentation de température se produit dans un intervalle de temps assez court pour être envisagée pour un traitement clinique.

Ces tests ont également permis de comparer les concentrations de nanoparticules présentes dans la structure de l'hydrogel. Bien qu'aucune donnée qualitative ne puisse en être tirée, nous pouvons quand même affirmer que plus la concentration de nanoparticules lors de la synthèse est élevée, plus le changement de température est important. Les tests de chauffage ont été répétés à quatre reprises, afin d'observer l'effet des cycles de chauffage sur la concentration en nanoparticules. Dans chaque cas, aucun changement significatif de l'augmentation de température n'a été observé (voir incertitudes Tableau 5.4, correspondant à l'écart-type des valeurs), ce qui confirme que les nanoparticules sont fixées à l'intérieur de la structure de l'hydrogel.

Pour les tests cliniques, il faudra assurer un bon contrôle qualité sur le protocole de synthèse des particules d'hydrogel et sur leur contenu en matériau magnétique, basé sur les résultats présentés dans ce mémoire, afin d'avoir un bon contrôle sur l'augmentation de température, et une connaissance du temps nécessaire à cette augmentation.

L'augmentation de la température des hydrogels mènera à la libération de l'agent thérapeutique qu'on aura préalablement encapsulé, lorsque les particules auront créé l'embolisation près de la tumeur. Les liens d'encapsulation devront être assez stables pour éviter la libération de ces molécules dès l'injection des particules. Une libération précoce induirait une toxicité systémique, telle que nous l'expérimentons avec les techniques actuelles de traitement de ces tumeurs.

CONCLUSION

Des hydrogels de PNIPA ont été retenus, suite à l'étude des différents matériaux disponibles démontrant une sensibilité à la température. Ce choix a été justifié par le comportement de ce matériau, c'est-à-dire la transition discontinue de volume survenant autour d'une température de transition, et également par les nombreuses applications biomédicales pour lesquelles ce matériau est déjà employé.

Des hydrogels de PNIPA ont donc été synthétisés, tout d'abord sous forme de volume, afin d'étudier une partie de ses caractéristiques. Une stratégie a par la suite été développée afin de synthétiser le PNIPA sous forme de particules. La stratégie retenue fut la synthèse à l'aide d'alginate. Des particules aussi petites que 90 μm ont pu être obtenues de manière reproductible. Les paramètres de synthèse ont été modulés afin d'étudier leurs effets sur la taille des particules. Les changements de volume des particules ont été caractérisés en fonction de la température, du temps de réaction, et des concentrations d'agent de réticulation et d'acide acrylique afin d'obtenir un hydrogel possédant un comportement adéquat pour notre application de microdispositif, c'est-à-dire possédant une température de transition autour de 42°C.

Finalement, des tests de synthèse d'hydrogel chargés de nanoparticules ferromagnétiques ont été réalisés afin de déterminer si le matériau se prête bien à l'application à laquelle on le destine. Afin d'étudier les changements de température induits, ces hydrogels ont été soumis à des champs magnétiques alternatifs.

L'objectif global visé par ces manipulations était le développement d'un microdispositif multifonctionnel exploitant la double fonctionnalité des nanoparticules ferromagnétiques, c'est-à-dire pouvant être contrôlé extérieurement par l'application de gradients magnétiques et de champs magnétiques alternatifs respectivement pour le guidage et pour le déclenchement de la libération de l'agent thérapeutique.

L'utilisation du PNIPA chargé de nanoparticules de Fe_3O_4 , a mené aux résultats les plus intéressants dans le cadre de cette application. La possibilité de moduler la température à laquelle le changement discontinu de volume survient en fonction de la concentration d'AAc ainsi que le mince intervalle dans lequel cette transition survient sont idéaux pour une application de livraison ciblée. Cependant, l'intervalle de température au cours duquel cette transition a lieu est

relativement large lorsque nous augmentons la température de transition. Celui-ci devra donc être optimisé.

La technique de synthèse des particules utilisée a permis, malgré une grande sensibilité aux conditions expérimentales, d'obtenir des particules de PNIPA de taille et de forme homogène et l'ajout d'un champ électrostatique lors de la synthèse des particules a permis d'obtenir des particules possédant des diamètres facilement modulables et se situant dans un intervalle approprié pour l'application.

Finalement, les résultats ont confirmé la possibilité de charger ces hydrogels de nanoparticules ferromagnétiques, et ce en quantité suffisante afin d'augmenter leur température par l'application d'un champ magnétique alternatif. Cette augmentation de température est par ailleurs suffisante à la transition de l'hydrogel, et se produit en un temps suffisamment court pour être envisageable pour une application clinique.

Nous pouvons donc affirmer que le PNIPA chargé de nanoparticules ferromagnétiques démontre un bon potentiel d'utilisation pour un dispositif de livraison ciblée de médicament. La triple fonctionnalité du matériau magnétique est exploitée de manière innovatrice, conjointement avec l'utilisation d'un matériau thermosensible, pour la visualisation et le guidage à l'aide de gradient magnétiques, et pour la génération de chaleur avec un champ magnétique alternatif, menant à la libération de l'agent thérapeutique au moment désiré.

La prochaine étape devra être l'encapsulation d'une molécule thérapeutique dans l'hydrogel et la caractérisation de sa libération lors de l'augmentation de température. L'influence de la présence de cette molécule dans la structure de l'hydrogel devra également être étudiée, afin de s'assurer que celle-ci ne compromet pas la fonctionnalité du microdispositif. Ces travaux permettront de confirmer le potentiel de ce microdispositif pour la livraison ciblée de médicament. De plus, des recherches quant à l'effet du milieu extérieur, i.e. le corps humain, sur les propriétés du matériau devront être effectuées afin de vérifier dans quelle mesure la température de transition de l'hydrogel sera altérée. Des recherches ont déjà été effectuées, démontrant que la salive ne modifie que très peu la température de transition (plus ou moins 1°C) mais que le liquide gastrique peut la modifier jusqu'à 2.5°C. Ces travaux ont été effectués dans le cadre d'applications de livraison de médicament avec absorption par voie orale. [32] Dans notre cas, nous parlons plutôt d'injection dans le réseau vasculaire. Les effets des composants du sang,

principalement sur la température de transition de l'hydrogel, mais également sur ses propriétés physiques et mécaniques, devraient éventuellement être étudiés puisqu'une altération trop importante de la température de transition compromettrait la fonction du microdispositif injecté.

Enfin, la nature et la concentration du matériau magnétique à l'intérieur du microdispositif devront être ajustées en fonction des gradients magnétiques disponibles dans l'IRM ou pour la plate-forme de propulsion utilisée [34], afin d'assurer un guidage et un ciblage efficaces du microdispositif à l'intérieur du réseau vasculaire.

Les défis technologiques sont encore nombreux. Néanmoins, cette maîtrise a posé les fondations d'une application innovatrice d'un matériau intelligent.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] S. Martel *et al.*, "Automatic navigation of an untethered device in the artery of a living animal using a conventional clinical magnetic resonance imaging system," *Applied Physics Letters*, vol. 90, p. 114105, 2007.
- [2] S. Martel *et al.*, "Adapting MRI systems to propel and guide microdevices in the human blood circulatory system," dans *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, San Francisco, CA, USA, 2004, p. 1044-7.
- [3] J. B. Mathieu et S. Martel, "MRI-based magnetic navigation of nanomedical devices for drug delivery and hyperthermia in deep tissues," dans *Nanotechnology, 2007. IEEE-NANO 2007. 7th IEEE Conference on*, 2007, p. 312-315.
- [4] O. Felfoul *et al.*, "In Vivo MR-Tracking Based on Magnetic Signature Selective Excitation," *Medical Imaging, IEEE Transactions on*, vol. 27, p. 28-35, 2008.
- [5] S. N. Tabatabaei *et al.*, "Shrinkable Hydrogel-Based Magnetic Microrobots for Interventions in the Vascular Network," *Advanced Robotics*, vol. 25, p. 1049-1067, 2011.
- [6] K. L. Ang *et al.*, "Magnetic PNIPA hydrogels for hyperthermia applications in cancer therapy," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 27, p. 347-351, 2007.
- [7] A. L. Lewis *et al.*, "Comparative in vitro evaluation of microspherical embolisation agents," *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 17, p. 1193-204, 2006.
- [8] P. Bastian *et al.*, "Chemo-embolization of experimental liver metastases. Part I: distribution of biodegradable microspheres of different sizes in an animal model for the locoregional therapy," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 46, p. 243-254, 1998.
- [9] G. G. Odian, *Principles of polymerization*, 2d^e éd. New York: Wiley, 1981.
- [10] Y. Qiu et K. Park, "Environment-sensitive hydrogels for drug delivery," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 53, p. 321-339, 2001.
- [11] S. V. Ghugare *et al.*, "Temperature-Sensitive Poly(vinyl alcohol)/Poly(methacrylate-co-N-isopropyl acrylamide) Microgels for Doxorubicin Delivery," *Biomacromolecules*, vol. 10, p. 1589-1596, 2009.
- [12] S. V. Ghugare *et al.*, "Structure and Dynamics of a Thermoresponsive Microgel around Its Volume Phase Transition Temperature," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 114, p. 10285-10293, 2010/08/19 2010.
- [13] C. S. Satish *et al.*, "Hydrogels as controlled drug delivery systems: Synthesis, crosslinking, water and drug transport mechanism," *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 68, p. 133-140, 2006.
- [14] T. R. Hoare et D. S. Kohane, "Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges," *Polymer*, vol. 49, p. 1993-2007, 2008.
- [15] R. A. Frimpong *et al.*, "Synthesis and temperature response analysis of magnetic-hydrogel nanocomposites," *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 80A, p. 1-6, 2007.

- [16] R. P. Dumitriu *et al.*, "A Drug Delivery System Based on Stimuli-Responsive Alginate/N-Isopropylacryl amide Hydrogel " *Cellulose Chemistry and Technology*, vol. 43, p. 251-262, 2009.
- [17] J. K. Oh *et al.*, "The development of microgels/nanogels for drug delivery applications," *Progress in Polymer Science*, vol. 33, p. 448-477, 2008.
- [18] J. Kost et R. Langer, "Responsive polymer systems for controlled delivery of therapeutics," *Trends in Biotechnology*, vol. 10, p. 127-131, 1992.
- [19] H. G. Schild, "Poly(N-isopropylacrylamide): Experiment, Theory and Application," *Progress in Polymer Science*, vol. 17, p. 163-249, 1992.
- [20] S. Chaterji *et al.*, "Smart polymeric gels: Redefining the limits of biomedical devices," *Progress in Polymer Science*, vol. 32, p. 1083-1122, 2007.
- [21] X.-J. Ju *et al.*, "Effects of internal microstructures of poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels on thermo-responsive volume phase-transition and controlled-release characteristics," *Smart Materials and Structures*, vol. 15, p. 1767-1774, 2006.
- [22] E. S. Gil et S. M. Hudson, "Stimuli-responsive polymers and their bioconjugates," *Progress in Polymer Science*, vol. 29, p. 1173-1222, 2004.
- [23] S. J. Kim *et al.*, "Preparation and characterization of thermosensitive poly(N-isopropylacrylamide)/poly(ethylene oxide) semi-interpenetrating polymer networks," *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 90, p. 3032-3036, 2003.
- [24] W. M. Sokolowski *et al.*, "Cold hibernated elastic memory (CHEM) self-deployable structures," *Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering*, vol. 3669, p. 179-185, 1999.
- [25] W. M. Sokolowski et S. Hayashi, "Applications of cold hibernated elastic memory (CHEM) structures," éd, 2004.
- [26] A. Metcalfe *et al.*, "Cold hibernated elastic memory foams for endovascular interventions," *Biomaterials*, vol. 24, p. 491-497, 2003.
- [27] P. C. Painter et M. M. Coleman, "Polymer Synthesis," dans *Fundamentals of polymer science : an introductory text*, 2nd^e éd. Lancaster, Penns.: Technomic, 1997, p. 29-62.
- [28] H. Macková *et al.*, "Magnetic poly(N-isopropylacrylamide) microspheres by dispersion and inverse emulsion polymerization," *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, vol. 45, p. 5884-5898, 2007.
- [29] C. Charcosset *et al.*, "The membrane emulsification process - a review," *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, vol. 79, p. 209-218, 2004.
- [30] S. Omi *et al.*, "Membrane emulsification a versatile tool for the synthesis of polymeric microspheres," *Macromolecular Symposia*, vol. 151, p. 319-330, 2000. Disponible: [http://dx.doi.org/10.1002/1521-3900\(200002\)151:1<319::AID-MASY319>3.0.CO;2-X](http://dx.doi.org/10.1002/1521-3900(200002)151:1<319::AID-MASY319>3.0.CO;2-X)
- [31] K. Makino *et al.*, "Dependence of Temperature-Sensitivity of Poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid) Hydrogel Microspheres upon Their Sizes," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 230, p. 128-134, 2000.

- [32] F. Eeckman *et al.*, "Effect of some physiological and non-physiological compounds on the phase transition temperature of thermoresponsive polymers intended for oral controlled-drug delivery," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 222, p. 259-270, 2001.
- [33] H. W. T. Matthew, "Polymers for Tissue Engineering Scaffolds " dans *Polymeric biomaterials*, 2nd^e éd. New York: Marcel Dekker, 2002.
- [34] S. Martel *et al.*, "MRI-based Medical Nanorobotic Platform for the Control of Magnetic Nanoparticles and Flagellated Bacteria for Target Interventions in Human Capillaries," *The International Journal of Robotics Research*, vol. 28, p. 1169-1182, September 1, 2009 2009.
- [35] D. A. Mbeh *et al.*, "In vitro biocompatibility assessment of functionalized magnetite nanoparticles: Biological and cytotoxicological effects," *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 100A, p. 1637-1646, 2012.
- [36] G. Langlois *et al.*, "Direct effect of alginate purification on the survival of islets immobilized in alginate-based microcapsules," *Acta Biomaterialia*, vol. 5, p. 3433-40, 2009.
- [37] T. G. Park et A. S. Hoffman, "Preparation of large, uniform size temperature-sensitive hydrogel beads," *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, vol. 30, p. 505-507, 1992.
- [38] P. M. Xulu *et al.*, "Preparation and Responsive Properties of Magnetically Soft Poly(N-isopropylacrylamide) Gels," *Macromolecules*, vol. 33, p. 1716-1719, 2000.
- [39] M. F. A. Goosen *et al.*, "Immobilization of Cells Using Electrostatic Droplet Generation," dans *Immobilization of Enzymes and Cells*, éd., 1997, p. 167-174.
- [40] J. A. P. Douglas B. Seifert, "Production of Small, Monodispersed Alginate Beads for Cell Immobilization," *Biotechnology Progress*, vol. 13, p. 562-568, 1997.
- [41] P. M. Xulu *et al.*, "Preparation and responsive properties of magnetically soft poly(N-isopropylacrylamide) gels," *Macromolecules*, vol. 33, p. 1716-1719, 2000.
- [42] U. Prüsse *et al.*, "Comparison of different technologies for alginate beads production," *Chemical Papers*, vol. 62, p. 364-374, 2008.
- [43] S. Mornet *et al.*, "Magnetic nanoparticle design for medical diagnosis and therapy," *Journal of Materials Chemistry*, vol. 14, p. 2161-2175, 2004.
- [44] R. Regmi *et al.*, "Hyperthermia controlled rapid drug release from thermosensitive magnetic microgels," *Journal of Materials Chemistry*, vol. 20, p. 6158-6163, 2010.
- [45] H. Wakamatsu *et al.*, "Preparation and characterization of temperature-responsive magnetite nanoparticles conjugated with N-isopropylacrylamide-based functional copolymer," *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, vol. 302, p. 327-333, 2006.
- [46] S. Kalele *et al.*, "Probing temperature-sensitive behavior of pNIPAAm-coated iron oxide nanoparticles using frequency-dependent magnetic measurements," *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, vol. 321, p. 1377-1380, 2009.

- [47] S. Purushotham *et al.*, "Thermoresponsive core-shell magnetic nanoparticles for combined modalities of cancer therapy," *Nanotechnology*, vol. 20, p. 305101, 2009.
- [48] T.-Y. Liu *et al.*, "Biomedical nanoparticle carriers with combined thermal and magnetic responses," *Nano Today*, vol. 4, p. 52-65, 2009.
- [49] R. Kappiyoor *et al.*, "The effects of magnetic nanoparticle properties on magnetic fluid hyperthermia," *Journal of Applied Physics*, vol. 108, p. 094702-094702-8, 2010.
- [50] H.-Y. Tseng *et al.*, "Hyperthermia cancer therapy utilizing superparamagnetic nanoparticles," dans *Proceedings of the 2nd IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems, IEEE NEMS 2007*, Bangkok, Thailand, 2007, p. 163-166.
- [51] H.-Y. Tseng *et al.*, "Localized heating of tumor cells utilizing superparamagnetic nanoparticles," Hong Kong, China, 2007, p. 969-974.
- [52] L. L. Lao et R. V. Ramanujan, "Magnetic and hydrogel composite materials for hyperthermia applications," *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 15, p. 1061-1064, 2004.
- [53] A. Wadajkar *et al.*, "Cytotoxic evaluation of N-isopropylacrylamide monomers and temperature-sensitive poly(N-isopropylacrylamide) nanoparticles," *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 11, p. 1375-1382, 2009.
- [54] S. A. Meenach *et al.*, "Biocompatibility analysis of magnetic hydrogel nanocomposites based on poly(N-isopropylacrylamide) and iron oxide," *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 91A, p. 903-909, 2009.
- [55] D. Kanjickal *et al.*, "Effects of sterilization on poly(ethylene glycol) hydrogels," *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 87A, p. 608-617, 2008.
- [56] A. Jiménez *et al.*, "Evaluation of CO₂-based cold sterilization of a model hydrogel," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 101, p. 1344-1352, 2008.
- [57] J. Zhang *et al.*, "Dual thermo- and pH-sensitive poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid) hydrogels with rapid response behaviors," *Polymer*, vol. 48, p. 1718-1728, 2007.
- [58] Y. Tao *et al.*, "Experiments and simulation of pH-responsive N-isopropylacrylamide-acrylic acid copolymer hydrogels," *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 101, p. 323-330, 2006.
- [59] G. Filipcsei *et al.*, "Comparative Study on the Collapse Transition of Poly(N-isopropylacrylamide) Gels and Magnetic Nanoparticles Loaded Poly(N-isopropylacrylamide) Gels," *Macromolecular Symposia*, vol. 239, p. 130-137, 2006.