



**Biomatériaux fonctionnels à base de complexes de
polyélectrolytes compactés de type chitosan/alginate :
conception, caractérisation et premières évaluations
biologiques**

Alexandre Hardy

► **To cite this version:**

Alexandre Hardy. Biomatériaux fonctionnels à base de complexes de polyélectrolytes compactés de type chitosan/alginate : conception, caractérisation et premières évaluations biologiques. Autre. Université de Strasbourg, 2018. Français. NNT : 2018STRAF024 . tel-01996521

HAL Id: tel-01996521

<https://theses.hal.science/tel-01996521>

Submitted on 28 Jan 2019

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

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

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

Laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives

THÈSE présentée par :

Alexandre HARDY

soutenue le : **18 septembre 2018**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité :

Sciences pharmaceutiques / Sciences du Médicament et des autres Produits de Santé

**Biomatériaux fonctionnels à base de
complexes de polyélectrolytes
compactés de type chitosan/alginate
Conception, caractérisation et premières
évaluations biologiques**

THÈSE dirigée par :

M. FRISCH Benoît
Mme BOUREL Line

Dr., Université de Strasbourg
Pr., Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme GIROD-FULLANA Sophie
Mme KERDJOU DJ Halima

Pr., Université de Toulouse
Dr., Université de Reims Champagne-Ardenne

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Mme BOULMEDAIS Fouzia
Mme DES RIEUX Anne

Dr., Université de Strasbourg
Pr., Université Catholique de Louvain

Remerciements

Cette thèse a été réalisée au sein de l'équipe 3Bio (ex équipe Biovectorologie) du Laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives (CAMB), dirigé par le Docteur Jean-Serge Remy, à la Faculté de Pharmacie de l'Université de Strasbourg et sous la direction du Docteur Benoît Frisch et du Professeur Line Bourel.

Mes remerciements vont à Monsieur Benoît Frisch pour avoir dirigé cette thèse et pour m'avoir enseigné l'exigence et la rigueur nécessaires à la conduite de travaux de recherche.

Je remercie également Madame Line Bourel pour avoir co-dirigé cette thèse en y apportant l'ensemble de son expertise scientifique. Je lui adresse en particulier ma gratitude pour sa disponibilité, sa réactivité et sa bienveillance qui ont été précieuses tout au long de la réalisation de ces travaux de thèse.

Je tiens à remercier les membres du jury, le Professeur Sophie Girod-Fullana, le Docteur Halima Kerdjoudj, le Docteur Fouzia Boulmedais et le Professeur Anne Des Rieux, pour me faire l'honneur d'évaluer la qualité des travaux de recherche rapportés dans ce manuscrit.

Je remercie Marcella De Giorgi qui m'a supervisé au laboratoire de chimie tout au long de cette thèse. Je la remercie notamment pour sa disponibilité ainsi que pour le plaisir que j'ai pu avoir à partager son bureau. Merci pour avoir contribué à mon épanouissement au cours de ces trois années, aussi bien d'un point de vue professionnel que personnel. Je remercie également Cendrine Seguin qui a largement contribué à mon initiation à la biologie cellulaire et à ma formation à l'étude *in vitro*. Je tiens particulièrement à la remercier pour sa disponibilité qui a été d'une très grande importance tout au long de ces travaux ainsi que pour ses qualités de pédagogue qui m'ont permis de développer un grand intérêt et une curiosité envers l'évaluation biologique des matériaux développés. Je remercie aussi Anaïs Brion qui a également contribué à mon initiation à l'évaluation biologique *in vitro* à mon arrivée au laboratoire.

Un grand merci également à Madame Sylvie Fournel qui a été très disponible pour l'orientation du projet et pour les diverses réflexions du point de vue de la biologie.

Je remercie également les autres membres permanents de l'équipe, Antoine Kichler pour sa sympathie, Maria Vittoria Spanedda qui a toujours été disponible pour répondre à mes questions, Béatrice Heurtault pour sa prévenance, Anne Casset, Carole Ronzani et Françoise Pons pour leur gentillesse.

Je remercie Monsieur Pierre Schaaf et Monsieur Philippe Laval de l'UMR-S 1121 Biomatériaux et Bioingénierie pour leur participation à la valorisation des résultats obtenus au cours de ces travaux de thèse. Je tiens aussi à exprimer ma reconnaissance à Monsieur Eric Mathieu et Monsieur Joseph Hemmerlé de cette même UMR-S 1121 pour leur assistance concernant la réalisation des observations en microscopie électronique à balayage.

Je tiens également à remercier mes camarades doctorants et jeunes docteurs de l'équipe 3Bio qui ont contribué à rendre cette thèse agréable au quotidien. Merci à Hanadi pour sa grande sympathie, à Célia, la source de nombreuses rigolades, à May pour sa gentillesse inconditionnelle, à Florence pour ces instants improbables, à Eya pour son humour si particulier mais néanmoins très efficace ainsi qu'à Manon pour sa bonne humeur communicative et Angéla pour ces échanges sympathiques.

Je remercie aussi les différents membres des équipes LFCS et V-SAT du CAMB et de l'équipe CBIP du LIT qui ont tous participé à leur manière à l'atmosphère conviviale au quotidien au cours de cette thèse. Merci à Alexandre, Boris, Charlotte, Chloé, David, Elisabetta, Eric, aux Fabien, Guilhem, Igor, Linda, Marc, Michel, aux Mickaël, Patrick, Sacha, aux Sebastien, Sergii, Thi Minh Nguyet et Zolo. Un merci en particulier à Sylvain et Florent pour cette complicité et l'ensemble de ces moments partagés, au laboratoire et en dehors.

Je n'oublie pas l'ensemble de mes camarades de l'Association des Doctorants et Docteurs d'Alsace pour leur confiance ainsi que pour tous ces moments agréables et ces projets réalisés ensemble qui m'ont beaucoup apporté, tant d'un point de vue professionnel que personnel.

Je remercie évidemment l'ensemble de ma famille pour m'avoir tant apporté depuis toujours. Je remercie en particulier mes parents à qui je dois tout et qui m'ont soutenu et aimé depuis le début et dans chaque instant de ma vie. Merci également à ma sœur qui compte tant pour moi.

Merci à mes amis, toujours présents malgré la distance, en particulier à Mathieu, Gautier, Aurélia, Yohan, Édouard, Kévin, Mathias, Enzo, Hugo, Nicolas...

Je remercie bien sûr Clarisse, ma fiancée, d'être à mes côtés depuis maintenant quelques années. Merci pour ton soutien, pour tout cet amour que tu me portes et pour le bonheur à venir.

Enfin, merci à toutes les personnes que j'ai eu le plaisir de rencontrer au court de ces trois années et que je n'ai pas pu citer.

Table des matières

Remerciements.....	3
Table des matières	7
Abréviations.....	15
Avant-propos	19
Chapitre 1 : État de l'art	23
I. Les biomatériaux	26
I. 1. Généralités.....	26
I. 2. Les biomatériaux métalliques	27
I. 2. 1. Les aciers inoxydables	27
I. 2. 2. Les alliages à base de cobalt	28
I. 2. 3. Les alliages à base de titane	29
I. 3. Les biomatériaux céramiques.....	31
I. 4. Les biomatériaux polymériques	33
I. 4. 1. Le polyéthylène.....	33
I. 4. 2. Le poly(méthacrylate de méthyle)	34
I. 4. 3. Le polypropylène	34
I. 4. 4. Le polytétrafluoroéthylène.....	35
I. 4. 5. Le polyuréthane	35
I. 4. 6. Le poly(fluorure de vinylidène).....	36
I. 4. 7. Les polyamides	36
I. 4. 8. Les polyimides.....	37
I. 4. 9. Les silicones.....	38
I. 5. Les biomatériaux composites	39
II. Les complexes de polyélectrolytes.....	42
II. 1. Les polyélectrolytes	42
II. 2. Définition des complexes de polyélectrolytes	43
II. 3. Formation des complexes de polyélectrolytes	43
II. 4. Propriétés des complexes de polyélectrolytes	44
II. 4. 1. Propriétés physicochimiques des complexes de polyélectrolytes	44
II. 4. 2. Propriétés de transport des complexes de polyélectrolytes	44
II. 5. Mise en forme et application des complexes de polyélectrolytes.....	45
II. 5. 1. Formulation des complexes de polyélectrolytes en présence de sels ternaires	45
II. 5. 2. Formulation des complexes de polyélectrolytes sous forme de complexes quasi-solubles.....	46
II. 5. 3. Formulation des complexes de polyélectrolytes sous forme de multicouches de polyélectrolytes	47
III. Les CoPEC, Complexes de Polyélectrolytes Compacts	49
III. 1. La saloplasticité	49
III. 2. La préparation de CoPEC par extrusion	50
III. 3. La préparation de CoPEC par sédimentation et évaporation.....	53
III. 4. La préparation de CoPEC par ultracentrifugation	55
III. 4. 1. Principe de la préparation de CoPEC par ultracentrifugation.....	55

III. 4. 2. Les premières études sur les CoPEC à base de polyélectrolytes synthétiques préparés par ultracentrifugation.....	56
III. 4. 2. 1. Les CoPEC PDADMA/PMAA comme matériaux mimant le noyau gélatineux des disques intervertébraux.....	56
III. 4. 2. 2. Les CoPEC PDADMA/PSS comme matériaux poreux mimant le cartilage.....	57
III. 4. 2. 3. Les CoPEC PDADMA/PSS comme matériaux aux propriétés mécaniques modulables.....	58
III. 4. 3. Vers des CoPEC biosourcés.....	60
III. 4. 3. 1. Les CoPEC PAH/PAA, des matériaux aux propriétés contrôlables.....	60
III. 4. 3. 2. Les CoPEC PAH/PAA comme supports d'immobilisation d'enzymes.....	61
III. 4. 3. 3. Les CoPEC PAH/PAA comme matériaux autoréparants.....	63
III. 4. 3. 4. Le CoPEC chitosan/alginate comme biomatériau empêchant l'adhésion de cellules et de bactéries.....	65
IV. Objectifs de la thèse.....	67
Chapitre 2 : Synthèse des molécules-outils pour la formulation de CoPEC fonctionnels	69
I. Le chitosan, les alginates et les cyclodextrines comme molécules-outils pour la formulation de matériaux d'intérêt biomédical.....	72
I. 1. Les alginates et le chitosan dans le domaine biomédical.....	72
I. 1. 1. Les alginates.....	72
I. 1. 1. 1. Obtention des alginates.....	72
I. 1. 1. 2. Composition des alginates.....	72
I. 1. 1. 3. Fonctionnalisation des alginates.....	73
I. 1. 1. 4. Formulation des alginates.....	73
I. 1. 1. 5. Application des alginates dans le domaine biomédical.....	74
I. 1. 2. Le chitosan.....	75
I. 1. 2. 1. Obtention du chitosan.....	75
I. 1. 2. 2. Composition du chitosan.....	76
I. 1. 2. 3. Fonctionnalisation du chitosan.....	76
I. 1. 2. 4. Formulation du chitosan.....	77
I. 1. 2. 5. Applications du chitosan dans le domaine biomédical.....	77
I. 2. Les cyclodextrines comme molécules cages aux multiples intérêts.....	79
I. 2. 1. Nature des cyclodextrines « natives ».....	79
I. 2. 2. Formation de complexes d'inclusion à base de cyclodextrines.....	79
I. 2. 3. Applications des cyclodextrines.....	81
II. Modification de la β -cyclodextrine en vue de son greffage sur le chitosan et l'alginate.....	83
II. 1. Modification de la β -cyclodextrine pour la fonctionnalisation du chitosan.....	83
II. 2. Modification de la β -cyclodextrine pour la fonctionnalisation de l'alginate.....	84
III – Fonctionnalisation du chitosan et de l'alginate par la β -cyclodextrine pour la formulation ultérieure de CoPEC capables de contenir et relarguer des molécules hydrophobes.....	87
III. 1. Greffage de la β -cyclodextrine sur le chitosan.....	87
III. 2. Greffage de la β -cyclodextrine sur l'alginate.....	89
IV. Synthèse de dérivés d'adamantane et de cholestérol pour la formulation de CoPEC capables de contenir et relarguer des molécules hydrophiles.....	93
IV. 1. L'adamantane et le cholestérol en complexe d'inclusion avec la β -cyclodextrine.....	93
IV. 1. 1. L'adamantane en complexe d'inclusion avec la β -cyclodextrine.....	93
IV. 1. 2. Le cholestérol en complexe d'inclusion avec la β -cyclodextrine.....	94
IV. 2. Synthèse d'un dérivé d'adamantane présentant une fonction maléimide.....	95

IV. 3. Synthèse d'un dérivé de cholestérol présentant une fonction maléimide	96
IV. 3. 1. Synthèse du <i>N</i> -(2-aminoéthyl)maléimide TFA	96
IV. 3. 2. Synthèse de l'hémisuccinate de cholestérol.....	97
IV. 3. 3. Synthèse du (3 <i>S</i> , 8 <i>S</i> , 9 <i>S</i> , 10 <i>R</i> , 13 <i>R</i> , 14 <i>S</i> , 17 <i>R</i>)-10,13-diméthyl-17-((<i>R</i>)-6-méthylheptan-2-yl)-2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 , 16, 17-tétradécahydro-1 <i>H</i> -cyclopenta[<i>a</i>]phenanthren-3-yl 4-((2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1 <i>H</i> -pyrrol-1-yl)éthyl)amino)-4-oxobutanoate	99
V. Conclusion partielle	102
VI. Partie expérimentale	103
VI. 1. Généralités.....	103
VI. 2. Synthèse des dérivés de β -cyclodextrine	104
VI. 2. 1. Synthèse de la β -cyclodextrine monotosylée 1.....	104
VI. 2. 2. Synthèse de la β -cyclodextrine monoazidée 2.....	105
VI. 2. 3. Synthèse de la β -cyclodextrine monoaminée 3.....	105
VI. 3. Fonctionnalisation de l'alginate et du chitosan par la β -cyclodextrine	106
VI. 3. 1. Synthèse du β -cyclodextrine-chitosan (β CD-chitosan) 4	106
VI. 3. 2. Synthèse du β -cyclodextrine-alginate (β CD-alginate)	107
VI. 4. Synthèse des dérivés d'adamantane et de cholestérol	109
VI. 4. 1. Synthèse du dérivé d'adamantane.....	109
VI. 4. 2. Synthèse du dérivé de cholestérol.....	111
Chapitre 3 : Mise en forme et caractérisation des biomatériaux.....	115
I. Les associations entre le chitosan et l'alginate dans le domaine biomédical	118
I. 1. Les associations chitosan/alginate en tant que revêtements.....	118
I. 2. Les associations chitosan/alginate pour la culture cellulaire 3D	119
I. 3. Les associations chitosan/alginate pour la délivrance d'éléments actifs	119
I. 4. Les associations chitosan/alginate pour le développement de pansements	121
I. 5. Les associations chitosan/alginate pour l'ingénierie tissulaire	121
II. Fabrication de CoPEC à base de chitosan et d'alginate par ultracentrifugation	123
II. 1. Préparation de CoPEC chitosan/alginate, chitosan/ β CD-alginate et β CD-chitosan/ β CD-alginate par ultracentrifugation.....	123
II. 2. Préparation de CoPEC β CD-chitosan/alginate par ultracentrifugation	125
II. 2. 1. Adaptation de la formulation de CoPEC au couple β CD-chitosan/alginate	125
II. 2. 2. Détermination de la composition du CoPEC β CD-chitosan/alginate	128
III. Préparation de CoPEC poreux à base de chitosan et d'alginate par ultracentrifugation	131
III. 1. Préparation de CoPEC bruts poreux à base de chitosan et d'alginate	131
III. 1. 1. Principe de la formulation de CoPEC bruts poreux à base de chitosan et d'alginate.....	131
III. 1. 2. Comparaison de deux milieux de dissolution des particules porogènes	132
III. 1. 3. Détermination de la durée nécessaire d'immersion du CoPEC dans la solution saline acide pour dissoudre l'intégralité des particules de carbonate de calcium	136
III. 1. 4. Impact de la proportion de particules porogènes sur la microstructure du matériau final	136
III. 1. 5. Préparation de CoPEC β CD-chitosan/alginate poreux	139
III. 2. Préparation de particules poreuses de CoPEC à base de chitosan et d'alginate.....	140
III. 2. 1. Préparation de particules poreuses de CoPEC chitosan/alginate	140
III. 2. 2. Préparation de particules poreuses de CoPEC β CD-chitosan/alginate	142

IV. Fabrication de CoPEC à base de chitosan et d'alginate par sédimentation et évaporation	144
IV. 1. Fabrication de membranes de CoPEC à base de chitosan et d'alginate par sédimentation et évaporation dans une plaque de 12 puits	144
IV. 1. 1. Fabrication de membranes de CoPEC chitosan/alginate par sédimentation et évaporation dans une plaque de 12 puits.....	144
IV. 1. 2. Fabrication de membranes de CoPEC β CD-chitosan/alginate par sédimentation et évaporation dans une plaque de 12 puits.....	146
IV. 2. Fabrication de membranes de CoPEC à base de chitosan et d'alginate par sédimentation et évaporation dans une plaque de 24 puits	148
IV. 2. 1. Fabrication de membranes de CoPEC chitosan/alginate par sédimentation et évaporation dans une plaque de 24 puits.....	148
IV. 2. 2. Fabrication de membranes de CoPEC β CD-chitosan/alginate par sédimentation et évaporation dans une plaque de 24 puits.....	149
V. Conclusion partielle	152
VI. Partie expérimentale	154
VI. 1. Généralités.....	154
VI. 2. Préparation de CoPEC à base de chitosan et d'alginate par ultracentrifugation	154
VI. 2. 1. Préparation de CoPEC chitosan/alginate par ultracentrifugation	154
VI. 2. 2. Préparation de CoPEC chitosan/ β CD-alginate par ultracentrifugation	155
VI. 2. 3. Préparation de CoPEC β CD-chitosan/ β CD-alginate par ultracentrifugation	156
VI. 2. 4. Préparation de CoPEC β CD-chitosan/alginate par ultracentrifugation	156
VI. 3. Préparation de microparticules de CoPEC	156
VI. 4. Préparation des échantillons pour les observations au MEB	156
VI. 5. Détermination de la composition du CoPEC β CD-chitosan/alginate	157
VI. 5. 1. Synthèse de l'alginate-rhodamine.....	157
VI. 5. 2. Préparation de CoPEC β CD-chitosan/alginate-rhodamine.....	158
VI. 5. 3. Détermination de la quantité d'alginate non incluse dans le CoPEC final	158
VI. 6. Préparation de CoPEC bruts poreux à base de chitosan et d'alginate.....	158
VI. 6. 1. Préparation de CoPEC brut chitosan/alginate poreux.....	158
VI. 6. 2. Préparation de CoPEC brut β CD-chitosan/alginate poreux.....	159
VI. 7. Préparation de microparticules poreuses de CoPEC	159
VI. 8. Préparation de membranes de CoPEC à base de chitosan et d'alginate par sédimentation et évaporation	159
VI. 8. 1. Préparation de membranes chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate par sédimentation et évaporation dans une plaque de 12 puits	159
VI. 8. 2. Préparation de membranes chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate par sédimentation et évaporation dans une plaque de 24 puits	160
Chapitre 4 : Premières évaluations biologiques de l'effet des CoPEC à base de chitosan et d'alginate fonctionnalisés avec la β-cyclodextrine	163
I. L'inflammation.....	167
I. 1. Le déroulement de la réponse inflammatoire	167
I. 2. Les médiateurs de la réponse inflammatoire.....	168
I. 2. 1. Les médiateurs de l'inflammation produits par les pathogènes.....	168
I. 2. 2. Les protéines du plasma.....	168
I. 2. 2. 1. Les protéines impliquées dans la coagulation	168
I. 2. 2. 2. Les protéines du système du complément	169
I. 2. 2. 3. Les protéines impliquées dans le système des kinines	169
I. 2. 3. Les médiateurs de l'inflammation produits par les leucocytes.....	169

II. Évaluation <i>in vitro</i> de l'impact des CoPEC à base de chitosan et d'alginate sur l'inflammation	171
II. 1. Démonstration de l'effet pro-inflammatoire des CoPEC contenant du β CD-alginate lors de tests <i>in vitro</i> préliminaires	171
II. 2. Évaluation biologique des CoPEC chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate	174
II. 2. 1. Modèle <i>in vitro</i> d'évaluation des propriétés anti-inflammatoires des matériaux à base d'associations chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate	174
II. 2. 2. Évaluation de la cytotoxicité des CoPEC chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate	175
II. 2. 3. Évaluation de l'effet des CoPEC chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate sur la production d'oxyde nitrique par des macrophages activés	176
II. 2. 4. Évaluation de l'effet des CoPEC chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate sur la production de TNF- α par des macrophages activés.....	179
II. 2. 5. Évaluation de l'éventuel piégeage du LPS et du TNF- α dans le CoPEC β CD-chitosan/alginate.....	180
II. 2. 5. 1. Évaluation de l'éventuel piégeage du LPS dans le CoPEC β CD-chitosan/alginate	180
II. 2. 5. 2. Évaluation de l'éventuel piégeage du TNF- α dans le CoPEC β CD-chitosan/alginate	183
II. 2. 6. Évaluation de l'effet des CoPEC chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate sur l'expression du marqueur d'activation CD40 par des macrophages activés.....	185
II. 2. 7. Évaluation de l'effet des CoPEC chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate sur l'expression du marqueur de prolifération Ki-67 par des macrophages activés	187
II. 3. Détermination du rôle des polyélectrolytes dans l'effet anti-inflammatoire des CoPEC chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate	189
III. Évaluation <i>in vitro</i> de l'impact de l'incorporation de molécules actives anti-inflammatoires sur les propriétés du CoPEC β CD-chitosan/alginate vis-à-vis de l'inflammation	191
III. 1. Stratégie d'inclusion de substances actives dans les CoPEC	191
III. 2. Évaluation de l'impact de l'incorporation de piroxicam sur les propriétés anti-inflammatoires du CoPEC β CD-chitosan/alginate.....	191
III. 2. 1. Le piroxicam	191
III. 2. 2. Incorporation de piroxicam dans les CoPEC	192
III. 2. 3. Extraction et dosage du piroxicam inclus dans les CoPEC.....	193
III. 2. 4. Évaluation de l'impact de l'inclusion de piroxicam dans le CoPEC β CD-chitosan/alginate sur la production d'oxyde nitrique par des macrophages activés	195
III. 2. 5. Évaluation de l'impact de l'inclusion de piroxicam dans le CoPEC β CD-chitosan/alginate sur la production de TNF- α par des macrophages activés.....	196
III. 3. Évaluation de l'impact de l'incorporation de prednisolone sur les propriétés anti-inflammatoires du CoPEC β CD-chitosan/alginate.....	197
III. 3. 1. La prednisolone.....	197
III. 3. 2. Incorporation de prednisolone dans les CoPEC	198
III. 3. 3. Extraction et dosage de la prednisolone incluse dans les CoPEC.....	198
III. 3. 4. Évaluation de l'impact de l'inclusion de prednisolone dans le CoPEC β CD-chitosan/alginate sur la production d'oxyde nitrique par des macrophages activés	200
III. 3. 5. Évaluation de l'impact de l'inclusion de prednisolone dans le CoPEC β CD-chitosan/alginate sur la production de TNF- α par des macrophages activés.....	201
III. 3. 6. Évaluation de l'effet d'un complexe d'inclusion β -cyclodextrine/prednisolone dans le cadre du modèle <i>in vitro</i> d'inflammation.....	202
III. 3. 6. 1. Préparation d'un complexe d'inclusion β -cyclodextrine/prednisolone	202
III. 3. 6. 2. Évaluation de l'effet du complexe d'inclusion β -cyclodextrine/prednisolone sur la production d'oxyde nitrique par des macrophages activés	202

IV. Développement d'une stratégie d'inclusion de molécules hydrophiles dans le CoPEC β CD-chitosan/alginate	204
IV. 1. Principe de la stratégie d'inclusion de molécules hydrophiles dans le CoPEC β CD-chitosan/alginate	204
IV. 2. Validation expérimentale de la stratégie d'inclusion de molécules hydrophiles dans le CoPEC β CD-chitosan/alginate dans le cas de la molécule d'adamantane contenant une fonction maléimide	206
IV. 2. 1. Synthèse de la rhodamine-SH comme sonde modèle	206
IV. 2. 2. Inclusion du <i>N</i> -adamantylméthyl maléimide dans des membranes chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate.....	208
IV. 2. 3. Réaction de la rhodamine-SH avec le <i>N</i> -adamantylméthyl maléimide inclus dans les membranes chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate	208
IV. 2. 4. Quantification de la rhodamine-SH incluse dans les membranes chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate.....	209
V. Conclusion partielle	212
VI. Partie expérimentale	214
VI. 1. Généralités.....	214
VI. 1. 1. Chimie.....	214
VI. 1. 2. Biologie.....	214
VI. 2. Quantification des différents marqueurs utilisés pour évaluer l'effet des matériaux sur les cellules.....	215
VI. 2. 1. Évaluation de la viabilité des cellules	215
VI. 2. 2. Quantification de la production d'oxyde nitrique par les macrophages	215
VI. 2. 3. Quantification de la production de TNF- α par les macrophages.....	216
VI. 2. 4. Quantification de la production d'IL-6 par les macrophages	216
VI. 2. 5. Quantification de l'expression de CD40 par les macrophages	216
VI. 2. 6. Quantification de l'expression de Ki-67 par les macrophages	217
VI. 3. Déroulement des tests biologiques <i>in vitro</i>	217
VI. 3. 1. Tests biologiques préliminaires sur les CoPEC contenant du β CD-alginate.....	217
VI. 3. 2. Déroulement global des tests <i>in vitro</i> pour l'évaluation de l'impact des CoPEC chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate sur l'inflammation.....	217
VI. 3. 3. Évaluation de l'éventuel piégeage du LPS dans le CoPEC β CD-chitosan/alginate.....	218
VI. 3. 4. Évaluation de l'éventuel piégeage du TNF- α dans le CoPEC β CD-chitosan/alginate	218
VI. 3. 5. Évaluation de l'impact de l'alginate, du chitosan et du β CD-chitosan sur l'activation des macrophages	219
VI. 4. Inclusion de substances actives dans les CoPEC chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate	219
VI. 4. 1. Inclusion de piroxicam dans les CoPEC chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate	219
VI. 4. 2. Inclusion de prednisolone dans les CoPEC chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate	220
VI. 5. Préparation d'un complexe d'inclusion β -cyclodextrine/prednisolone	220
VI. 6. Mise en place de la stratégie d'inclusion de molécules hydrophiles dans les CoPEC	221
VI. 6. 1. Synthèse de rhodamine-SH.....	221
VI. 6. 2. Inclusion de <i>N</i> -adamantylméthyl maléimide dans des membranes chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate.....	222
VI. 6. 3. Réaction entre la rhodamine-SH et le maléimide contenu dans les membranes chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate.....	222
VI. 6. 4. Dosage de la rhodamine-SH non incluse dans les membranes chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate.....	222

Conclusion générale et perspectives	223
Références	229
Publication associée	253

Abréviations

Ac	Acétone
Ac₂O	Anhydride acétique
ADN	Acide désoxyribonucléique
AINS	Anti-inflammatoire non-stéroïdien
ALP	Phosphatase alcaline
ANOVA	Analyse de variance
APTS	Acide paratoluènesulfonique
Avidine-HRP	Avidine-Peroxydase de raifort
βCD	β-cyclodextrine
Boc₂O	Dicarbonate de di-tert-butyle
BSA	Albumine de sérum bovin
CCM	Chromatographie sur couche mince
CD40	Cluster de différenciation 40
CD154	Cluster de différenciation 154
CoPEC	Complexes de polyélectrolytes compacts
COX	Cyclo-oxygénase
CSM	Cellules souches mésenchymateuses
DAMP	Motifs moléculaires associés aux dommages cellulaires
DIEA	<i>N, N</i> -Diisopropyléthylamine
DMAP	4-Diméthylaminopyridine
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMF	<i>N, N</i> -Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DS	Degré de substitution
EDC-HCl	Hydrochlorure de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EtOH	Éthanol
Et₃N	Triéthylamine
Et₂O	Éther
FDA	Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux

FT-IR	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
FVD	Fixable viability dye
HA	Hydroxyapatite
HBTU	Hexafluorophosphate Benzotriazole Tetramethyl Uronium
IFM	Intensité de fluorescence moyenne
IL-1	Interleukine 1
IL-1β	Interleukine 1 β
IL-6	Interleukine 6
IUPAC	Union internationale de chimie pure et appliquée
LbL	Layer by layer
LPS	Lipopolysaccharide
MAMP	Motifs moléculaires associés aux micro-organismes
MEB	Microscopie électronique à balayage
MeOH	Méthanol
NaPP	Poly(phosphate de sodium)
NaPSS	Poly(styrène sulfonate de sodium)
PA	Polyamides
PAA	Poly(acide acrylique)
PAF	Facteur d'activation plaquettaire
PAH	Poly(hydrochlorure d'allylamine)
PBS	Tampon phosphate salin
PC	Polycarbonate
PDADMA	Poly(diallyldiméthylammonium)
PDMAEMA·HCl	Poly(hydrochlorure de <i>N, N</i> -diméthylaminoéthyl méthacrylate)
PE	Polyéthylène
PE-BD	Polyéthylène basse densité
PEC	Complexe de polyélectrolytes
PE-HD	Polyéthylène haute densité
PEEK	Polyétheréthercétone
PEG	Polyéthylène glycol
PEI	Polyéthylèneimine
PET	Polytéréphtalate d'éthylène
PFA	Paraformaldéhyde
PHEMA	Poly(2-hydroxyéthyl) méthacrylate

PI	Polyimides
PLLA	Acide poly(L-lactique)
PM	Poids moléculaire
PMAA	Poly(acide méthacrylique)
PMMA	Poly(méthacrylate de méthyle)
PP	Polypropylène
PSS	Poly(styrène sulfonate)
PTFE	Polytétrafluoroéthylène
PU	Polyuréthane
PVA	Acide polyvinylique
PVBTA	Poly(chlorure de vinylbenzyltriméthylammonium)
PVDF	Poly(fluorure de vinylidène)
PyBOP	Benzotriazole-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphate
q-PEC	Complexe de polyélectrolytes quasi-soluble
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RPMI	Roswell park memorial institute medium
SVF	Sérum de veau fœtal
TFA	Acide trifluoroacétique
TGF-β3	Facteur de croissance transformant β3
TMB	3, 3', 5, 5'-Tétraméthylbenzidine
TNF-α	Facteur de nécrose tumorale α
UV	Ultra-violet

Avant-propos

De nos jours, de nombreuses maladies à long terme, appelées maladies chroniques, touchent de plus en plus de personnes à travers le monde. Plusieurs maladies chroniques liées à l'inflammation, telles que la polyarthrite rhumatoïde, l'arthrose ou le cancer, sont notamment particulièrement redoutables et nécessitent encore le développement de thérapies efficaces. Une des difficultés principales de cette problématique réside dans le fait que ces maladies chroniques nécessitent généralement une thérapie sur une longue période, entraînant alors des interventions médicales régulières pouvant être accablantes pour les patients. Pour répondre à cette problématique, des biomatériaux capables de véhiculer et libérer de manière contrôlée des substances actives constituent une voie très prometteuse pour le développement de solutions efficaces et adaptées au traitement des maladies chroniques. En effet, il peut être imaginé qu'un biomatériau, sous la forme d'implant par exemple, ayant la capacité de libérer une substance active de manière prolongée, pourrait présenter des effets appropriés et limiter le nombre d'interventions médicales en cours de traitement.

Dans ce contexte, l'équipe 3Bio du Laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives, au sein de laquelle s'est déroulée cette thèse, mène actuellement des travaux de recherche sur des biomatériaux à base de complexes de polyélectrolytes. Formulés selon un procédé bien établi de compaction de ces complexes, ces biomatériaux présentent un caractère plastique et des propriétés mécaniques compatibles avec leur utilisation dans le domaine biomédical. Ces biomatériaux ont d'abord été fabriqués au laboratoire à partir de poly(hydrochlorure d'allylamine) et de poly(acide acrylique) et, ayant démontré des propriétés très intéressantes en vue d'une application dans le domaine biomédical, la procédure a récemment été appliquée à un couple de polyélectrolytes biosourcés, le chitosan et l'alginate.

Afin de développer, à partir de ces biomatériaux à base de chitosan et d'alginate, des systèmes capables de véhiculer des substances actives, notamment anti-inflammatoires, la stratégie appliquée au cours de ces travaux de thèse a été de fonctionnaliser les polyélectrolytes de départ avec la β -cyclodextrine, une molécule-cage connue pour sa capacité à former des complexes d'inclusion réversibles avec de nombreuses molécules hydrophobes et en particulier avec des substances actives.

Dans ce manuscrit, un premier chapitre consistera en un état de l'art portant sur les biomatériaux et en particulier sur les biomatériaux à base de complexes de polyélectrolytes.

Un second chapitre abordera les différentes synthèses chimiques réalisées au cours de cette thèse, notamment celles concernant la fonctionnalisation des polyélectrolytes par la β -cyclodextrine. Les différents matériaux formulés à partir des polyélectrolytes fonctionnalisés ou non par la β -cyclodextrine, ainsi que leur caractérisation, seront présentés dans un troisième chapitre. Enfin, dans un quatrième et dernier chapitre, les différentes évaluations biologiques *in vitro* menées sur les matériaux développés, seuls ou contenant une substance active anti-inflammatoire (le piroxicam ou la prednisolone), seront détaillées. Des travaux préliminaires concernant le développement d'une méthode d'inclusion de tout type de molécules dans les matériaux développés seront également exposés dans ce dernier chapitre.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont donné lieu à un article publié dans un journal scientifique et à plusieurs communications orales et par affiche lors de congrès nationaux et internationaux :

❖ Article publié

- Alexandre Hardy, Cendrine Seguin, Anaïs Brion, Philippe Laval, Pierre Schaaf, Sylvie Fournel, Line Bourel-Bonnet, Benoît Frisch* et Marcella De Giorgi*, “ β -Cyclodextrin-Functionalized Chitosan/Alginate Compact Polyelectrolyte Complexes (CoPECs) as Functional Biomaterials with Anti-Inflammatory Properties ”, *ACS Applied Materials and Interfaces* 10, 29347-29356, 2018.

❖ Communications orales

- Alexandre Hardy, “ Synthesis, Functionalization and Evaluation of Biomacromolecules Complexes towards Tissue Engineering ”, Forum BioChem 2016, 2 juin 2016, Illkirch ;
- Alexandre Hardy, “ β -Cyclodextrin-linked Chitosan/Alginate Compact Polyelectrolyte Complexes (CoPECs) as Natural and Functional Biomaterials with Intrinsic Anti-Inflammatory Activity ”, 3rd Annual Conference and Expo on Biomaterials, 5 mars 2018, Berlin.

❖ Communications par affiche

- Alexandre Hardy, Marcella De Giorgi, Anais Brion, Maria Vittoria Spanedda, Béatrice Heurtault, Sylvie Fournel, Pierre Schaaf, Philippe Laval, Line Bourel-Bonnet et Benoît Frisch, “ Synthesis, Functionalization and Evaluation of Biomacromolecules Complexes towards Tissue Engineering ”, Forum BioChem 2016, 2-3 juin 2016, Illkirch ;
- Alexandre Hardy, Marcella De Giorgi, Anais Brion, Maria Vittoria Spanedda, Béatrice Heurtault, Sylvie Fournel, Cendrine Seguin, Pierre Schaaf, Philippe Laval, Line Bourel-Bonnet et Benoît Frisch, “ Compact Biomacromolecules Complexes as New Carriers for Anti-Inflammatory Drug Delivery ”, 24ème édition des Journées Jeunes Chercheurs de la Société de Chimie Thérapeutique, 8-10 février 2017, Châtenay-Malabry ;
- Alexandre Hardy, Marcella De Giorgi, Anais Brion, Sylvie Fournel, Cendrine Seguin, Pierre Schaaf, Philippe Laval, Line Bourel-Bonnet et Benoît Frisch, “ Compact Polyelectrolyte Complexes as New Bioactive Biomaterials for Regenerative Medicine ”, JCI 2017, 27-28 mars 2017, Illkirch ;
- Alexandre Hardy, Marcella De Giorgi, Cendrine Seguin, Anais Brion, Pierre Schaaf, Philippe Laval, Sylvie Fournel, Line Bourel-Bonnet et Benoît Frisch, “ Natural β -cyclodextrin-linked Chitosan/Alginate Compact Polyelectrolyte Complexes as Bioactive Biomaterial for Combination Therapy ”, Journée thématique “Matériaux pour la Santé”, 16 janvier 2018, Reims ;
- Alexandre Hardy, Marcella De Giorgi, Cendrine Seguin, Anais Brion, Pierre Schaaf, Philippe Laval, Sylvie Fournel, Line Bourel-Bonnet et Benoît Frisch, “ β -Cyclodextrin-linked Chitosan/Alginate Compact Polyelectrolyte Complexes (CoPECs) as Natural and Functional Biomaterials with Intrinsic Anti-Inflammatory Activity ”, 3rd Annual Conference and Expo on Biomaterials, 5-6 mars 2018, Berlin ;
- Marcella De Giorgi, Alexandre Hardy, Cendrine Seguin, Anais Brion, Joseph Hemmerlé, Philippe Laval, Pierre Schaaf, Sylvie Fournel, Line Bourel-Bonnet et Benoît Frisch, « Natural β -cyclodextrin-linked chitosan/alginate Compact Polyelectrolyte Complexes (CoPECs): New Biomaterials with Intrinsic Anti-inflammatory Activity », RICT 2018, 4-6 juillet 2018, Strasbourg.

Chapitre 1 : État de l'art

Au cours de ce chapitre introductif faisant un état de l'art relatif au domaine des biomatériaux, une première partie consistera en une description générale des quatre principales familles de biomatériaux ayant déjà trouvé de nombreuses applications dans le domaine biomédical, c'est-à-dire les biomatériaux métalliques, céramiques, polymériques et composites. Une seconde partie s'intéressera à un type particulier de matériaux polymériques, les complexes de polyélectrolytes, qui sont actuellement en cours de développement et qui sont très prometteurs pour des utilisations dans le domaine biomédical. Enfin, une troisième partie concernera les Complexes de Polyélectrolytes Compacts, ou CoPEC, qui constituent un type particulier de forme pouvant être prise par ces complexes de polyélectrolytes et qui ont été utilisés lors de la réalisation de ces travaux de thèse.

I. Les biomatériaux

I. 1. Généralités

Les biomatériaux ont été définis en 1982 par la *National Institutes of Health Consensus Development Conference* comme « toute substance (autre qu'un médicament) ou combinaison de substances, d'origine synthétique ou naturelle, pouvant être utilisée sur une durée variable, en tant que système ou partie de système traitant, accroissant ou remplaçant tout tissu, organe ou fonction du corps ». Ils font de nos jours partie intégrante du domaine médical et se retrouvent notamment dans des applications très courantes telles que les lentilles de contact, les prothèses auditives ou encore les implants orthopédiques et dentaires.¹

Dans l'histoire, le développement des biomatériaux a connu trois générations distinctes. Dans un premier temps, les biomatériaux développés devaient être inertes et biocompatibles, afin de ne causer aucun dommage au tissu biologique traité ou limitrophe. Dans un second temps, des biomatériaux bioactifs pouvant se lier au tissu hôte ont été développés. Enfin, de nos jours, l'objectif principal est le développement de biomatériaux biodégradables pouvant se dégrader une fois leur action terminée, et laisser ainsi place à des tissus naturels.²

L'utilisation des biomatériaux dépend de divers paramètres :¹

- La réponse de l'hôte, définie comme la réponse locale ou systémique de l'organisme d'accueil au matériau implanté ;
- La biocompatibilité, correspondant à la capacité du matériau à exister au contact des tissus biologiques humains sans causer de dommage intolérable à l'organisme ;
- La biofonctionnalité, c'est-à-dire le fait d'occuper des fonctions physique et mécanique spécifiques ;
- La non-toxicité, excepté dans les cas spécifiques où la toxicité est souhaitée (le ciblage de cellules cancéreuses par exemple) ;
- La facilité de mise en forme ;

- Les propriétés mécaniques du matériau, telles que la résistance à la traction, à la corrosion, à l'usure et à la fatigue,* le module élastique,** la limite d'élasticité ou encore la dureté.

Ces biomatériaux émergent de quatre grandes familles de matériaux : les métaux, les céramiques, les polymères et les composites.

I. 2. Les biomatériaux métalliques

Les biomatériaux métalliques peuvent être classés selon quatre groupes distincts, (i) les aciers inoxydables, (ii) les alliages à base de cobalt, (iii) les alliages à base de titane et (iv) les autres métaux divers (alliages à base de magnésium, de tantale et de zirconium, argent). Les trois premiers groupes sont actuellement les plus productifs et ont mené à de nombreux biomatériaux, approuvés par la FDA et utilisés de manière routinière, principalement dans le domaine orthopédique.²

I. 2. 1. Les aciers inoxydables

Les aciers inoxydables sont des alliages à base de fer contenant une proportion importante de chrome (entre 11 et 30 %) et une proportion variable de nickel. Ceux utilisés en tant que biomatériaux ont l'avantage d'être peu coûteux mais présentent néanmoins plusieurs inconvénients dans l'optique d'une utilisation sur le long terme, tels qu'une faible résistance à la fatigue, la corrosion et l'usure ainsi qu'une toxicité et carcinogénicité du nickel et du chrome qu'ils relarguent. Ainsi, ils sont principalement utilisés dans des dispositifs temporaires tels que des fils chirurgicaux ou des broches par exemple (**Tableau 1**). L'Orthinox, un acier inoxydable à forte teneur en azote, constitue cependant une exception car il présente des résistances à la corrosion et à la fatigue plus importantes que les aciers inoxydables « classiques ». Il est ainsi utilisé pour des applications à plus long terme comme dans divers types de prothèse (**Tableau 1**).²

* Phénomène de fracture intervenant à la suite d'un nombre important de cycles de charge.³

** Grandeur reliant la contrainte imposée à un matériau à la déformation du matériau engendrée par cette contrainte.

I. 2. 2. Les alliages à base de cobalt

Le cobalt, du fait de sa nature cristalline (présentant d'une part une structure hexagonale compacte et d'autre part une structure cubique à faces centrées), permet à ces alliages d'avoir une meilleure résistance à la fatigue et à l'usure que les aciers inoxydables. Le cobalt est généralement associé au chrome qui permet d'augmenter la résistance à la corrosion et à l'usure des matériaux finaux. Plusieurs autres éléments peuvent être ajoutés au cobalt et au chrome afin d'affiner les propriétés du matériau final.² Le molybdène et le nickel permettent d'augmenter encore la résistance à la corrosion et d'augmenter le renforcement des solutions solides obtenues. Du fait de leurs très bonnes propriétés, les principaux alliages contenant ces éléments (Co-28Cr-6Mo) sont utilisés pour des applications à long terme comme dans les prothèses articulaires par exemple (**Figure 1**) (**Tableau 1**). Le tungstène permet lui-aussi le renforcement des solutions solides finales mais peut également engendrer une diminution de la résistance à la corrosion. Les alliages contenant ce tungstène (Co-20Cr-15W-10Ni et Co-Ni-Cr-Mo-W-Fe) sont donc plutôt utilisés pour des applications à court terme telles que dans les plaques à os par exemple (**Tableau 1**).²



Figure 1 : Composants d'une prothèse fémorale en alliage Co-28Cr-6Mo. Selon Chen et al.²

Les alliages à base de cobalt sont très utilisés de nos jours mais présentent néanmoins quelques inconvénients. Ils sont en effet coûteux et peuvent engendrer un relargage du cobalt, du nickel et du chrome qu'ils contiennent, qui sont des éléments reconnus comme toxiques. Du fait de l'importance de leur module élastique (220-230 GPa) par rapport à celui de l'os (10-30 GPa), ils sont également sujets à l'effet de déviation de contrainte* qui fait glisser le matériau par rapport à l'os, détériorant ainsi l'interface entre ces deux éléments et pouvant

* Distribution inégale de l'énergie provenant de la propagation des ondes de choc durant l'utilisation d'un matériau.

mener, à terme, à une perte osseuse et à une fracture de l'os ou de l'implant, accélérant finalement sa détérioration.²

I. 2. 3. Les alliages à base de titane

Le titane est un élément présentant intrinsèquement une très bonne résistance à la corrosion. Il présente deux structures cristallines distinctes : une structure hexagonale compacte (phase α) et une structure cubique centrée (phase β) avec une température de transition entre les deux phases d'environ 885 °C. Le titane est utilisé sous forme brute non alliée ou sous forme d'alliages qui sont répartis en quatre groupes selon leur microstructure après usinage : les alliages α , proche α , α - β et β . De nos jours, les principaux biomatériaux à base de titane sont faits de titane brut non allié ou d'alliages α - β , mais il y a un intérêt grandissant porté aux alliages β , présentant notamment des propriétés mécaniques plus avantageuses.²

Différents éléments peuvent être associés au titane afin d'ajuster les propriétés mécaniques des matériaux finaux et, selon que ces éléments augmentent ou décroissent la température de transition entre les phases α et β , leur addition est dite α ou β -stabilisante. Les principaux éléments associés au titane pour la fabrication d'implants médicaux sont l'aluminium (α -stabilisant), le vanadium, le niobium, le molybdène, le fer, le tantale (β -stabilisants) et le zirconium (neutre).²

Les alliages de titane sont plus résistants à la corrosion et présentent une meilleure biocompatibilité que les aciers inoxydables et les alliages à base de cobalt. Ils ont également un module élastique (105-125 GPa) plus proche de celui des os (10-30 GPa). L'alliage α - β Ti-6Al-4V et sa version de très faible teneur en interstices (Ti-6Al-4V ELI) sont les plus utilisés de ces alliages pour des applications médicales, avec le titane brut non allié. Les biomatériaux à base de titane pur sont utilisés pour des applications où ils ne subissent pas de charge, tandis que les alliages α - β , aux meilleures propriétés mécaniques, sont plutôt utilisés dans des applications où ils sont mécaniquement sollicités (voir leurs applications en **Tableau 1**).²

Tout comme les aciers inoxydables et les alliages à base de cobalt, les alliages de titane sont des biomatériaux fortement utilisés mais ne sont néanmoins pas parfaits. Les alliages α - β présentent notamment une faible résistance au cisaillement et les alliages β une faible résistance à l'usure.²

Tableau 1 : Exemples d'applications des trois principaux groupes de biomatériaux métalliques.

Biomatériaux métalliques			Applications
Aciers inoxydables	Aciers inoxydables « classiques »		Vis, broches et plaques à os, clous et tiges intramédullaires, fixations internes de fracture, fils chirurgicaux
	Orthinox		Prothèses de hanche, d'épaule, de genou, de cheville, de gros orteil
Alliages à base de cobalt	Co-28Cr-6Mo		Prothèses articulaires métal sur métal, prothèses de hanche, de genou, de cheville
	Co-20Cr-15W-10Ni Co-Ni-Cr-Mo-W		Fils et plaques à os
Alliages à base de titane	Titane brut non allié		Implants dentaires, vis et agrafes pour la chirurgie spinale, implants maxillo-faciaux
	Alliages α - β	Ti-6Al-4V Ti-6Al-4V ELI	Prothèses de hanche, de genou, d'épaule, de coude, de poignet, implants dentaires
		Ti-6Al-7Nb	Plaques de fixation de fractures, vis, clous, tiges et fils chirurgicaux
		Ti-3Al-2,5Fe	Clous intramédullaires
	Alliages β	Ti-Mo-Zr-Fe	Prothèses de hanche

Ainsi, les biomatériaux métalliques sont très utilisés de nos jours et ce, tout particulièrement pour des applications à long terme, dans des conditions où ils sont fortement sollicités mécaniquement (par exemple dans le cas des prothèses articulaires). Néanmoins, des recherches sont encore à mener pour améliorer ces matériaux afin d'éliminer les quelques limitations de propriétés rencontrées dans les différents groupes de biomatériaux métalliques. En particulier, des biomatériaux métalliques de troisième génération (biodégradables) sont

actuellement au stade de recherche.² Dans ce contexte, les alliages à base de magnésium paraissent très prometteurs. Ils présentent en effet des propriétés mécaniques proches de celles de l'os et se dégradent au contact des environnements salins du corps humain, tandis que les principaux éléments de ces alliages, le magnésium et le calcium, sont tolérés par le corps. Néanmoins, un problème majeur restant à résoudre dans le développement de ces alliages concerne la libération d'hydrogène lors de leur biodégradation. En effet, lorsque cette libération est trop importante, elle mène à la formation de bulles de gaz sous-cutanées. Ces bulles peuvent alors provoquer des séparations de couches de tissus biologiques et également entraver le flux sanguin.⁴

I. 3. Les biomatériaux céramiques

Les céramiques sont des matériaux polycristallins caractérisés par leur dureté, leur faible densité, leur raideur, leur résistance mécanique, à la corrosion et à l'usure, mais aussi par leur fragilité. Cinq céramiques sont principalement utilisées en tant que biomatériaux :¹

- L'alumine (Al_2O_3), présentant une très bonne résistance mécanique, à la corrosion et à l'usure ainsi qu'un caractère biocompatible ;
- Le carbone pyrolytique, ayant la particularité d'avoir notamment des propriétés mécaniques similaires à celles des os et de ne pas être sujet à la fatigue ;
- La zircone (ZrO_2), dotée d'une bonne résistance mécanique et à la rupture ;
- Les vitrocéramiques et bioverres, qui ont la particularité de subir une modification de surface une fois implantés dans le corps leur permettant, par exemple, de se lier aux os ;
- Les phosphates de calcium, disponibles sous différentes formes physiques et ayant pour principale particularité leur porosité.

L'alumine, le carbone pyrolytique et la zircone sont dit inertes, c'est-à-dire qu'ils conservent leur structure et n'induisent pas de réponse immunologique après implantation dans le corps. Les vitrocéramiques et bioverres, quant à eux, sont dits bioactifs dans le sens où ils forment des liens chimiques avec les os et tissus mous des organismes vivants. Enfin, les phosphates de calcium sont qualifiés de biorésorbables car ils se dégradent par hydrolyse dans le corps et sont alors remplacés par de nouveaux tissus naturels ; les produits de dégradation de ces matériaux sont alors métaboliquement pris en charge par le corps.¹

Malgré leur fragilité, justifiant leur utilisation moins abondante que les biomatériaux métalliques ou polymériques, les céramiques se retrouvent dans diverses applications, principalement dans les domaines de la dentisterie (**Figure 2**) et orthopédique (**Tableau 2**).¹

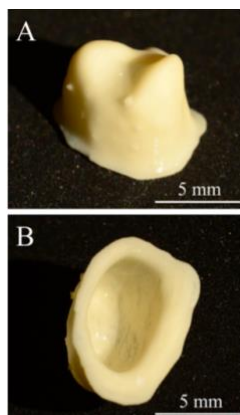


Figure 2 : Vues A) externe et B) interne d'une armature de couronne dentaire en alumine préparée par lithographie. Adapté du travail de Dehurtevent et al.⁵

Tableau 2 : Exemples d'application des principaux biomatériaux céramiques.¹

Biomatériaux céramiques	Applications
Alumine	Implants dentaires, espaceurs et extenseurs de vertèbres, composants fémoraux, prothèses articulaires totales
Carbone pyrolytique	Valves cardiaques, membres artificiels, implants dentaires
Zircone	Prothèses de hanche, de genou, de dent, de tendon ou de ligament, produits de comblement osseux
Bioverres	Implants dentaires, valves cardiaques, prothèses articulaires totales, plaques, vis et fils chirurgicaux, clous intramédullaires
Phosphates de calcium	Implants dentaires, reconstructions de mâchoire, d'oreille, de nez ou de gorge

Les céramiques sont donc des matériaux intéressants pour des applications médicales, plus particulièrement dans des applications dans lesquelles elles sont sollicitées en

compression. En revanche, du fait de leurs faibles propriétés en traction, elles sont inadaptées pour des applications dans lesquelles elles seraient sollicitées selon ce type de force.

I. 4. Les biomatériaux polymériques

Du fait notamment de leur facilité de fabrication, de leur flexibilité et de leur biocompatibilité, les polymères sont des matériaux de premier choix pour le développement de biomatériaux.⁶ La consommation annuelle en biomatériaux polymériques est ainsi estimée à plus de 8000 kilotonnes.⁷ De nos jours, bien que de nombreux travaux de recherche soient dirigés vers le développement de matériaux à base de polymères naturels, les principaux polymères utilisés dans des applications commerciales en tant que biomatériaux sont synthétiques et peuvent être classés en neuf catégories : le polyéthylène, le poly(méthacrylate de méthyle), le polypropylène, le polytétrafluoroéthylène, le polyuréthane, le poly(fluorure de vinylidène), les polyamides, les polyimides et les silicones.

I. 4. 1. Le polyéthylène

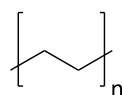


Figure 3 : Structure du polyéthylène.

Il existe deux grandes catégories de polyéthylène (PE) : les PE à basse (PE-BD) et haute densité (PE-HD), respectivement présentant un faible et un haut poids moléculaire. En fonction de ce poids moléculaire, les polymères correspondants ont des propriétés variables (par exemple, un PE ayant un haut poids moléculaire sera robuste tandis qu'un PE ayant un bas poids moléculaire sera plutôt élastique) ce qui permet de les adapter en fonction de l'application envisagée. Les PE sont légers, résistants chimiquement et présentent une faible température de fusion (141 °C)⁸ ainsi qu'une capacité à sécher rapidement, ce qui facilite leur mise en forme. Ils présentent néanmoins un important coefficient de friction.⁶

Le PE trouve diverses applications médicales, tout particulièrement dans le domaine des prothèses, notamment dans le remplacement de la hanche⁹ mais également dans d'autres types d'interventions chirurgicales comme par exemple dans le cadre de rhinoplasties.¹⁰

I. 4. 2. Le poly(méthacrylate de méthyle)

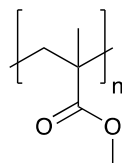


Figure 4 : Structure du poly(méthacrylate de méthyle).

Le poly(méthacrylate de méthyle) (PMMA) est un polymère présentant les avantages d'avoir une importante résistance mécanique tout en ayant une faible masse. Cependant, il est très peu sujet à l'ostéo-intégration, ce qui limite son utilisation au contact des os s'il ne subit pas de traitement spécifique avant implantation.

Le PMMA a été très étudié dans de nombreuses applications médicales, comme par exemple pour la formulation de lentilles intraoculaires,¹¹ en tant qu'implant injectable en rhinoplastie¹² ou encore comme implant en cranioplastie.¹³

I. 4. 3. Le polypropylène

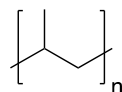


Figure 5 : Structure du polypropylène.

Le polypropylène (PP) peut se retrouver sous la forme d'un homo- ou d'un co-polymère et, selon le type de polymère, il présente des propriétés mécaniques variables ce qui permet d'ajuster ces dernières en fonction de l'application visée. Il présente cependant l'inconvénient de ne pas être dégradabile. De plus, étant un matériau semi-rigide, il peut causer une gêne chez le patient.⁶ En outre, un doute subsiste de nos jours quant à la biocompatibilité de ce polymère. En effet, Scheidbach *et al.*¹⁴ et Zheng *et al.*¹⁵ ont montré que certains types de PP peuvent induire une réponse inflammatoire très prononcée *in vivo*.

Les problèmes de biocompatibilité rencontrés avec le PP sont à l'origine de leur utilisation limitée de nos jours en tant qu'implant médical. Son caractère non-dégradable a cependant été largement utilisé à profit dans le cadre d'applications en chirurgie de la hernie inguinale.¹⁴ Le PP a aussi été utilisé en urogynécologie, sous la forme de treillis chirurgicaux pour renforcer des tissus affaiblis et pour soutenir la croissance de nouveaux tissus.⁶

I. 4. 4. Le polytétrafluoroéthylène

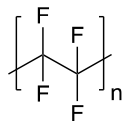


Figure 6 : Structure du polytétrafluoroéthylène.

Le polytétrafluoroéthylène (PTFE), commercialement appelé TeflonTM, présente une bonne résistance mécanique et a les avantages d'être chimiquement inerte et hydrophobe. Il est cependant rigide et peut être endommagé lorsqu'il est sollicité en traction.⁶

Le PTFE est souvent utilisé en tant que revêtement. Par exemple, des endoprothèses œsophagiennes en nitrinol recouvertes de PTFE sont apparues comme particulièrement adaptées dans le cadre du traitement du rétrécissement malin de l'œsophage.¹⁶ Le PTFE est en effet notablement adapté dans le cadre de ce type de traitement car il permet d'empêcher la croissance de tissus biologiques.¹⁷

I. 4. 5. Le polyuréthane

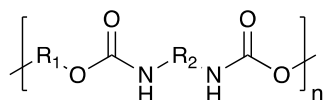


Figure 7 : Structure du polyuréthane. R1 = chaîne hydrocarbonée ayant impliqué une fonction alcool lors de la synthèse du polymère et R2 = chaîne hydrocarbonée.¹⁸

Le polyuréthane (PU) est un matériau robuste, doté d'une bonne bio- et hémocompatibilité, d'une faible perméabilité à l'eau et d'un faible coefficient de friction. Il est néanmoins sujet à des fissurations sous contraintes ainsi qu'à des attaques chimiques *in vivo* pouvant mener à sa dégradation.⁶

Le PU peut être utilisé dans le domaine médical pour recouvrir des implants, notamment dans le cas d'implants mammaires^{19, 20} et également sous la forme de mousse en tant que comblement dans le cas de traumatismes comme par exemple de la muqueuse de l'oreille moyenne.²¹

I. 4. 6. Le poly(fluorure de vinylidène)

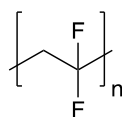


Figure 8 : Structure du poly(fluorure de vinylidène).

Le poly(fluorure de vinylidène) (PVDF) est un matériau chimiquement inerte caractérisé par sa forte résistance à l'hydrolyse, sa rigidité, sa résistance et sa biocompatibilité. Il présente également un effet piézoélectrique, c'est-à-dire qu'il est capable de se polariser électriquement lorsqu'il est soumis à une contrainte mécanique. Il présente cependant une faible stabilité thermique et une mauvaise adhérence à d'autres matériaux, ce qui limite ses applications, notamment dans le cas de matériaux composites.⁶

L'inertie chimique du PVDF est à l'origine de son potentiel d'utilisation en tant que treillis chirurgical ou dans le cadre de sutures par exemple.⁶ Son effet piézoélectrique, quant à lui, le rend très intéressant pour des applications dans la cicatrisation de plaies. Guo *et al.*²² ont par exemple montré qu'en appliquant une pression à un échafaudage polymérique contenant du PVDF, la migration de fibroblastes peut être accentuée et par conséquent la vitesse de cicatrisation d'une plaie peut être augmentée.

I. 4. 7. Les polyamides

Le principal polyamide (PA) utilisé dans le domaine des biomatériaux est le nylon ou polyamide 6-6 (**Figure 9**).

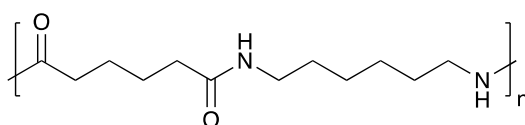


Figure 9 : Structure du polyamide 6-6.

Le polyamide 6-6 présente les avantages de ne causer qu'une légère réactivité des tissus avec lesquels il est en contact, d'empêcher la contamination bactérienne, d'avoir une résistance à la traction à long terme et une importante élasticité. En revanche, il est perméable à l'humidité et présente un important coefficient de friction.⁶ Il est principalement utilisé dans

des matériaux composites afin, par exemple, d'améliorer leurs propriétés mécaniques ou de leur apporter sa capacité à empêcher la contamination bactérienne.²³

I. 4. 8. Les polyimides

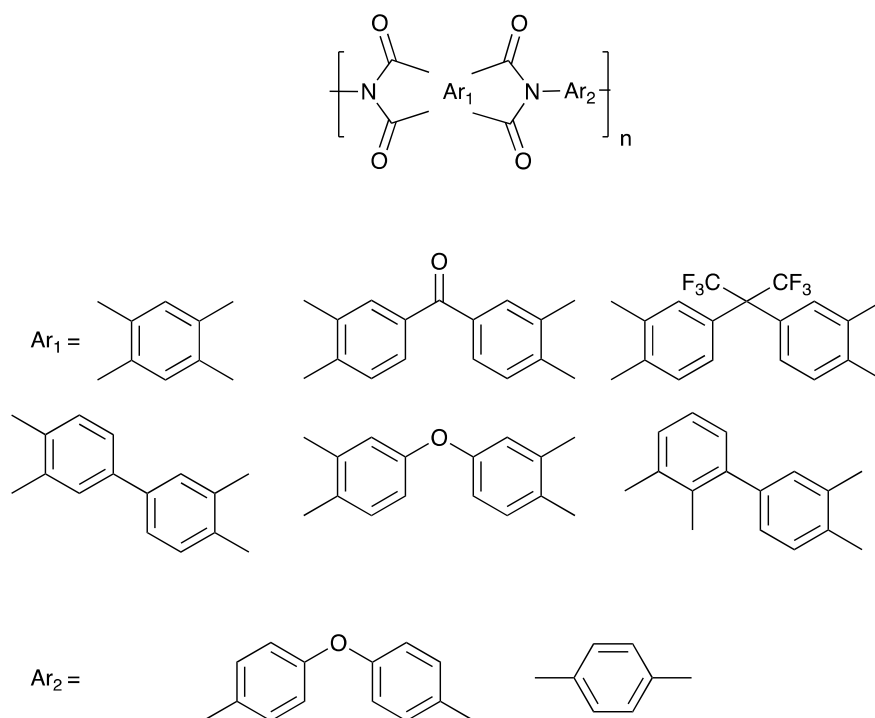


Figure 10 : Structure des polyimides.²⁴

Les polyimides (PI) représentent une classe de polymère aux très nombreuses propriétés avantageuses pour le domaine biomédical. Ils présentent une bonne résistance chimique, de bonnes propriétés mécaniques (faible sensibilité au fluage,* importante résistance à la traction, flexibilité) et sont stables en température (parfois jusqu'à plus de 500 °C).²⁶ En outre, ils présentent une transmittance élevée sur une large gamme de longueurs d'onde.⁶

Les propriétés de stabilité chimique et thermique des PI peuvent être mises à profit dans le développement de capteurs, comme par exemple pour la surveillance d'implants de genou.²⁷ Leurs propriétés mécaniques peuvent quant à elles être utilisées dans le cadre du développement de matériaux de protection, comme par exemple de gaines protectrices de multi-électrodes.²⁸ Les propriétés de transmittance des PI permettent également de les utiliser pour des applications médicales. Kwon *et al.*²⁹ ont par exemple utilisé une rangée de micro-

* Déformation plastique progressive et dépendante du temps sous l'effet d'une charge constante.²⁵

diodes électroluminescentes fabriquées à partir d'un polyimide (le Pyralux®AP) afin d'enregistrer l'activité corticale dans le cadre du développement d'une interface cerveau-machine.³⁰

I. 4. 9. Les silicones

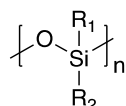


Figure 11 : Structure générale d'une silicone. R1 et R2 = Radicaux organiques monovalents.³¹

Les silicones sont des polymères ayant une chaîne principale inorganique et présentant de nombreuses propriétés intéressantes dans le cadre de leur utilisation dans le domaine médical. Elles sont notamment chimiquement inertes, peu toxiques, biocompatibles, stables en température (certaines jusqu'à plus de 200 °C)³² et présentent une importante perméabilité au gaz. Elles présentent cependant un important coefficient de friction.⁶

Les silicones trouvent de nombreuses applications dans le domaine médical, notamment en tant qu'implants, par exemple en chirurgie du larynx³³ et également en chirurgie esthétique (**Figure 12**).^{34, 35}

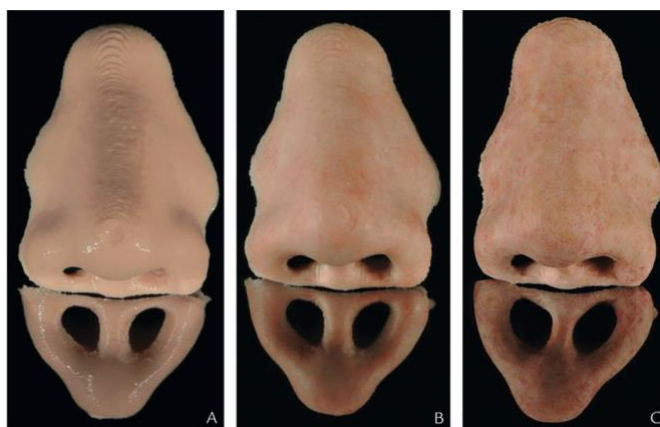


Figure 12 : Prothèse de nez en silicone A) juste après impression 3D, B) après revêtement et coloration et C) après polissage. Selon Unkovskiy et al.³⁵

Le **Tableau 3** récapitule différents exemples d'application des principaux biomatériaux polymériques synthétiques.

Tableau 3 : Exemples d'application des principaux polymères synthétiques utilisés pour la formulation de biomatériaux.

Polymère	Exemples d'application
PE	Implants en rhinoplastie et dans les prothèses de la hanche
PMMA	Lentilles intraoculaires, implants en rhinoplastie et en cranioplastie
PP	Treillis chirurgicaux en chirurgie de la hernie inguinale et en urogynécologie
PTFE	Revêtements d'endoprothèses
PU	Revêtements d'implants mammaires, mousses pour le comblement de traumatismes
PVDF	Treillis chirurgicaux, matériels de suture et de cicatrisation
PI	Capteurs pour la surveillance d'implants, protection de matériels chirurgicaux
Silicones	Implants en chirurgie du larynx et en chirurgie esthétique

Ainsi, de nombreux polymères sont couramment utilisés pour la formulation de biomatériaux. L'attractivité présentée par ces polymères dans ce domaine peut notamment se justifier par la facilité avec laquelle ces matériaux peuvent généralement être mis en forme. Chaque polymère possédant des propriétés, notamment mécaniques, propres, ils peuvent alors se retrouver dans des applications médicales diverses, allant du revêtement de prothèses aux lentilles intraoculaires.

I. 5. Les biomatériaux composites

Par définition, un composite forme un système constitué de deux, ou plus, matériaux qui diffèrent au niveau de leurs propriétés chimiques et physiques et qui ne sont pas solubles les uns dans les autres. Le constituant primaire de ce type de matériau, appelé la matrice, fournit notamment l'intégrité structurale de l'ensemble. Les autres constituants, appelés les renforts, ont pour rôle principal de renforcer les propriétés mécaniques et tribologiques* du système. Les différents constituants d'un matériau composite peuvent être organiques (polymères), inorganiques (céramiques et verres) ou métalliques. Le plus souvent, les renforts se trouvent sous la forme de fibres, qui peuvent être courtes ou longues, de particules ou de

* Propriétés liées au frottement.

trichites*. Enfin, une dernière phase, appelée l'interface, permet de lier les deux autres phases ensemble et d'assurer la bonne distribution des charges lorsque le matériau est mécaniquement sollicité.³⁶ Les composites sont donc souvent des matériaux qui sont conçus afin d'atteindre des exigences chimiques, physiques ou mécaniques spécifiques³⁷ et trouvent alors des applications dans des domaines variés, tels que l'aérospatial, l'automobile, l'électrique ou encore le médical.³⁸

En particulier, les composites trouvent de très nombreuses applications dans le domaine des biomatériaux et ce, dans différentes spécialités médicales. Ils sont notamment utilisés :³⁷

- en dentisterie. Ils peuvent alors être retrouvés dans des prothèses dentaires en tant que bridges (PMMA renforcé avec des fibres de carbone³⁹ par exemple) ou dans la composition d'appareils dentaires pour le réalignement des dents (polycarbonate (PC) ou nylon renforcés avec des fibres de verre par exemple) ;⁴⁰
- en chirurgie maxillo-faciale. Ils se retrouvent dans des applications pour la réparation d'os crâniens (composite de phosphate tricalcique et de gélatine réticulée au glutaraldéhyde en tant que substitut osseux⁴¹ ou encore acide poly(L-lactique) (PLLA) renforcé avec des particules d'hydroxyapatite (HA) sous la forme de vis et plaques) ;⁴²
- en ingénierie tissulaire. Les composites acide poly(lactique-co-glycolique)/hydroxyapatite⁴³ et gélatine nanofibreuse/apatite⁴⁴ peuvent par exemple trouver application dans l'ingénierie osseuse (**Figure 13**), le composite collagène/polycaprolactone dans l'ingénierie de la peau ;⁴⁵
- en orthopédie. Ils peuvent notamment avoir des applications dans :
 - les prothèses articulaires comme celles de la hanche avec par exemple le polyétheréthercétone (PEEK)⁴⁶ ou la résine époxy⁴⁷ renforcés par des fibres de carbone ;
 - les tendons artificiels, par exemple avec le poly(2-hydroxyéthyl) méthacrylate (PHEMA) renforcé avec des fibres de polytéraphthalate d'éthylène (PET)⁴⁸ ou le PHEMA/polycaprolactone renforcé avec des fibres d'acide poly(lactique) ;⁴⁹

* Monocristaux quasiment exempts de défauts.

- les ligaments artificiels, avec un composite composé d'une matrice extracellulaire à base de collagène et de fibres de polyester téréphtalate⁵⁰ ou encore le polyuréthane renforcé avec des fibres de PET par exemple ;⁵¹
- les cartilages artificiels, avec notamment un composite composé de fibres de polyéthylène à très haut poids moléculaire et d'hydroxyapatite⁵² ou encore l'alcool polyvinylique (PVA) renforcé avec de l'hydroxyapatite.⁵³



Figure 13 : Échafaudage à base d'acide poly(lactique-co-glycolique) et d'hydroxyapatite,ensemencé d'ostéoblastes, pour l'ingénierie osseuse. Selon Kim et al.⁴³

Les composites, qui sont encore de nos jours dans une phase de grande expansion, sont donc très prometteurs dans le cadre du développement de nouveaux biomatériaux, principalement car ils permettent d'allier les propriétés de divers types de matériaux afin d'ajuster de manière la plus exacte possible les caractéristiques visées pour l'application finale du produit de formulation.

Ainsi, des biomatériaux peuvent être formulés à partir des quatre principales classes de matériaux, c'est-à-dire les métaux, les céramiques, les polymères et les composites. Chaque type de biomatériau présente des propriétés propres et trouve donc des applications dans des domaines médicaux spécifiques en fonction de ces propriétés. Parmi ces biomatériaux sont comptés de très nombreux polymères. Au sein de cette famille se trouve un groupe particulier dont les propriétés ont récemment suscité de nombreux travaux de recherche, notamment pour des applications dans le domaine biomédical : les polyélectrolytes et plus particulièrement leurs associations sous la forme de complexes de polyélectrolytes.

II. Les complexes de polyélectrolytes

II. 1. Les polyélectrolytes

Selon les recommandations de l'IUPAC,⁵⁴ un polyélectrolyte est un polymère composé de macromolécules dans lesquelles une partie importante des unités constitutionnelles contient des groupements ioniques et/ou ionisables.

Les polyélectrolytes peuvent être naturels, synthétiques ou résulter de la modification chimique de biopolymères (**Tableau 4**). Ils peuvent être classés selon leur composition (homopolymère ou copolymère) ou encore selon leur architecture moléculaire (linéaire, branchée ou réticulée).⁵⁵

Tableau 4 : Exemples de polyélectrolytes naturels, synthétiques et semi-synthétiques.

Polyélectrolytes naturels	Biopolymères chimiquement modifiés	Polyélectrolytes synthétiques
Acide hyaluronique Alginate Carraghénane	Chitosan Pectine	Poly(acide acrylique) Poly(acide méthacrylique) Poly(acide styrènesulfonique) Poly(acide vinylsulfonique) Poly(diallyldiméthylammonium)

Les charges présentes sur les polyélectrolytes les rendent généralement hydrosolubles. Ils sont donc très utiles dans le cadre de l'ajustement des propriétés rhéologiques et associatives de matériaux en milieu aqueux. Au niveau commercial, ils sont principalement utilisés pour le traitement des eaux (détartrage par exemple), pour la modification rhéologique de produits (tels que des shampoings) ou pour la formulation de gels et en particulier de gels superabsorbants.⁵⁶

De nos jours, de nombreux travaux de recherche portant sur ces polyélectrolytes concernent leur utilisation sous la forme de complexes, forme très prometteuse pour leur application dans de multiples domaines.

II. 2. Définition des complexes de polyélectrolytes

D'après l'IUPAC,⁵⁴ un complexe de polyélectrolytes (PEC) est un complexe polymère-polymère neutre composé de macromolécules portant des charges de signes opposés, amenant les macromolécules à être liées les unes aux autres par des interactions électrostatiques.

II. 3. Formation des complexes de polyélectrolytes

Depuis maintenant de nombreuses années (dès 1929), il a pu être observé que lors du mélange de deux polyélectrolytes de charges opposées, un polycation et un polyanion, ces deux macromolécules s'agrègent spontanément pour former des complexes hydratés.^{57, 58} Au sein de ces complexes, le polycation, noté Pol^+ et le polyanion, noté Pol^- , sont associés *via* des interactions entre les groupements ioniques de charges opposées de leurs unités de répétition (interactions de type « paires d'ions »).⁵⁹ Au cœur des complexes de polyélectrolytes, les charges de chaque polymère sont alors compensées soit par les charges de l'autre polyélectrolyte (on parle alors de compensation de charge intrinsèque), soit par des contre-ions du milieu (et on parle dans ce cas de compensation de charge extrinsèque).⁶⁰ En notant A^- le contre-ion de charge négative du polycation et C^+ le contre-ion de charge positive du polyanion, un complexe de polyélectrolytes peut être schématisé selon la **Figure 14**.

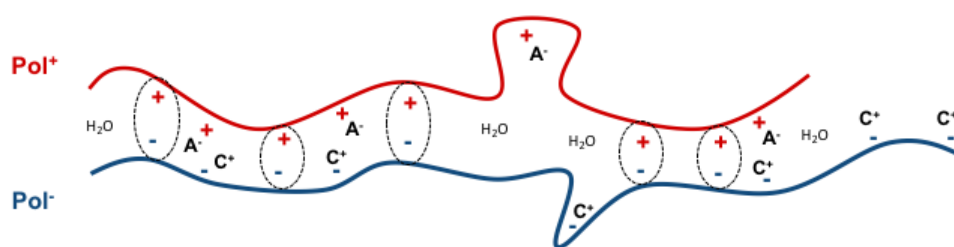


Figure 14 : Schématisation d'un complexe de polyélectrolytes.

Étant donné que lors de la formation de complexes de polyélectrolytes quasiment aucune variation d'enthalpie n'est observée, il a été conclu que la formation de ces complexes est principalement due à la libération entropique de contre-ions (compensant les charges de chaque polyélectrolyte)^{59, 61} et de molécules d'eau⁶² lors du rapprochement des deux chaînes.

La formation de complexes de polyélectrolytes Pol^+Pol^- peut alors être résumée à l'équation:⁵⁶



En fonction notamment des polymères utilisés, des complexes de polyélectrolytes non-stœchiométriques (avec un nombre de charges impliquées différent pour chaque polyélectrolyte) ou stœchiométriques peuvent être formés. Dans le premier cas, des charges extrinsèques sont alors nécessaires, tandis que dans le second cas la présence de charges extrinsèques est optionnelle.⁵⁶ Ces complexes de polyélectrolytes présentent alors des propriétés variées.

II. 4. Propriétés des complexes de polyélectrolytes

II. 4. 1. Propriétés physicochimiques des complexes de polyélectrolytes

Les complexes de polyélectrolytes sont généralement transparents à l'état humide. Ils sont insolubles dans les solvants communs et sont également infusibles, c'est-à-dire qu'ils ne peuvent pas fondre. Ils peuvent être plastifiés en présence d'eau ou d'électrolytes, notamment via des phénomènes d'interaction entre ces éléments et les ions présents au sein des complexes.

Les complexes de polyélectrolytes ont une capacité d'absorption de liquides relativement limitée. Cependant, cette capacité d'absorption est hautement spécifique à l'eau par rapport aux autres solvants communs.⁵⁹

II. 4. 2. Propriétés de transport des complexes de polyélectrolytes

Les complexes de polyélectrolytes sont hautement perméables à l'eau, aux microsolutés solubles dans l'eau ainsi qu'aux électrolytes. En revanche, ils sont imperméables aux macrosolutés.⁵⁹

II. 5. Mise en forme et application des complexes de polyélectrolytes

Du fait de certaines de leurs propriétés et en particulier de leur infusibilité et de leur caractère « cassant », il est relativement difficile de mettre en forme les complexes de polyélectrolytes. Jusqu'à récemment, seules trois méthodes principales de formulation avaient été développées.⁵⁶

II. 5. 1. Formulation des complexes de polyélectrolytes en présence de sels ternaires

En 1961, Michaels et Miekka⁵⁸ ont développé une première méthode consistant à dissoudre les complexes de polyélectrolytes dans des sels ternaires puis à les mouler sous forme de film. Dans leur étude, ils ont utilisé le couple polycation/polyanion poly(chlorure de vinylbenzyltriméthylammonium) (PVBTA) /poly(styrène sulfonate de sodium) (NaPSS) (**Figure 15**).

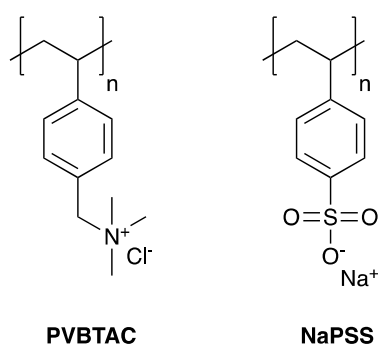


Figure 15 : Structures du poly(chlorure de vinylbenzyltriméthylammonium) (PVBTA) et du poly(styrène sulfonate de sodium) (NaPSS).

Selon leurs travaux, les deux polyélectrolytes sont dissous séparément dans un mélange constitué de 60 % d'eau, 20 % de NaBr et 20 % d'acétone. Les deux solutions obtenues sont ensuite versées dans une boîte de Pétri en verre et le mélange gélifie alors par évaporation de l'acétone. Après évaporation de l'eau à l'étuve, un résidu solide composé de complexes de polyélectrolytes est obtenu.

II. 5. 2. Formulation des complexes de polyélectrolytes sous forme de complexes quasi-solubles

Lorsque deux polyélectrolytes de charges opposées, par exemple le poly(hydrochlorure de *N*, *N*-diméthylaminoéthyl méthacrylate) (PDMAEMA·HCl) et le poly(phosphate de sodium) (NaPP) (**Figure 16**),⁶³ présentant des degrés de polymérisation (longueurs de chaîne) considérablement différents et avec un excès d'un des deux polyélectrolytes (le PDMAEMA·HCl), sont associés en solution électrolytique diluée, une dispersion colloïdale de particules de complexes de polyélectrolytes peut être obtenue.

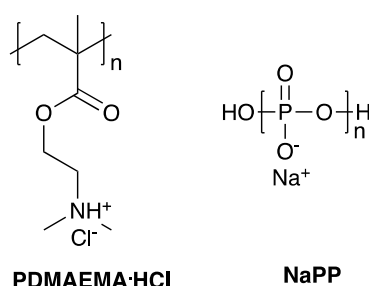


Figure 16 : Structures du poly(hydrochlorure de *N*, *N*-diméthylaminoéthyl méthacrylate) (PDMAEMA·HCl) et du poly(phosphate de sodium) (NaPP).

Les objets obtenus sont alors définis comme des complexes de polyélectrolytes quasi-solubles, ou q-PECs, qui sont maintenus à l'état dispersé grâce à une « enveloppe chargée », constituée de parties des longues chaînes chargées du polyélectrolyte en excès (**Figure 17**).⁶⁴ En présence de sels, les particules de q-PEC peuvent alors être dissoutes.

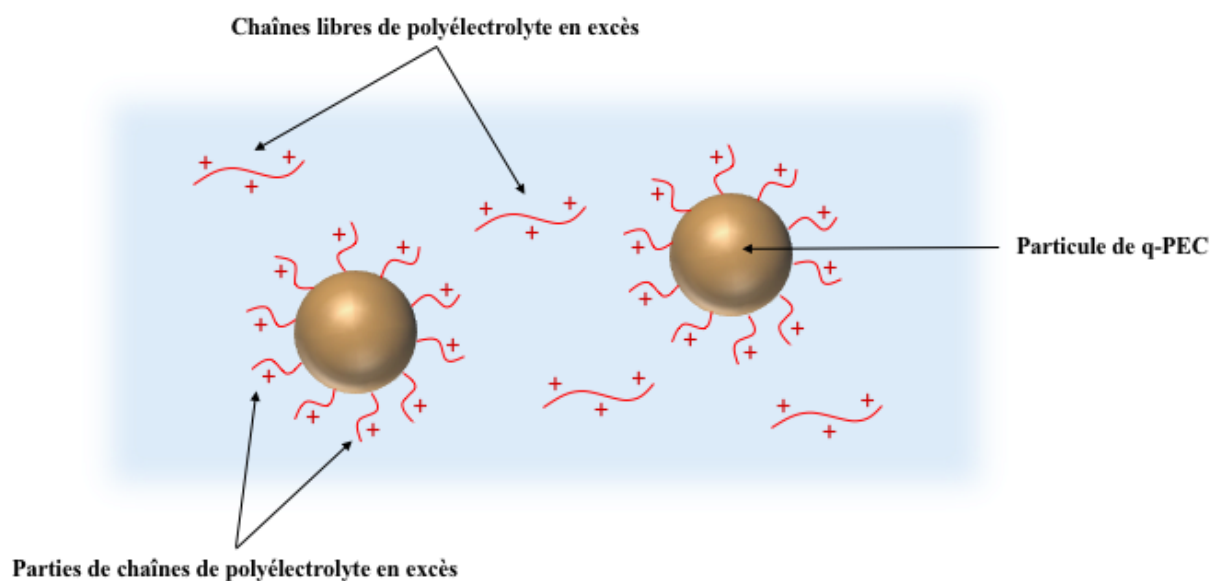


Figure 17 : Illustration d'une dispersion colloïdale de particules de complexes de polyélectrolytes quasi-solubles (q-PEC).

Des q-PECs formés entre un polycation tel que la polyéthylèneimine (PEI) et de l'ADN trouvent alors tout particulièrement application dans le domaine du transfert de gènes.⁶⁵

II. 5. 3. Formulation des complexes de polyélectrolytes sous forme de multicouches de polyélectrolytes

En 1992, Decher *et al.*⁶⁶ ont décrit une méthode innovante permettant de mettre en forme les complexes de polyélectrolytes. Cette méthode consiste à immerger une surface plane chargée positivement dans une solution concentrée en polyanions, de telle sorte qu'une monocouche de ces polyanions s'adsorbe sur la surface par des interactions électrostatiques. La solution de polyanions étant concentrée, des groupements anioniques se retrouvent exposés en surface, si bien que la charge de la surface plane devient négative. Après rinçage à l'eau, la surface est immergée dans une solution de polycations et à nouveau une monocouche de polyélectrolytes s'adsorbe sur la surface dont la charge est une fois de plus inversée. En répétant de manière cyclique les immersions dans les deux solutions de polyélectrolytes, des multicouches alternées des deux polyélectrolytes sont obtenues (**Figure 18**).⁶⁷

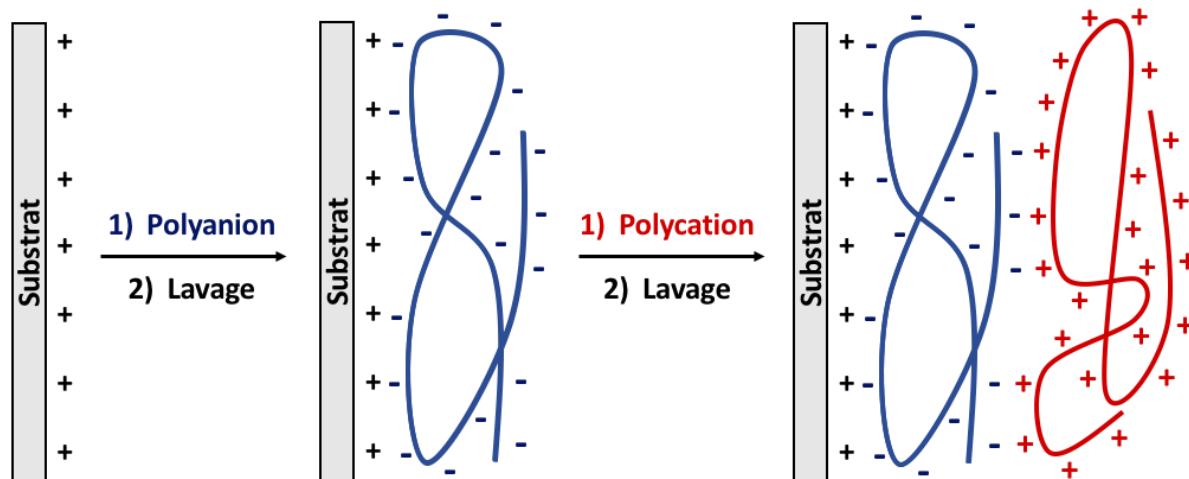


Figure 18 : Illustration d'un cycle lors de la formulation de multicouches de polyélectrolytes.

Selon cette méthode, des films constitués de plus de deux polyélectrolytes peuvent être obtenus. En effet, la surface peut être immergée dans autant de solutions de polyélectrolytes que souhaité, du moment que le signe des polyélectrolytes en solution est inversé entre chaque couche.⁶⁶ Un substrat de base non chargé peut également être utilisé comme support. En effet, s'il est de nature hydrophobe par exemple, la première couche de polyélectrolytes pourra être déposée *via* des forces d'attraction hydrophobes.⁶⁸ Cette méthode de préparation de multicouches de polyélectrolytes permet alors l'obtention d'un très large éventail de types de films. Ces films ont généralement une épaisseur submicrométrique et peuvent présenter un module élastique allant de 0,00001 à 12 GPa.⁶⁹

Plus récemment, des variations de cette méthode de préparation de multicouches de polyélectrolytes, suivant un principe similaire, ont vu le jour.⁷⁰ L'immersion peut alors être remplacée par une pulvérisation⁷¹ ou encore par un revêtement par centrifugation (« spin coating »)⁷² des solutions de polyélectrolytes. Des techniques ont également été développées afin de moduler les propriétés, notamment mécaniques, des multicouches de polyélectrolytes formulées, comme en variant le pH^{73, 74} ou la force ionique⁷⁵ du milieu lors de l'assemblage ou en ayant recours à des réticulations chimiques⁷⁶⁻⁷⁹ ou photoinduites.⁸⁰⁻⁸³

Très récemment, Woltmann *et al.*⁸⁴ ont également préparé des films de compositions diverses à partir de nanoparticules de complexes de polyélectrolytes.

Les multicouches de polyélectrolytes, dont la méthode de préparation est de nos jours qualifiée de LbL (pour « Layer by Layer » en anglais), trouvent de nombreuses applications, en particulier dans le domaine biomédical. Elles ont alors notamment été étudiées pour des

applications en tant que revêtements de biomatériaux. Elles peuvent en effet favoriser⁸⁵ ou au contraire limiter⁸⁶ l'adhésion cellulaire et également apporter certaines propriétés telles qu'un effet antimicrobien^{87, 88} ou encore une limitation de l'inflammation induite par l'implantation d'un biomatériau.⁸⁹ Des multicouches de polyélectrolytes dégradables⁹⁰⁻⁹² peuvent également être très intéressantes dans l'optique d'une utilisation pour la délivrance de molécules actives ou pour le développement d'échafaudages en ingénierie tissulaire qui auraient alors la capacité de se dissoudre à mesure que les tissus biologiques croissent.⁶⁹

Ainsi, seules trois méthodes principales ont tout d'abord été développées pour la mise en forme des complexes de polyélectrolytes. La troisième, permettant d'obtenir des films de multicouches de ces complexes, a notamment constitué une avancée considérable dans ce domaine de recherche, proposant un nombre important d'applications biomédicales.⁵⁶ Néanmoins, en suivant ces méthodes, seuls des matériaux sous forme de particules ou de films peuvent être obtenus. Très récemment, en 2009, une toute nouvelle méthode de formulation de complexes de polyélectrolytes a vu le jour, permettant alors d'obtenir des matériaux compacts aux impressionnantes propriétés : les complexes de polyélectrolytes compacts ou CoPEC.

III. Les CoPEC, Complexes de Polyélectrolytes Compacts

III. 1. La saloplasticité

En 2009, Porcel et Schlenoff⁹³ ont découvert qu'en soumettant des complexes de polyélectrolytes dopés avec des sels à une force ultracentrifuge, des objets macroscopiques plastiques pouvaient être obtenus. Dans le cadre de ce phénomène, les sels permettent d'une part de rompre certaines interactions électrostatiques entre les chaînes de polyélectrolytes, réduisant alors la densité de réticulations physiques entre ces chaînes. D'autre part, ils confèrent une certaine mobilité à ces chaînes. Grâce à ces sels, les matériaux obtenus peuvent alors être déformés de manière permanente. En effet, les chaînes de polyélectrolytes peuvent d'une part se mouvoir les unes par rapport aux autres et d'autres parts les interactions faibles entre les groupements ioniques des chaînes peuvent être recréées à la suite de ces mouvements (**Figure 19**). Cette plasticité conférée aux matériaux par le biais des sels a alors

été définie comme étant la « saloplasticité » par les auteurs (« *a saloplastic material comprises ionic cross-links and may be permanently reshaped when sufficient cross-links are broken, for example, by exposure to a solution of sufficiently high salt concentration* »).⁹³ De tels matériaux peuvent alors être obtenus selon trois méthodes principales : l'extrusion, la sédimentation/évaporation et l'ultracentrifugation.

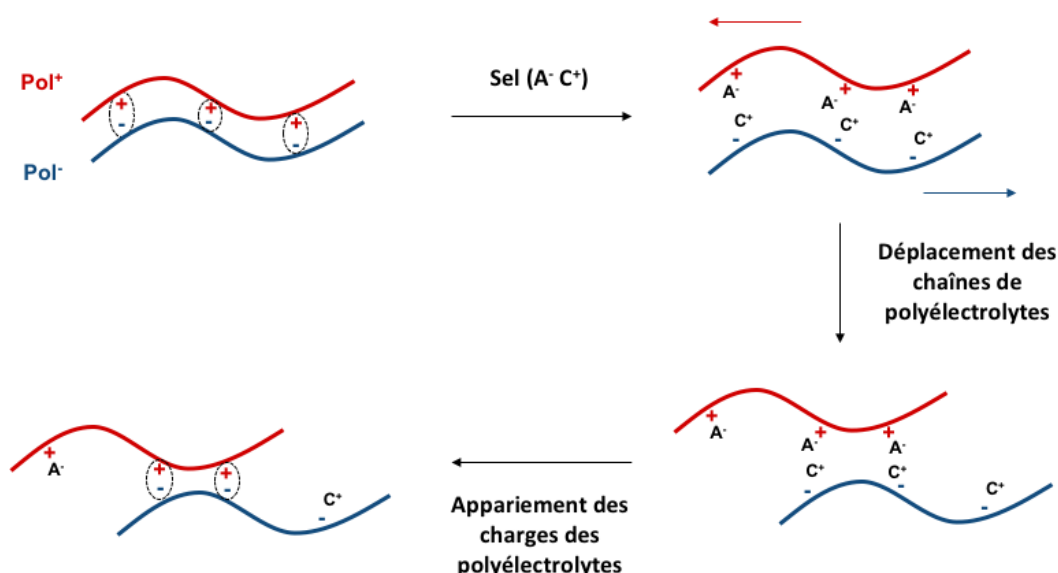


Figure 19 : Illustration du phénomène de saloplasticité. Pol^+ = polycation, Pol^- = polyanion, C^+ = contre-ion positif et A^- = contre-ion négatif.

III. 2. La préparation de CoPEC par extrusion

Une méthode permettant d'obtenir des CoPEC, en utilisant l'extrusion, a été développée en 2012 par Shamoun *et al.*⁹⁴

Selon cette méthode, deux solutions salines de polyelectrolytes (une de polycations et une de polyanions) sont préparées et mélangées pour former des complexes de polyelectrolytes sous la forme de précipités. Une décantation permet de collecter les complexes qui sont par la suite hachés afin d'obtenir des morceaux de quelques millimètres d'épaisseur. Les morceaux hydratés sont ensuite extrudés, avec chauffage, sous la forme de fibres qui sont alors à nouveau coupées et extrudées afin d'obtenir des CoPEC plus uniformes (Figure 20).

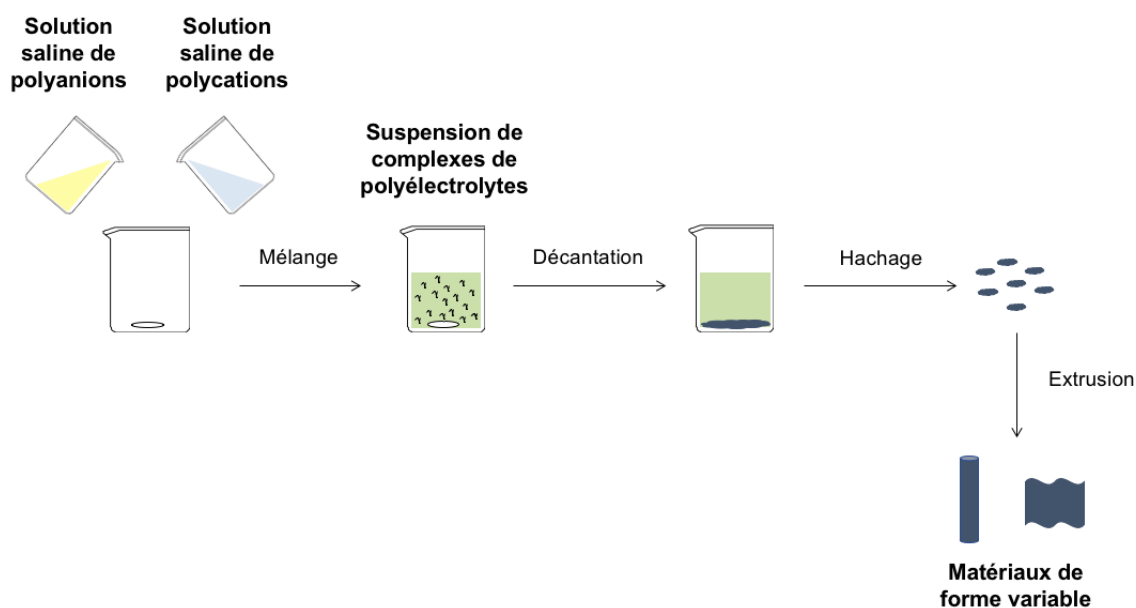


Figure 20 : Schématisation de la procédure de préparation de CoPEC par extrusion.

L'extrusion est une méthode permettant de formuler un matériau à partir d'éléments, en particulier polymériques, en y imposant d'importantes forces de cisaillement. Afin d'obtenir un matériau homogène, les éléments de base doivent nécessairement avoir une certaine mobilité, qui est généralement acquise en les chauffant.⁹⁴ Dans le cas des complexes de polyélectrolytes, la présence de réticulations ioniques entre les chaînes rend ces dernières mobiles. De plus, il a été montré que la température permet d'intensifier le transport d'ions au sein de complexes de polyélectrolytes.⁹⁵ Cette mobilité accrue des chaînes de polyélectrolytes au sein des complexes justifie donc leur compatibilité avec une mise en forme selon le procédé d'extrusion.

Le premier travail sur ces CoPEC extrudés a été conduit avec le couple polycation/polyanion poly(diallyldiméthylammonium) (PDADMA)/poly(styrène sulfonate) (PSS), deux polymères synthétiques (**Figure 21**).

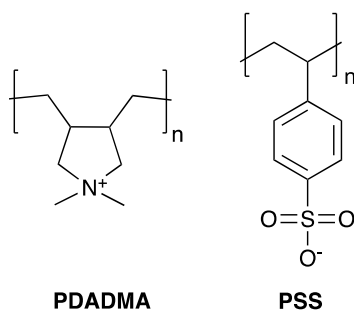


Figure 21 : Structures du poly(diallyldiméthylammonium) (PDADMA) et du poly(styrène sulfonate) (PSS).

Les paramètres d'expérience ont été fixés de telle sorte à obtenir un matériau homogène, de porosité limitée et composé de complexes de polyélectrolytes stœchiométriques, ceci afin d'atteindre les meilleures propriétés mécaniques envisageables. En faisant varier la tête d'extrusion de l'extrudeur, plusieurs morphologies ont pu être obtenues telles que des rubans, des tiges ou des tubes (**Figure 22**),⁹⁴ démontrant alors le caractère très prometteur de cette méthode de formulation de complexes de polyélectrolytes.

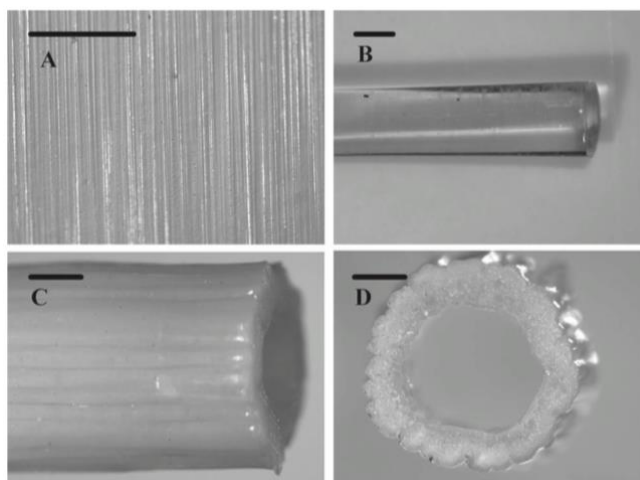


Figure 22 : A) Ruban, B) tige et C), D) tube de CoPEC PDADMA/PSS préparés par extrusion. Selon Shamoun et al.⁹⁴

En 2014, Fu et al.⁹⁶ montrèrent que des nanoparticules d'oxyde de fer peuvent être incorporées dans ce type de CoPEC PDADMA/PSS préparé par extrusion, résultant en un matériau superparamagnétique, présentant des propriétés mécaniques (dureté, résistance à l'étirement) augmentées et ayant la capacité d'être chauffé à distance, le rendant très intéressant par exemple dans le cadre d'une application en tant qu'implant libérant des molécules actives sous un stimulus thermique.

III. 3. La préparation de CoPEC par sédimentation et évaporation

En 2015, Costa *et al.*⁹⁷ ont développé une méthode originale de préparation de CoPEC : la sédimentation et évaporation/séchage. Selon cette méthode, des complexes sont tout d'abord préparés par le mélange de deux solutions salines de polyélectrolytes de charges opposées. Les complexes sont ensuite centrifugés à vitesse modérée (~ 250 g) pendant une courte durée (~ 15 minutes) afin de les pré-sédimenter. Les complexes pré-sédimentés sont alors re-suspendus et transférés dans un récipient, comme par exemple une boîte de Pétri, qui est placée à 37 °C. Les complexes sédimentent alors par gravité et sont compactés par l'évaporation progressive du solvant assistée par la température imposée. En seulement 24 h, un matériau sous forme de membrane plate est obtenu (**Figure 23**).

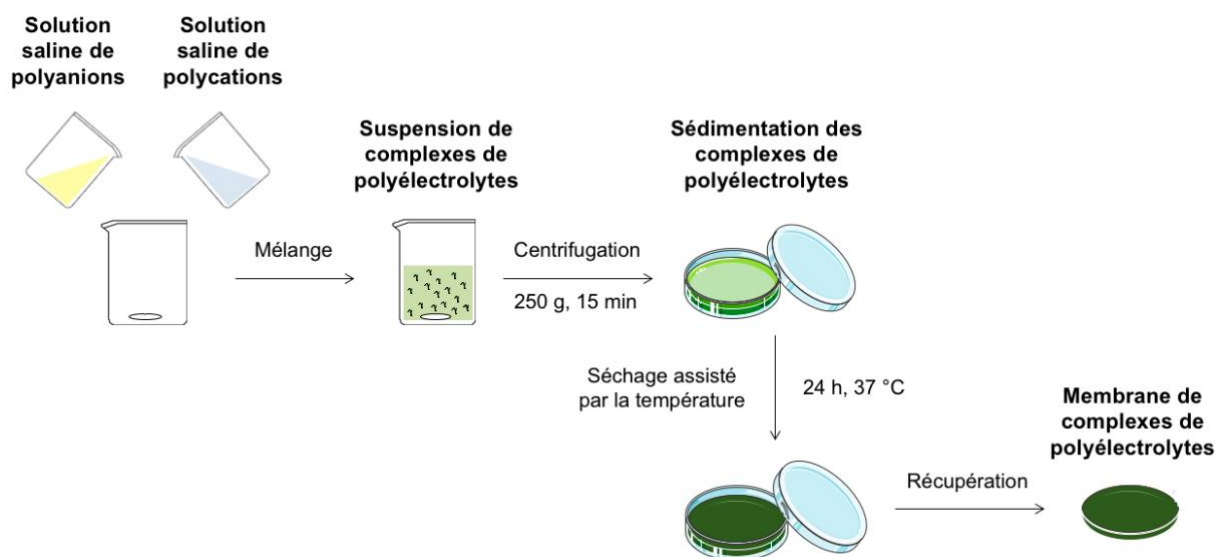


Figure 23 : Schématisation de la procédure de préparation de CoPEC par sédimentation et évaporation.

Cette méthode présente des avantages certains. Elle permet l'obtention de matériaux de façon simple, rapide et peut être adaptée à une production à grande échelle car de nombreuses membranes peuvent être formulées en même temps et à partir de quantités très importantes de produits de départ étant donné qu'il n'y a aucune limitation provenant de l'appareillage. Elle peut ainsi être considérée comme très prometteuse dans le développement de matériaux et en particuliers de biomatériaux.

Lors du premier travail sur cette méthode,⁹⁷ les auteurs l'ont adaptée au couple polycation/polyanion chitosan/alginate de sodium, deux polyélectrolytes d'origine naturelle (**Figure 24**).

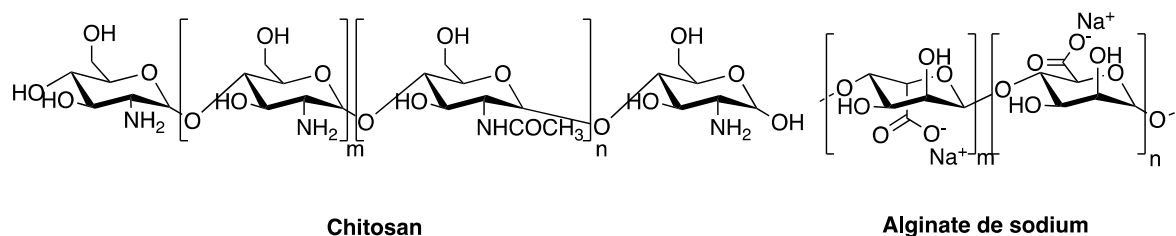


Figure 24 : Structures du chitosan et de l'alginate de sodium.

Les membranes obtenues (**Figure 25**) ont montré une résistance à la dégradation enzymatique jusqu'à trois mois. Elles ont également présenté une résistance à la dégradation dans des conditions extrêmes de pH. En fonction de la concentration en sel utilisée lors de la formulation, les propriétés mécaniques des membranes ont pu être modulées. Des tests *in vitro* ont également permis aux auteurs de prouver qu'en fonction de la concentration en sel, les propriétés des membranes vis-à-vis de cellules, et en particulier vis-à-vis de la viabilité et de la prolifération de ces dernières, peuvent être modulées, permettant notamment d'obtenir des membranes non-cytotoxiques et favorables à la prolifération cellulaire.

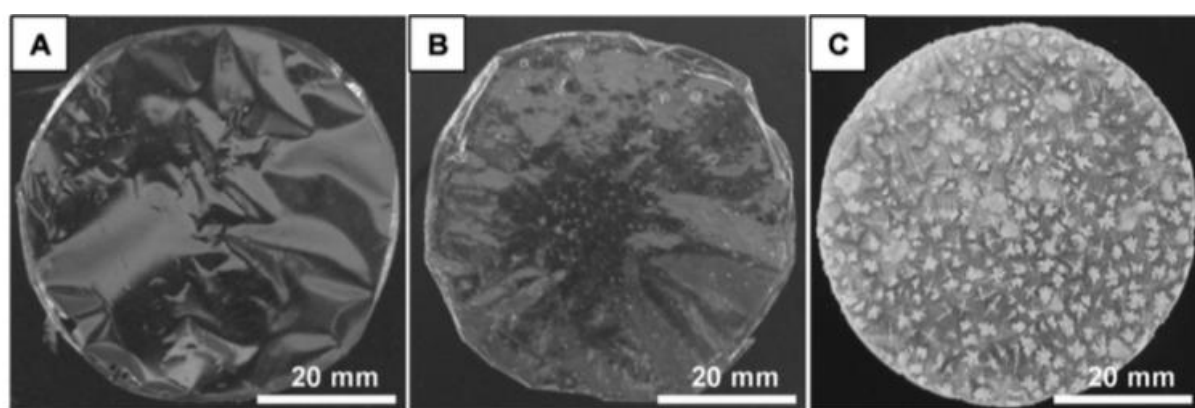


Figure 25 : Membranes de chitosan et d'alginate préparées par sédimentation et évaporation en présence de A) 0 M, B) 0,15 M et C) 0,5 M de NaCl aqueux. Selon Costa et al.⁹⁷

Plus récemment, en 2016, Rodrigues *et al.*⁹⁸ ont adapté ce type de formulation de CoPEC au couple polycation/polyanion chitosan/sulfate de chondroïtine. Les membranes ainsi obtenues ont présenté une certaine porosité et, de la même manière que dans le cas des

membranes à base de chitosan et d'alginate de sodium, elles ont montré une résistance à la dégradation enzymatique. Leurs propriétés mécaniques ont également pu être modulées selon la concentration en sel utilisée et les membranes ont présenté une capacité d'auto-réparation. Les matériaux étaient également capables de contenir et relarguer le TGF- β 3, un facteur de croissance. Des études *in vitro* ont enfin mis en évidence que ces membranes ont la capacité d'accueillir des chondrocytes qui expriment alors le collagène de type II, laissant entrevoir un potentiel d'application pour ces matériaux en ingénierie du cartilage.

III. 4. La préparation de CoPEC par ultracentrifugation

III. 4. 1. Principe de la préparation de CoPEC par ultracentrifugation

En 2009, l'équipe de Joseph B. Sclenoff a développé une méthode de formulation de CoPEC en utilisant la technique de l'ultracentrifugation. Lors de la préparation de CoPEC par ultracentrifugation, des solutions salines de chaque polyélectrolyte sont tout d'abord préparées et associées sous agitation pour donner lieu à la formation de complexes de polyélectrolytes sous la forme de précipités en suspension. Les précipités sont ensuite ultracentrifugés pour alors former le CoPEC saloplastique (**Figure 26**).⁹³

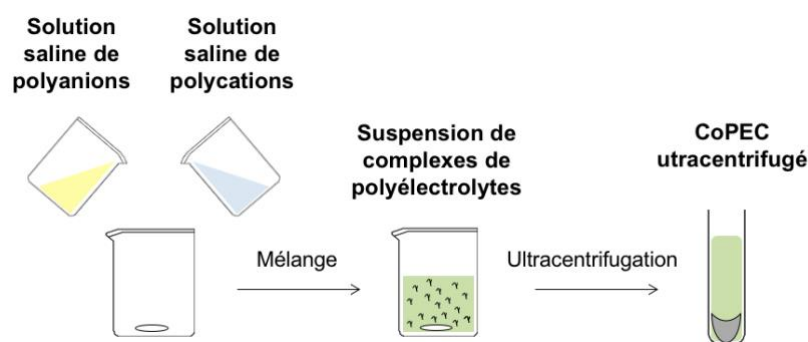


Figure 26 : Schématisation de la procédure de préparation de CoPEC par ultracentrifugation.

La formation du matériau repose dans ce cas principalement sur la présence d'éléments autres que les polyélectrolytes. Les ions et l'eau présents au sein des complexes donnent en effet une certaine mobilité aux chaînes de polyélectrolytes. Lors de l'ultracentrifugation, cette mobilité permet une sorte de brassage des chaînes et leur « fusion » au niveau moléculaire, ce qui mène également à une expulsion d'une partie de l'eau et des

ions présents entre les chaînes. L'ensemble de ces phénomènes mène alors à une densification responsable de la formation d'un matériau compact (**Figure 27**).⁹⁹

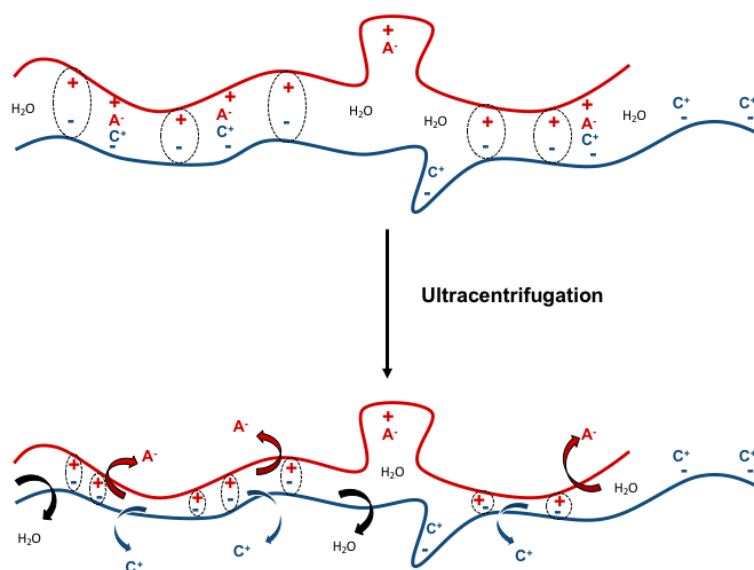


Figure 27 : Schématisation de la compaction des complexes de polyélectrolytes lors de l'ultracentrifugation en présence de sels.

A la suite du développement de cette nouvelle voie de formulation de complexes de polyélectrolytes, divers travaux portant sur cette méthode ont été menés, dans un premier temps en utilisant des polyélectrolytes synthétiques.

III. 4. 2. Les premières études sur les CoPEC à base de polyélectrolytes synthétiques préparés par ultracentrifugation

III. 4. 2. 1. Les CoPEC PDADMA/PMAA comme matériaux mimant le noyau gélatineux des disques intervertébraux

Lors de leur premier travail sur les CoPEC, Porcel et Schlenoff⁹³ ont tout d'abord porté leurs études sur le couple polycation/polyanion poly(diallyldiméthylammonium) (PDADMA)/poly(styrène sulfonate) (PSS) (**Figure 21**). Ils ont alors appliqué la méthode de préparation de CoPEC introduite en III. 4. 1. à ce couple de polyélectrolytes et ont caractérisé le matériau obtenu. Les auteurs ont alors déterminé la composition du CoPEC, démontrant un léger excès de PSS pouvant être expliqué par une solubilité moins importante de ce polyélectrolyte dans le solvant (NaCl aqueux à 2,5 M) par rapport à celle du PDADMA. Ils

ont également démontré une importante teneur en eau dans ce matériau (entre 60 % et 80 % selon la concentration en NaCl utilisée), ainsi qu'un caractère poreux (**Figure 28**) pouvant être expliqué par la présence de PSS en excès au niveau de ces pores, générant une certaine pression osmotique. Les propriétés viscoélastiques du CoPEC PDADMA/PSS ont également été étudiées par les auteurs.

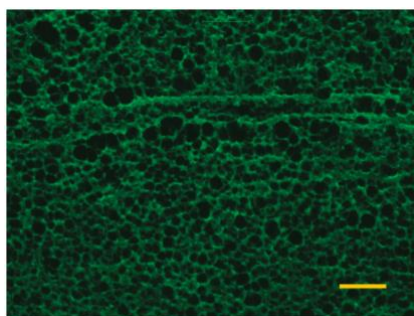


Figure 28 : Image d'une tranche de CoPEC PDADMA/PSS obtenue par microscopie à épifluorescence. Échelle = 100 μ m. Selon Porcel et al.⁹³

Dans le cadre de ce premier travail, les auteurs ont également formulé un second CoPEC, toujours avec le PDADMA en tant que polycation mais cette fois avec le poly(acide méthacrylique) (PMAA) (**Figure 29**) en tant que polyanion. Ils ont alors montré que ce nouveau CoPEC présentait des propriétés mécaniques dynamiques comparables à celles du noyau gélatineux des disques intervertébraux.

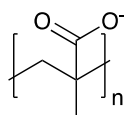


Figure 29 : Structure du poly(acide méthacrylique) (PMAA).

III. 4. 2. 2. Les CoPEC PDADMA/PSS comme matériaux poreux mimant le cartilage

En 2010, Hariri et Schlenoff¹⁰⁰ ont étudié de manière approfondie la morphologie et les propriétés mécaniques du CoPEC PDADMA/PSS préparé par ultracentrifugation, déjà étudié dans le premier travail de leur équipe sur les CoPEC.⁹³ Ils ont alors confirmé les premières observations faites sur ce matériau concernant son caractère poreux, justifié par l'excès de PSS dans le CoPEC.

Via des considérations mécaniques, les auteurs ont de plus pu montrer une similitude du comportement mécanique viscoélastique (et tout particulièrement du mécanisme de relaxation des contraintes) du CoPEC PDADMA/PSS avec celui du cartilage articulaire, ouvrant alors de nouvelles perspectives d'application de ce matériau dans l'ingénierie du cartilage.

III. 4. 2. 3. Les CoPEC PDADMA/PSS comme matériaux aux propriétés mécaniques modulables

En 2012, Hariri *et al.*¹⁰¹ ont étudié l'influence de la teneur en eau d'un CoPEC PDADMA/PSS préparé par ultracentrifugation sur les propriétés mécaniques de ce matériau. Pour ce faire, les auteurs ont, de manière contrôlée, limité la quantité d'eau présente au sein du CoPEC en utilisant du polyéthylène glycol (PEG) en tant que facteur de stress osmotique.

Les auteurs ont alors mis en évidence que la concentration de la solution en PEG ainsi que la durée d'immersion du CoPEC dans cette solution étaient deux facteurs permettant de contrôler l'élimination d'eau présente dans le matériau. Cette eau se situant principalement dans les pores de ce dernier, ces deux facteurs permettaient donc indirectement de contrôler la porosité du CoPEC (ce qui peut être observé en **Figure 30**, le matériau perdant son opacité provenant initialement de la présence de pores).

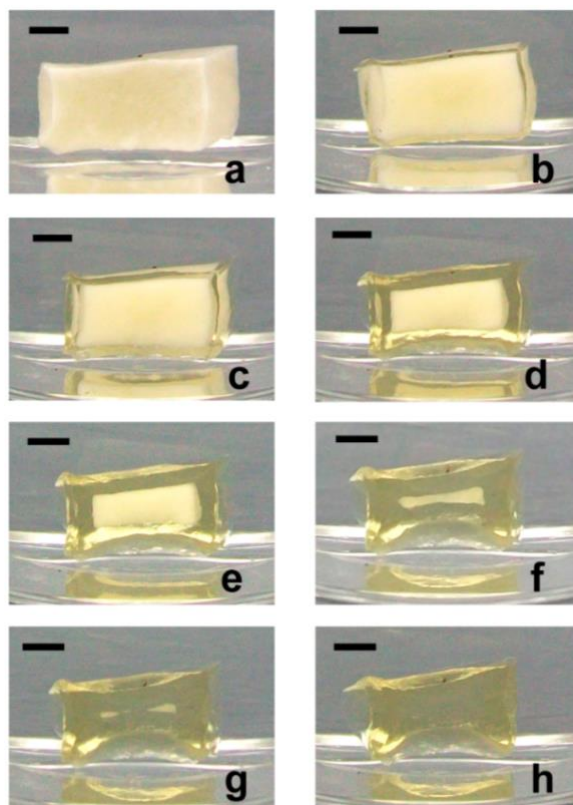


Figure 30 : Aspect de CoPEC PDADMA/PSS après immersion dans une solution de polyéthylène glycol 40 % pendant des temps croissants (de a) 0 heure à h) 50 heures). Échelles = 0,25 cm. Selon Hariri et al.¹⁰¹

En contrôlant la porosité du CoPEC, les auteurs ont pu démontrer qu'ils pouvaient alors contrôler les propriétés mécaniques de ce matériau et tout particulièrement son comportement élastique.

Ainsi, les premiers travaux sur les CoPEC préparés par ultracentrifugation, effectués avec des polyélectrolytes synthétiques, ont permis de mettre la lumière sur le potentiel de ces matériaux, tout particulièrement dans le domaine médical. En effet, ces CoPEC, formulés selon une procédure relativement simple, avaient notamment des comportements mécaniques modulables et comparables à ceux de certains éléments du corps humain tels que le noyau gélatineux des disques intervertébraux ou encore le cartilage.

Les polyélectrolytes synthétiques n'étant cependant pas idéaux pour une utilisation en milieu biologique des matériaux, les travaux de recherche sont depuis quelques années maintenant axés vers le développement de CoPEC à base de polyélectrolytes d'origine naturelle.

III. 4. 3. Vers des CoPEC biosourcés

Dans l'optique du développement de CoPEC biosourcés pouvant être plus adaptés à une utilisation à des fins médicales, des premiers travaux ont porté sur le couple polycation/polyanion poly(hydrochlorure d'allylamine) (PAH)/poly(acide acrylique) (PAA) (**Figure 31**). En effet, bien que ces polyélectrolytes ne soient pas naturels à proprement parler, leurs chaînes latérales présentent des structures proches de celles des acides aminés. Ils constituaient donc un premier modèle acceptable dans le cadre du futur développement de CoPEC d'origine naturelle.

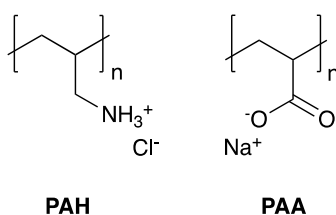


Figure 31 : Structures du poly(hydrochlorure d'allylamine) (PAH) et du poly(acide acrylique) (PAA).

III. 4. 3. 1. Les CoPEC PAH/PAA, des matériaux aux propriétés contrôlables

En 2012, Reisch *et al.*¹⁰² ont pour la première fois appliqué la méthode de préparation de CoPEC par ultracentrifugation au couple polycation/polyanion PAH/PAA, un couple précédemment étudié dans le cadre de la formation de multicouches de polyélectrolytes.^{74, 88}

Après avoir démontré que des CoPEC pouvaient bien être obtenus avec ce couple, les auteurs ont prouvé que la composition du matériau final, c'est-à-dire le ratio PAH : PAA, pouvait être ajustée en variant l'ordre et la vitesse d'addition des polyélectrolytes, la concentration en polyélectrolytes des solutions ou encore le pH. Ils ont alors découvert que les matériaux obtenus sont spontanément poreux et que cette porosité peut, elle aussi, être modulée en faisant varier certains paramètres comme la composition du CoPEC, le pH ou encore la concentration en sel lors du procédé (**Figure 32**).

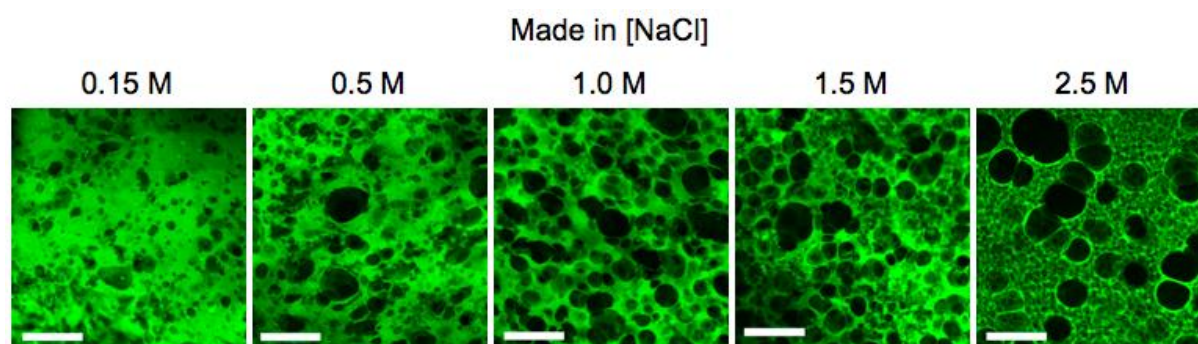


Figure 32 : Influence de la concentration en sel sur la microstructure d'un CoPEC PAH/PAA préparé par ultracentrifugation. Selon Reisch *et al.*¹⁰²

De plus, les auteurs ont montré que les propriétés mécaniques du CoPEC PAH/PAA pouvaient être modulées, en particulier en agissant sur la densité de réticulations entre les chaînes de polymères, ce qui pouvait alors être fait en faisant varier le ratio PAH : PAA dans le matériau ou encore en modifiant la concentration en sel.

Ce premier travail sur le développement de CoPEC PAH/PAA était donc très prometteur, en particulier grâce au fin contrôle que l'opérateur pouvait avoir sur les propriétés finales du matériau, en faisant simplement varier certaines conditions de formulation. Ces résultats ont alors encouragé la conduite de travaux d'exploration plus approfondis sur ce type de CoPEC.

III. 4. 3. 2. Les CoPEC PAH/PAA comme supports d'immobilisation d'enzymes

A la suite du développement prometteur du premier CoPEC PAH/PAA, en 2013, Tirado *et al.*⁹⁹ ont étudié la capacité de ce CoPEC à immobiliser une enzyme modèle, la phosphatase alcaline (ALP), afin d'obtenir un biomatériau bioactif. Ils ont ainsi utilisé une méthode similaire au travail de Reisch *et al.*¹⁰² mais en incorporant l'enzyme dans une des solutions de polyélectrolytes de départ. L'interaction d'une enzyme avec un polyélectrolyte se faisant généralement par des interactions entre les groupements chargés de l'enzyme et du polyélectrolyte et l'ALP présentant à la fois des charges positives et négatives, cette protéine peut aussi bien réagir avec le PAA qu'avec le PAH. C'est la raison pour laquelle différents essais de formulation ont été menés par les auteurs. D'une part, il a été essayé d'introduire l'ALP dans les deux solutions et d'autre part différentes méthodes de mélange des deux solutions de polyélectrolytes pour la formation des complexes ont été mises en œuvre, à

savoir un mélange simultané des deux solutions de polyélectrolytes, l'ajout de la solution de PAH dans celle de PAA ou l'inverse (**Figure 33**).

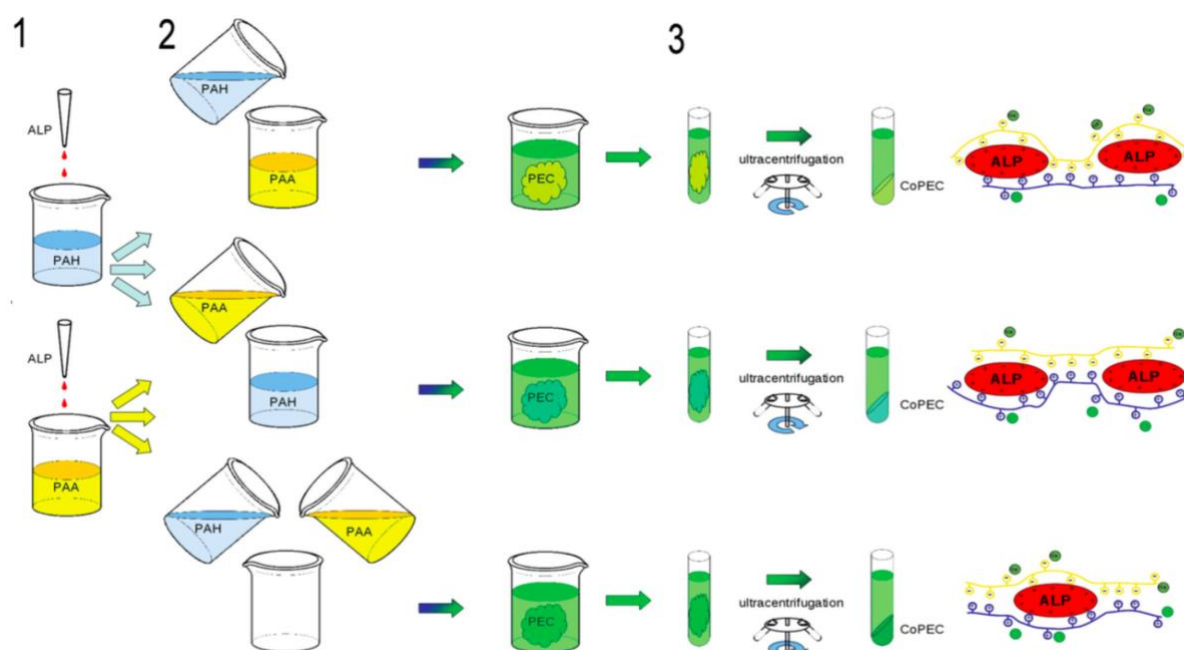


Figure 33 : Les différentes méthodes de formulation de CoPEC PAH/PAA contenant de l'ALP testées. Selon Tirado et al.⁹⁹

Dans tous les cas de figure, la méthode de formulation a permis l'obtention d'un matériau compact en fin de procédé. L'utilisation d'une ALP marquée par la rhodamine fluorescente et d'une méthode de spectroscopie de fluorescence a cependant permis de déterminer les conditions optimales d'immobilisation de l'enzyme dans le CoPEC. Il a alors été montré que l'immobilisation était meilleure dans le cas où l'ALP était dans un premier temps introduite dans la solution de PAH, ce qui a été expliqué par la charge nette négative de l'enzyme menant alors à une interaction plus importante avec les groupements cationiques du polymère. D'autre part, l'immobilisation était plus efficace lorsque la solution de PAA était ajoutée à celle de PAH-ALP. En outre, une fois formulé, l'immersion du CoPEC PAH/PAA + ALP, même coupé en morceaux, dans une solution saline ne permettait pas de détecter de fluorescence significative dans la solution, prouvant que la protéine était bien liée au matériau et pas seulement piégée dans ses pores.

Après avoir optimisé la formulation du CoPEC PAH/PAA contenant l'ALP, les auteurs ont démontré que l'immobilisation de l'ALP dans le matériau ne l'avait pas désactivée. Pour cela, ils ont fait usage d'une molécule modèle, le *p*-nitrophénylphosphate, dont l'hydrolyse, catalysée par l'ALP, produit un composé, le *p*-nitrophénol, absorbant à

405 nm et permettant donc un dosage. Ils ont également prouvé que l'activité de l'enzyme pouvait être modulée en faisant varier la concentration en sel de la solution dans laquelle les tests étaient menés et que le matériau pouvait être réutilisé plusieurs fois en conservant l'activité enzymatique de l'ALP. En outre, en plus de préserver l'activité de l'enzyme, le CoPEC permettait de protéger l'ALP d'une dégradation thermique. Les auteurs ont alors mis à profit cette protection thermique, permettant d'atteindre des activités enzymatiques plus importantes.

Ainsi, le CoPEC PAH/PAA peut être utilisé comme support d'enzymes, permettant alors la catalyse de nombreuses réactions, en particulier en milieu biologique et donc dans des applications médicales.

III. 4. 3. 3. Les CoPEC PAH/PAA comme matériaux autoréparants

A la suite d'observations selon lesquelles des morceaux d'un CoPEC PAH/PAA préparé par ultracentrifugation avaient spontanément tendance à se coller entre eux lorsqu'ils étaient immergés dans des solutions salines sans changement de température particulier, Reisch *et al.*¹⁰³ ont mené en 2014 une étude visant à évaluer les propriétés d'autoréparation de ce type de CoPEC.

Ils ont tout d'abord étudié la résistance à l'étirement présentée par deux morceaux de CoPEC PAH/PAA mis au contact l'un de l'autre pendant différents intervalles de temps et dans des solutions aqueuses de NaCl à des concentrations variées (**Figure 34**).

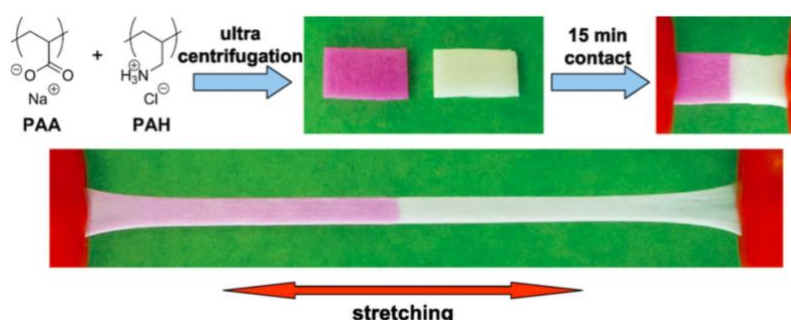


Figure 34 : Représentation de la procédure de test de la résistance à l'étirement de morceaux de CoPEC PAH/PAA coupés et remis en contact en solution saline. Selon Reisch *et al.*¹⁰³

A 2,5 M en NaCl aqueux, le matériau obtenu par mise en contact des deux morceaux de CoPEC PAH/PAA présentait alors une élongation maximale de plus de 500 %, une

contrainte à la rupture de l'ordre de 3,2 MPa, un module de Young de l'ordre de 300 kPa ainsi qu'une dureté de 1,7 MJ/m³, soit des propriétés mécaniques très impressionnantes pour un matériau « réparé » (le module de Young étant par exemple comparable à celui de la peau).¹⁰⁴ Les propriétés mécaniques du matériau, et en particulier son élongation maximale, étaient alors dépendantes de la concentration en sel, diminuant à mesure que cette concentration décroissait. Les temps de relaxation en ¹³C RMN étant connus pour corrélérer la mobilité des groupements fonctionnels analysés, les mesures de ceux-ci ont permis aux auteurs de mettre en évidence que le mécanisme de réparation du matériau impliquait une augmentation de la mobilité des chaînes de polyélectrolytes due à une diminution de la quantité de liaisons électrostatiques entre ces chaînes du fait de la présence de sel, ce qui peut se résumer à l'équation :



avec Pol⁺ et Pol⁻ respectivement les unités ioniques du polycation et du polyanion, « aq » la phase aqueuse et « s » la phase solide constituée par le complexe de polyélectrolytes.

Une seconde expérience, durant laquelle le CoPEC n'a été que partiellement coupé afin de s'affranchir de l'intervention manuelle de l'opérateur, a également été réalisée par les auteurs afin de pouvoir estimer la capacité d'autoréparation du matériau. Un CoPEC PAH/PAA a ainsi été partiellement coupé puis placé pendant 2 h dans du NaCl aqueux à 1 M. Il a ensuite été légèrement étiré pour apprécier le début de l'autoréparation avant d'être replacé 8 h dans la solution saline. En fin de manipulation, une autoréparation quasiment totale du matériau a alors été constatée (**Figure 35**).

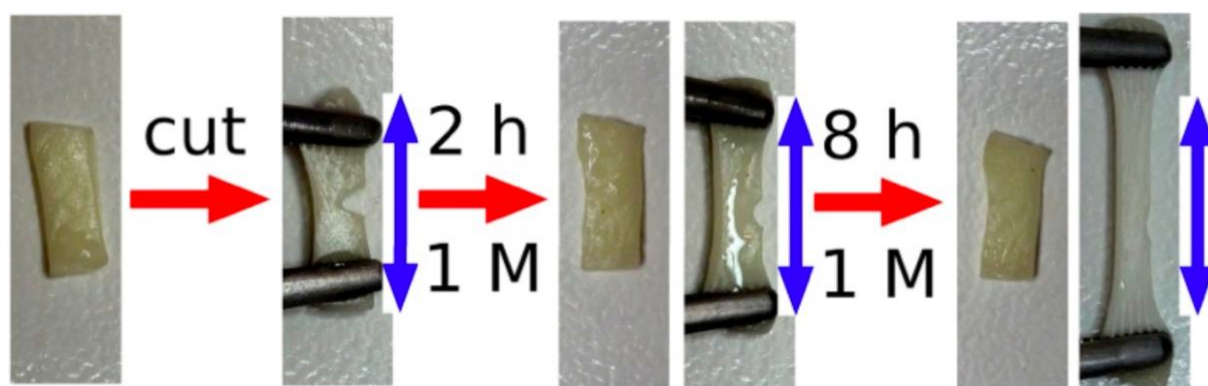


Figure 35 : Autoréparation du CoPEC PAH/PAA. Selon Reisch et al.¹⁰³

Ainsi, le CoPEC PAH/PAA est un matériau doté d'une capacité d'autoréparation rendue possible par l'interdiffusion des chaînes de polyélectrolytes le long de la zone endommagée, interdiffusion favorisée par la présence de sel augmentant la mobilité de ces chaînes. Cette propriété est d'un grand intérêt dans le cadre de l'utilisation de ce CoPEC en tant que biomatériau, notamment car elle permettrait à celui-ci de s'autoréparer *in situ*. En comparaison avec de nombreux autres matériaux polymériques autoréparants, ce CoPEC présente en outre l'avantage de ne pas nécessiter la modification des polymères ou l'intervention d'une autre substance chimique pour s'autoréparer.

Les premières études sur les CoPEC PAH/PAA, modèles pour le développement de CoPEC biosourcés, ont ainsi produit des résultats très intéressants dans l'optique d'une utilisation de ces matériaux dans le domaine médical, avec une facilité d'ajustement des propriétés du matériau, une capacité de ce dernier à immobiliser et protéger une enzyme ainsi qu'une faculté d'autoréparation. Motivées par ces résultats prometteurs, les recherches sur les CoPEC sont actuellement dirigées vers le développement de matériaux à base de polyélectrolytes biosourcés et en particulier à base du couple polycation/polyanion chitosan/alginate.

III. 4. 3. 4. Le CoPEC chitosan/alginate comme biomatériau empêchant l'adhésion de cellules et de bactéries

Très récemment, en 2017, Phoeung *et al.*¹⁰⁵ ont pour la première fois adapté avec succès la méthode de préparation de CoPEC par ultracentrifugation décrite précédemment au couple polycation/polyanion chitosan/alginate (de sodium), deux polysaccharides biosourcés.

Différentes concentrations en sel, concentrations en polyélectrolytes et vitesses d'ultracentrifugation (**Figure 36**) ont été évaluées afin de déterminer les conditions optimales ([sel] = 1 M NaBr, [polyélectrolytes] = 1,25 mg/mL, vitesse d'ultracentrifugation = 308 000 g) de préparation pour l'obtention d'un CoPEC homogène, manipulable et façonnable.

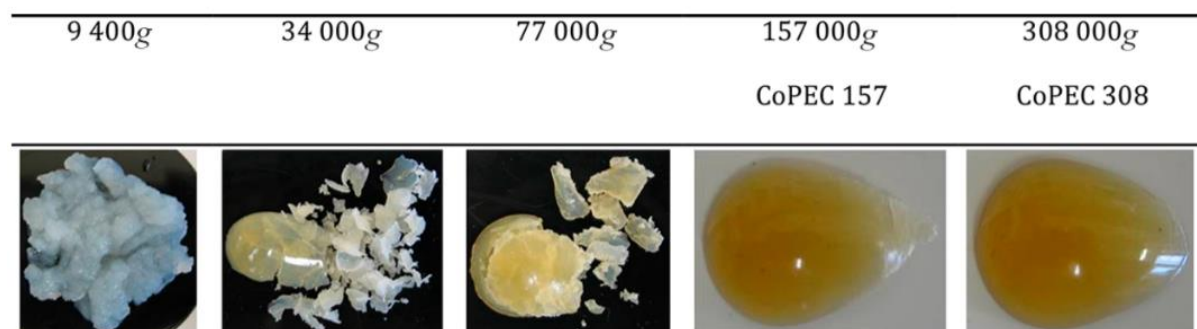


Figure 36 : Impact de la vitesse d'ultracentrifugation sur la formulation d'un CoPEC chitosan/alginate. Selon Phoeung et al.¹⁰⁵

L'évaluation des propriétés rhéologiques du matériau ainsi obtenu a permis de démontrer d'intéressantes propriétés mécaniques pour ce CoPEC, avec notamment un module de Young de l'ordre de 12 MPa, comparable à celui de l'épiderme (9 MPa). Des tests biologiques ont de plus permis aux auteurs d'affirmer que ce matériau n'est pas cytotoxique et que, malgré son important module de Young, il présente la faculté remarquable d'empêcher l'adhésion de cellules telles que des fibroblastes ou des pré-ostéoblastes mais aussi de bactéries telles que les *Staphylococcus aureus*. Enfin, les auteurs ont également mis en évidence le caractère non pro-inflammatoire du nouveau CoPEC chitosan/alginate.

Ainsi, le CoPEC chitosan/alginate est un matériau très prometteur pour le domaine biomédical. Son caractère antiadhésif le rend par exemple intéressant dans le cadre d'applications telles que le développement d'instruments médicaux ne devant pas adhérer aux tissus biologiques (cathéters, etc.).

IV. Objectifs de la thèse

Ainsi, de nombreux travaux ont à ce jour déjà été conduits concernant le développement de biomatériaux performants. Ces biomatériaux peuvent émaner des quatre principales familles de matériaux, à savoir les métaux, les céramiques, les polymères et les composites.

De nombreux travaux ont également été menés concernant un type particulier de polymère, les polyélectrolytes, et plus particulièrement sur les associations de polyélectrolytes chargés de manière opposée, c'est-à-dire les complexes de polyélectrolytes. Malgré la réputation initiale de ces complexes, considérés comme impossibles à mettre en forme, plusieurs méthodes ont vu le jour afin de les formuler pour obtenir des matériaux d'intérêt, notamment pour le domaine biomédical. La méthode « layer by layer », notamment, a constitué une première percée dans le domaine, permettant de recouvrir des surfaces afin de donner à ces dernières de nombreuses propriétés physico-chimiques. Une seconde avancée majeure dans le domaine des complexes de polyélectrolytes a été constituée par le développement de plusieurs méthodes permettant d'obtenir des matériaux compacts aux propriétés plastiques : les complexes de polyélectrolytes compacts ou CoPEC.

Trois méthodes de formulation permettant l'obtention de CoPEC ont été récemment développées : l'extrusion, la sédimentation/évaporation et l'ultracentrifugation en présence de sels. Cette dernière a été appliquée à plusieurs couples polycation/polyanion, permettant tous l'obtention de CoPEC aux propriétés très intéressantes dans l'optique d'une utilisation en tant que biomatériaux. Les premiers couples de polyélectrolytes étaient purement synthétiques (PDADMA/PMAA et PDADMA/PSS) puis un couple de polyélectrolytes synthétiques mais à la structure proche de celle d'éléments naturels a été utilisé (PAH/PAA) avant l'adaptation de la méthode d'ultracentrifugation à un couple constitué de polyélectrolytes biosourcés, le couple chitosan/alginate.

Les premiers travaux sur le CoPEC chitosan/alginate formulé par ultracentrifugation étant très prometteurs dans l'optique du développement de biomatériaux biosourcés performants, l'objectif principal de cette thèse était la fonctionnalisation de ce nouveau CoPEC afin de lui conférer une capacité de piégeage et de relargage de substances actives. L'application première envisagée pour ce nouveau type de matériau était alors le traitement des maladies inflammatoires. Dans ce contexte, la stratégie était d'utiliser la β -cyclodextrine,

une molécule-cage ayant la capacité de former des complexes d'inclusion réversibles avec de nombreuses molécules hydrophobes et en particulier avec diverses substances actives telles que des anti-inflammatoires.

Dans un premier chapitre, des points bibliographiques sur les alginates, le chitosan et les cyclodextrines seront exposés et les principales synthèses chimiques effectuées au cours de cette thèse, notamment pour fonctionnaliser le chitosan et l'alginate avec la β -cyclodextrine, seront détaillées.

Dans un second chapitre, après une introduction bibliographique concernant les associations entre le chitosan et l'alginate dans le domaine biomédical, les différents matériaux formulés, sous forme de CoPEC bruts, de microparticules et de membranes, à partir des polymères fonctionnalisés ou non par la β -cyclodextrine seront exposés et leur caractérisation sera abordée.

Enfin, dans un dernier chapitre, une introduction concernant l'inflammation sera tout d'abord proposée. Les études biologiques *in vitro* menées concernant les propriétés anti-inflammatoires intrinsèques de divers matériaux formulés seront ensuite présentées. L'inclusion de deux substances actives anti-inflammatoires, le piroxicam et la prednisolone, dans ces matériaux afin d'accentuer leurs effets anti-inflammatoires sera par la suite présentée, ainsi que les nouvelles études biologiques *in vitro* conduites sur les biomatériaux ainsi obtenus. Une partie finale concernera le développement préliminaire d'une nouvelle stratégie permettant également d'inclure des molécules hydrophiles dans les nouveaux matériaux développés.

Chapitre 2 : Synthèse des molécules-outils pour la formulation de CoPEC fonctionnels

De nos jours, de plus en plus de biomatériaux à base d'éléments naturels sont développés. En effet, ces composants sont généralement considérés comme plus adaptés étant donnée leur proximité avec les molécules biologiques.

Dans ces travaux, deux polysaccharides biosourcés actuellement très étudiés par la communauté scientifique, le chitosan et l'alginate, ont été utilisés comme composants de base de nouveaux biomatériaux fonctionnels et bioactifs. Ces deux polymères n'ayant *a priori* pas de capacité intrinsèque à contenir et relarguer des molécules actives, ils ont été modifiés par une molécule spécifique permettant un tel comportement : la β -cyclodextrine. Celle-ci a alors été modifiée de diverses manières afin de pouvoir être greffée sur les deux polymères.

La cyclodextrine étant plutôt adaptée à l'inclusion de molécules hydrophobes, une seconde stratégie a été mise en place afin de rendre possible l'inclusion de molécules hydrophiles dans les biomatériaux. Des molécules spécifiques contenant une partie formant un complexe d'inclusion avec la β -cyclodextrine (l'adamantane et le cholestérol) et une partie réactive (une fonction maléimide) vis-à-vis de molécules hydrophiles contenant par exemple un groupement thiol ont ainsi été synthétisées. Incluses dans les cyclodextrines des polymères modifiés, ces molécules permettront alors l'incorporation indirecte de molécules hydrophiles dans ces nouveaux biomatériaux.

Dans ce chapitre, après une introduction bibliographique sur le chitosan, les alginates et les cyclodextrines, les diverses synthèses chimiques réalisées au cours de cette thèse seront détaillées.

I. Le chitosan, les alginates et les cyclodextrines comme molécules-outils pour la formulation de matériaux d'intérêt biomédical

I. 1. Les alginates et le chitosan dans le domaine biomédical

I. 1. 1. Les alginates

I. 1. 1. 1. Obtention des alginates

Les alginates sont des polymères anioniques naturels généralement obtenus à partir d'algue brune (*Phaeophyceae*). Ces polymères sont extraits de l'algue par traitement par des solutions alcalines (de soude aqueuse par exemple). L'extrait est filtré et du chlorure de sodium ou de calcium est ajouté au filtrat pour précipiter l'alginate sous forme de sel. Une poudre hydrosoluble d'alginate de sodium ou de calcium est finalement obtenue après purification.¹⁰⁶ L'acide alginique peut ensuite être obtenu à partir de ces sels d'alginate par traitement à l'acide chlorhydrique. Une autre voie de production d'alginates, par biosynthèse bactérienne (par des bactéries des genres *Azotobacter* et *Pseudomonas*), existe également.¹⁰⁷

I. 1. 1. 2. Composition des alginates

Les alginates sont des copolymères linéaires composés de blocs de résidus de β -D-mannuronate et d' α -L-guluronate liés en (1,4) (**Figure 37**).

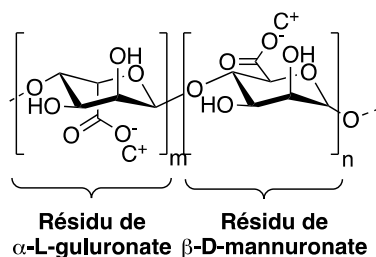


Figure 37 : Structure de l'alginate. C+ = contre-ion cationique.

Ces blocs sont constitués d'une répétition de cycles β -D-mannuronate, d'une succession de cycles α -L-guluronate ou d'une alternance de ces deux types de cycle. Les

alginates extraits de différentes sources varient par leur composition en les différents cycles ainsi que par la longueur de chaque bloc, si bien que plus de 200 types différents d'alginate sont actuellement produits. La masse molaire des alginates de sodium commercialement disponibles varie de 32 000 à 400 000 g/mol. Plus la masse molaire d'un alginate est importante, plus ses propriétés physiques pourront être intéressantes mais plus les solutions obtenues lors des procédés de préparation seront visqueuses. Ainsi, lors de la sélection d'un alginate, la masse molaire de celui-ci est un paramètre clé qui doit être considéré en fonction des propriétés physiques du matériau final envisagé et du procédé de fabrication mis en œuvre pour la formulation de ce matériau.¹⁰⁷

I. 1. 1. 3. Fonctionnalisation des alginates

Comportant des groupements hydroxyles ainsi qu'une fonction carboxylate, les alginates sont susceptibles d'être chimiquement modifiés afin de moduler les propriétés du polymère final. Dans leur revue, Pawar et Edgar¹⁰⁸ ont ainsi répertorié les principales chimies ayant été publiées concernant les alginates. Les principales fonctionnalisations de ces polymères apparaissent alors comme étant leur acétylation,¹⁰⁹⁻¹¹⁴ leur phosphorylation,¹¹⁵ leur sulfatation,¹¹⁶⁻¹¹⁸ leur modification par des groupements hydrophobes,¹¹⁹⁻¹²⁴ leur modification par des molécules de signalisation permettant l'attachement cellulaire comme par exemple le galactose¹²⁵⁻¹²⁷ ou le peptide d'adhésion cellulaire GRGDY¹²⁸ et le greffage de polymères sur leur chaîne.¹²⁹⁻¹³⁶

I. 1. 1. 4. Formulation des alginates

Les alginates peuvent être formulés sous trois formes principales :¹³⁷

- sous forme d'hydrogels, qui sont des réseaux tridimensionnels composés de polymères hydrophiles et contenant une quantité importante d'eau. Ces hydrogels d'alginate peuvent alors être obtenus de différentes manières comme par réticulation ionique (en utilisant des ions divalents tels que le Ca^{2+} , le Mg^{2+} ou encore le Fe^{2+} en tant qu'agents de réticulation), par transition de phase, par polymérisation radicalaire ou encore plus récemment par chimie « click » ;

- sous forme de microsphères pouvant être solides et préparées par émulsion et évaporation de solvant ou composées de gel et dans ce cas préparées par réticulation ionique en milieu aqueux ;
- sous forme d'échafaudages poreux fabriqués par lyophilisation ou encore par électrofilage de nanofibres.

I. 1. 1. 5. Application des alginates dans le domaine biomédical

Du fait notamment de leur biocompatibilité, leur faible toxicité et leur faible coût, les alginates sont très utilisés dans le domaine biomédical.¹⁰⁷ Dans la littérature, ils peuvent alors être retrouvés sous leurs différentes formes décrites précédemment pour diverses applications comme la délivrance de molécules actives ou l'ingénierie tissulaire (**Tableau 5**).

Tableau 5 : Exemples d'application de l'alginate dans le domaine biomédical.

Forme de l'alginate	Type d'application	Exemples
Hydrogels	Ingénierie tissulaire	Régénération osseuse ¹³⁸ Matrice extracellulaire synthétique ¹²⁸ Injection intracoronaire pour remodelage cardiaque ¹³⁹
	Délivrance d'éléments actifs biologiques	Facteurs de croissance ^{140, 141} Cellules ¹⁴²
Microsphères	Délivrance de molécules actives	Isoniazide (antimycobactérien), ¹⁴³ théophylline (bronchodilatateur), ¹⁴⁴ tartrate de métoprolol (β -bloquant), ¹⁴⁵ furosémide (diurétique), ¹⁴⁶ rifampicine et gatifloxacine (antibiotiques), ^{147, 148} ibuprofène (AINS), ¹⁴⁹ metformine (antidiabétique) ¹⁵⁰
	Délivrance d'éléments actifs biologiques	Insuline ¹⁵¹ Nétrine-1 (protéine de guidage axonal) ¹⁵² Cellules souches mésenchymateuses (CSM) ¹⁵³⁻¹⁵⁶ ADN ^{157, 158} Glucocérébrosidase ¹⁵⁹
Échafaudages poreux	Ingénierie tissulaire	Régénération osseuse ^{160, 161} Régénération du cartilage ¹⁶²

I. 1. 2. Le chitosan

I. 1. 2. 1. Obtention du chitosan

Le chitosan est un polymère obtenu à partir de la chitine. Cette chitine, ou poly (β -(1-4)-*N*-acétyl-D-glucosamine) (**Figure 38**), est un polysaccharide naturel synthétisé par une grande variété d'organismes vivants. C'est le biopolymère le plus abondant au monde après la cellulose.¹⁶³

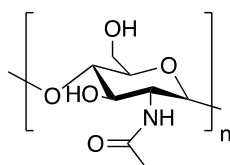


Figure 38 : Structure de la chitine.

La chitine se présente à l'état naturel sous forme de microfibrilles cristallines, participant notamment à la structure de l'exosquelette des arthropodes. Elle se retrouve également dans d'autres organismes vivants, remplissant des fonctions liées au renforcement et à la résistance de certaines parties de l'organisme (carapace des crabes et crevettes, etc.). Ce polymère est insoluble dans tous les solvants communs.¹⁶³

I. 1. 2. 2. Composition du chitosan

La désacétylation partielle (à hauteur d'au moins 50 %) de la chitine en conditions alcalines (soude aqueuse concentrée) ou par hydrolyse enzymatique en présence de chitine-désacétylase forme le chitosan, qui est le dérivé le plus important de la chitine en termes d'applications.¹⁶³

Le chitosan (**Figure 39**) est un polymère semi-cristallin à l'état solide, qui est soluble en milieu acide par protonation de ses fonctions amines primaires, formant alors un polyélectrolyte cationique.¹⁶³ Il possède une masse molaire allant de 300 à 1000 kDa.¹⁶⁴

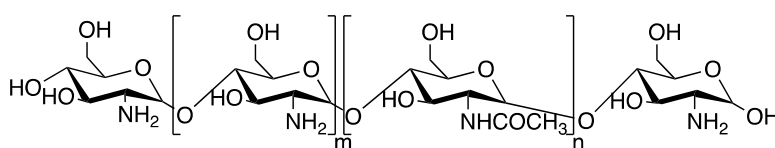


Figure 39 : Structure du chitosan.

I. 1. 2. 3. Fonctionnalisation du chitosan

Présentant plusieurs fonctions réactives (-NH₂, -OH), le chitosan peut-être chimiquement modifié afin de lui conférer diverses propriétés. La réactivité de sa fonction amine primaire permet par exemple d'obtenir un chitosan triméthylé, *N*-succinylé, thiolé ou encore sous forme d'azoture.¹⁶⁵ Il est également possible de synthétiser un chitosan lié à un élément de reconnaissance spécifique de cellules, virus ou bactéries comme un sucre tel que

le galactose,¹⁶⁶ par réaction de l'amine primaire du polymère. Des chitosans liés à des éthers couronnes ont également été préparés avec succès, conférant alors au polymère une plus forte capacité de complexation ainsi qu'une meilleure sélectivité pour les ions métalliques.¹⁶⁵

I. 1. 2. 4. Formulation du chitosan

Le chitosan peut être formulé sous quatre formes principales :¹⁶³

- sous forme d'hydrogels, qui peuvent alors être obtenus par réticulation du chitosan en utilisant des agents de réticulation¹⁶⁷ ou des anions multivalents ;¹⁶⁸
- sous forme de films, qui sont le plus souvent obtenus par dissolution du chitosan puis moulage et séchage,¹⁶⁹ éventuellement en présence d'un plastifiant¹⁷⁰ et suivi d'une réticulation ;¹⁷¹
- sous forme de fibres, qui peuvent par exemple être formulées par extrusion¹⁷² ou encore par injection d'une solution de chitosan dans un bain de coagulation ;¹⁷³
- sous forme d'éponges, souvent préparées par lyophilisation d'une solution de chitosan.¹⁷⁴

I. 1. 2. 5. Applications du chitosan dans le domaine biomédical

On retrouve ainsi le chitosan, sous forme modifiée ou non, dans des domaines très variés tels que l'agriculture (enrobage des semences, protection antigél...), l'alimentaire (conservateurs, revêtements antibactériens...) ou encore le traitement des déchets et des eaux (retrait d'ions métalliques, réduction des odeurs...). Tout comme les alginates, on retrouve dans la littérature le chitosan plus particulièrement dans le domaine des biomatériaux, sous ses quatre formes principales (**Tableau 6**).¹⁶³

Tableau 6 : Exemples d'application du chitosan dans le domaine biomédical.

Forme du chitosan	Type d'application	Exemples
Hydrogels	Délivrance de molécules actives	Thymol (antimicrobien), ¹⁷⁵ amoxicilline (antibactérien), ^{176, 177} hydrochlorure de benzydamine (AINS), ¹⁷⁸ doxorubicine et docétaxel (antitumoraux), ¹⁷⁹ héparine (anticoagulant) ¹⁸⁰
	Cicatrisation de plaies ^{181, 182} et brûlures ^{183, 184}	
	Ingénierie tissulaire	Régénération du cartilage ¹⁸⁵ Traitement de la hernie discale ¹⁸⁶ Adhésif pour tissus ¹⁷⁷
	Délivrance d'éléments actifs biologiques	CSM, ¹⁸⁷ facteurs de croissance, ¹⁸⁸ protéines ¹⁸⁹
Films	Délivrance de molécules actives	Paclitaxel (antitumoral), ¹⁹⁰ dexaméthasone (corticoïde), ¹⁹¹ antibiotiques, ^{192, 193} griséofulvine (antifongique), ¹⁹⁴ metformine (antidiabétique) ¹⁷¹
	Délivrance d'éléments actifs biologiques	CSM ^{169, 195} Protéines ¹⁹⁶
	Ingénierie tissulaire	Régénération osseuse ^{171, 196}
	Cicatrisation ^{170, 195, 197}	
Fibres	Systèmes fibreux antibactériens ¹⁹⁸⁻²⁰⁰	
	Cicatrisation ^{201, 202}	
	Ingénierie tissulaire	Reconstruction nerveuse, ²⁰³ du ligament, ²⁰⁴ de l'os ^{172, 173, 205, 206}
Éponges	Matériaux antimicrobiens ^{207, 208}	
	Cicatrisation ²⁰⁹⁻²¹³	
	Délivrance de molécules actives	Vancomycine, amphotéricine B et amikacine (antibiotiques), ^{214, 215} hydrochlorure de buspirone (anxiolytique) ²¹⁶
	Ingénierie tissulaire	Régénération osseuse, ¹⁷⁴ du cartilage ²¹⁷

Ainsi, les alginates et le chitosan sont des macromolécules de choix pour le développement de biomatériaux polymériques et c'est pourquoi ils ont été choisis comme composants de base des CoPEC formulés au cours de cette thèse.

I. 2. Les cyclodextrines comme molécules cages aux multiples intérêts

I. 2. 1. Nature des cyclodextrines « natives »

Les cyclodextrines sont des oligosaccharides cycliques obtenus lors de la dégradation enzymatique de l'amidon par transglycosylation intramoléculaire opérée par la cyclodextrine glucanotransferase. Les cyclodextrines « natives » sont composées de six, sept ou huit unités glucopyranoses liées en α -(1,4) et sont alors respectivement nommées α -, β - et γ -cyclodextrines en fonction du nombre de ces unités (**Figure 40**).²¹⁸

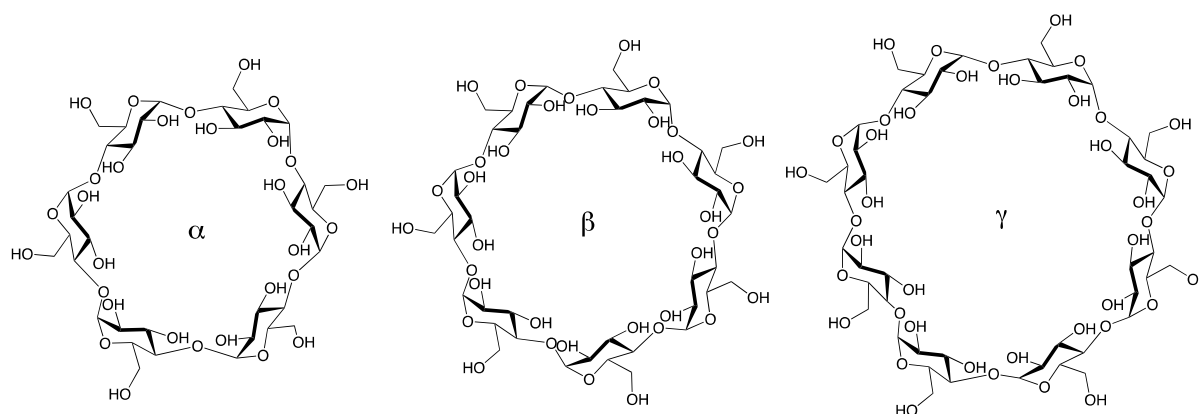


Figure 40 : Structures des trois cyclodextrines « natives ».

A partir des cyclodextrines « natives », divers dérivés peuvent être synthétisés, principalement par fonctionnalisation de leurs groupements hydroxyles primaires et secondaires. Ces fonctionnalisations peuvent par exemple être des aminations, des estérifications ou encore des étherifications. En fonction de l'application visée (comme par exemple le greffage sur un polymère) une cyclodextrine peut donc être modifiée à souhait.²¹⁹

I. 2. 2. Formation de complexes d'inclusion à base de cyclodextrines

Les cyclodextrines ont la particularité d'avoir une structure en forme de cône tronqué présentant une surface externe hydrophile, du fait de la présence de groupements hydroxyles

secondaires sur la partie externe la plus large et primaires sur la partie externe la moins large, et une cavité interne hydrophobe résultant notamment de la présence d'éléments apolaires que sont les carbones et les oxygènes en liaison éther (**Figure 41**). Ainsi, les cyclodextrines sont des molécules cages qui ont la capacité de former des complexes d'inclusion avec diverses molécules « invitées » hydrophobes.²¹⁹

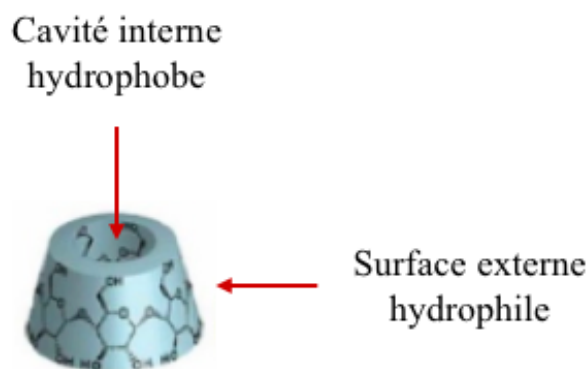


Figure 41 : Représentation schématique d'une cyclodextrine.

Une des principales différences entre les trois cyclodextrines « natives » est la taille de leur cavité interne et donc également le volume de cette cavité (**Tableau 7**). Ces différences définissent le type de molécule que ces cyclodextrines peuvent contenir car la formation d'un complexe d'inclusion entre une cyclodextrine et la partie apolaire d'une molécule invitée dépend grandement de la compatibilité de taille entre ces molécules et la cavité interne de la cyclodextrine en question. Ainsi, l' α -cyclodextrine permet de former des complexes avec des molécules de faible poids moléculaire ou contenant une chaîne aliphatique, la β -cyclodextrine est particulièrement adaptée à la complexation de cycles aromatiques et d'hétérocycles et la γ -cyclodextrine est, quant à elle, à privilégier pour la complexation de molécules plus grosses telles que des macrocycles.²¹⁹

Tableau 7 : Taille et volume de la cavité interne des cyclodextrines « natives ».

	α -cyclodextrine	β -cyclodextrine	γ -cyclodextrine
Taille de la cavité interne (Å)	4,7 – 5,3	6,0 – 6,5	7,5 – 8,3
Volume de la cavité interne (Å³)	174	262	427

La principale force motrice de la formation d'un complexe d'inclusion impliquant une cyclodextrine est le gain d'entropie provoqué par la sortie de molécules d'eau de la cavité lors du processus de complexation. Ces molécules d'eau sont alors remplacées par des parties plus hydrophobes pour former une association apolaire-apolaire menant alors à un état de plus basse énergie, donc plus stable. Le complexe ainsi formé se trouve alors en équilibre dynamique principalement régi par des interactions faibles (de type Van Der Waals); aucune liaison covalente n'est créée ou rompue durant la complexation. Ces complexations peuvent avoir lieu aussi bien à l'état cristallin qu'en solution. Dans ce dernier cas de figure, le solvant privilégié est l'eau mais la complexation peut également être menée dans un système à co-solvants impliquant n'importe quel solvant organique.

En général, une seule molécule invitée est incluse dans une cyclodextrine, formant alors un complexe d'inclusion stœchiométrique (ratio cyclodextrine : molécule invitée de 1 : 1). Néanmoins, dans le cas de certaines molécules de faible poids moléculaire, plus d'une molécule peuvent être incluses dans la cavité d'une cyclodextrine. De la même manière, dans le cas de molécules invitées de haut poids moléculaire, plus d'une cyclodextrine pourront être impliquées dans des complexes d'inclusion avec une unique molécule invitée (**Figure 42**).^{218,}

219

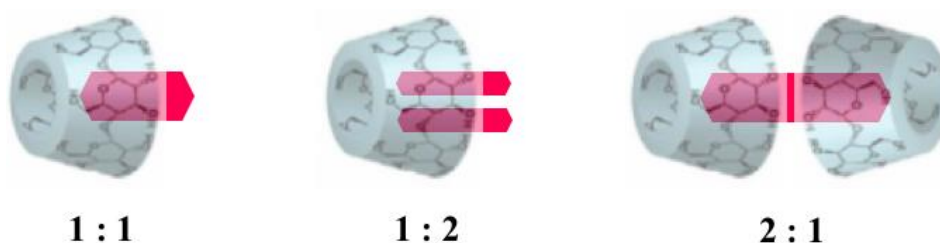


Figure 42 : Illustrations de complexes d'inclusion à base de cyclodextrine, en fonction du ratio cyclodextrine : molécule invitée.

I. 2. 3. Applications des cyclodextrines

La complexation par les cyclodextrines permet d'améliorer les propriétés apparentes des molécules invitées. Elle peut par exemple augmenter leur solubilité en milieux aqueux, les protéger de la chaleur ou de la lumière ou encore contrôler leur volatilité. Les cyclodextrines trouvent donc de très nombreuses applications dans des domaines aussi variés que l'industrie alimentaire, cosmétique, textile ou encore pharmaceutique (**Tableau 8**).

Tableau 8 : Exemples d'application des cyclodextrines.

Industrie	Exemples d'application
Alimentaire	Encapsulation d'arômes ²²⁰ Masquage d'amertume ²²¹
Cosmétique	Délivrance de molécules odorantes ²²² Encapsulation d'agents de protection solaire ²²³⁻²²⁵ Limitation de la pénétration cutanée de conservateurs ²²⁶
Textile	Agent de lavage en solution ²²⁷ Teinture ²²⁸ Incorporation de molécules actives (odorantes, antimicrobiennes) ²²⁹
Pharmaceutique	Délivrance de substances actives (petites molécules, gènes...) ^{230, 231}

Parmi les trois cyclodextrines « natives », la β -cyclodextrine (β CD) est la plus accessible et la moins coûteuse. De plus, du fait de sa capacité à former des complexes d'inclusion avec des composés aromatiques et hétérocycliques, elle est particulièrement employée dans le domaine biomédical, ce qui justifie son utilisation dans ces travaux de thèse.

Dans ces travaux, deux polyélectrolytes ont été utilisés : l'alginate de sodium et le chitosan. Les principales fonctions réactives du chitosan sont des alcools et surtout une fonction amine primaire. Celles de l'alginate de sodium sont des alcools et un carboxylate. Ainsi, dans le cadre de cette thèse, afin de lier chimiquement la β -cyclodextrine à ces deux polymères, des fonctionnalisations préalables de la cyclodextrine étaient nécessaires.

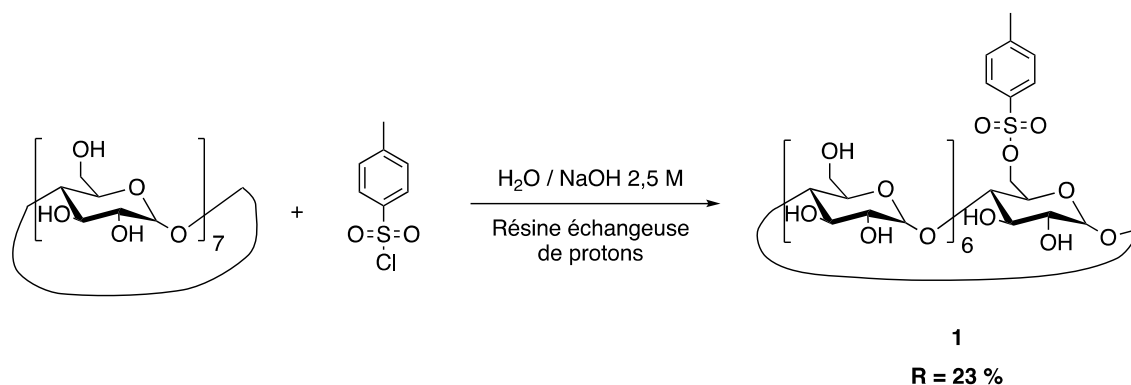
II. Modification de la β -cyclodextrine en vue de son greffage sur le chitosan et l'alginate

II. 1. Modification de la β -cyclodextrine pour la fonctionnalisation du chitosan

Pour le greffage de la cyclodextrine sur le chitosan, il a été choisi de suivre des procédures existantes consistant à introduire un groupement tosyle sur la cyclodextrine puis à effectuer une substitution nucléophile impliquant ce groupement comme groupement partant et l'amine nucléophile du chitosan.

Dans un premier temps, une méthode de tosylation de la β -cyclodextrine, utilisant la pyridine réputée comme étant le solvant optimal pour la monotosylation, sur le groupement hydroxyle situé sur le carbone en position 6 de la cyclodextrine et menant *a priori* à de bons rendements, a été envisagée.²³² Cependant, la pyridine ne pouvant pas être totalement éliminée en fin de réaction (signaux détectables en ^1H RMN) et menant alors à un produit de faible pureté non satisfaisant pour un greffage ultérieur sur les polymères, une autre méthode²³³ n'impliquant pas l'utilisation de pyridine a été mise en œuvre.

Dans cette méthode, la tosylation a eu lieu *via* une substitution nucléophile entre l'hydroxyde en position 6 de la cyclodextrine et le chlorure de tosyle dans une solution aqueuse de soude (**Schéma 1**). De plus, la précipitation/purification du produit après réaction a été effectuée par acidification du milieu grâce à l'utilisation d'une résine échangeuse de protons, facilement extractible, permettant le remplacement des ions sodium du milieu par des protons. La solubilité dans l'eau de la cyclodextrine tosylée étant bien inférieure à celle de la β -cyclodextrine native ($< 0,04$ g/100 mL d'eau contre environ 1,85 g/100 mL), la cyclodextrine n'ayant pas réagi a facilement été éliminée après filtration et lavage à l'eau du produit précipité.

Schéma 1 : Tosylation de la β -cyclodextrine.

La tosylation a été vérifiée par la présence de signaux propres au groupement tosylyle ($\delta = 2,43$; $7,43$ et $7,75$ ppm) sur le spectre ^1H RMN, permettant également de noter un ratio entre les molécules de cyclodextrine et les groupements tosylyle de l'ordre de 1 : 1.

Malgré un rendement relativement faible (23 %) mais néanmoins cohérent par rapport à la littérature de référence (rendement de 35 % obtenu par Tripodo *et al.*²³³), cette méthode a permis l'obtention d'une cyclodextrine monotosylée **1** d'une bien meilleure pureté (pas de solvant résiduel dans le produit) que lors des premiers essais de synthèse et donc beaucoup plus adaptée à une utilisation ultérieure lors du greffage sur le chitosan.

II. 2. Modification de la β -cyclodextrine pour la fonctionnalisation de l'alginate

Concernant le greffage de la cyclodextrine sur l'alginate de sodium, une des deux stratégies envisagées consistait à faire réagir une cyclodextrine monoaminée sur les groupements hydroxyles activés de l'alginate.

La synthèse de la β -cyclodextrine aminée, basée sur les travaux de Xu *et al.*,²³⁴ a alors été effectuée en deux étapes en partant de la cyclodextrine monotosylée. Premièrement, le groupement tosylyle de la cyclodextrine monotosylée **1** a été converti de manière quantitative en azide par une substitution nucléophile impliquant l'azoture de sodium, l'azoture étant nucléophile et le tosylyle étant un bon groupement partant (**Schéma 2**). La réaction a été effectuée dans le DMF à 80°C et le produit **2** a été isolé par précipitation dans l'acétone et filtration.

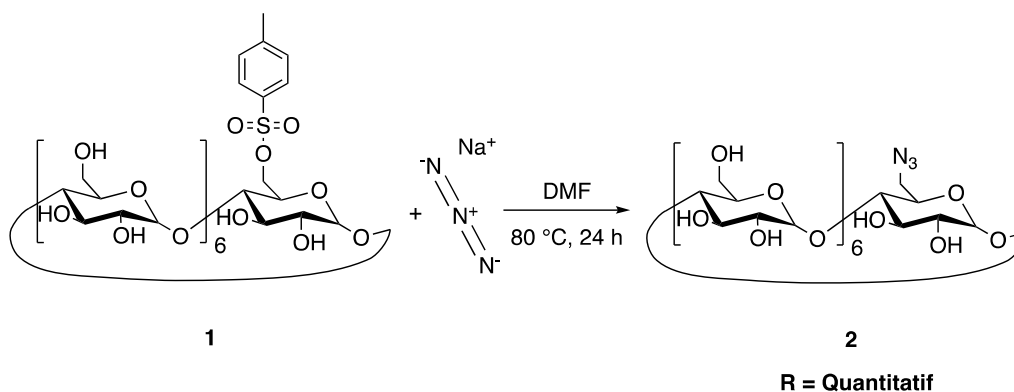


Schéma 2 : Conversion de la β-cyclodextrine tosylée en β-cyclodextrine azidée.

La disparition des signaux propres aux groupements tosylé autour de 7,5 ppm et de 2,5 ppm a alors été observée par ^1H RMN. De plus, l'apparition d'une bande à 2106 cm^{-1} sur le spectre FT-IR, caractéristique de l'étirement de l'azide ($\text{N}=\text{N}^+=\text{N}^-$), a permis de confirmer la substitution par cet azide.

Le groupement azide de la cyclodextrine a ensuite été réduit en amine selon une réaction de Staudinger (**Schéma 3**). Le phosphore d'une triphénylphosphine a tout d'abord réagi sur l'azide de la cyclodextrine pour former un intermédiaire phosphazide qui s'est réarrangé en iminophosphorane. Cet iminophosphorane a ensuite été hydrolysé par ajout d'ammoniaque pour donner la β-cyclodextrine aminée **3**. Le produit a été purifié en précipitant l'oxyde de triphénylphosphine par ajout d'eau et en l'éliminant par simple filtration, puis il a été lavé à l'acétone. **3** a alors été obtenu de manière quantitative.

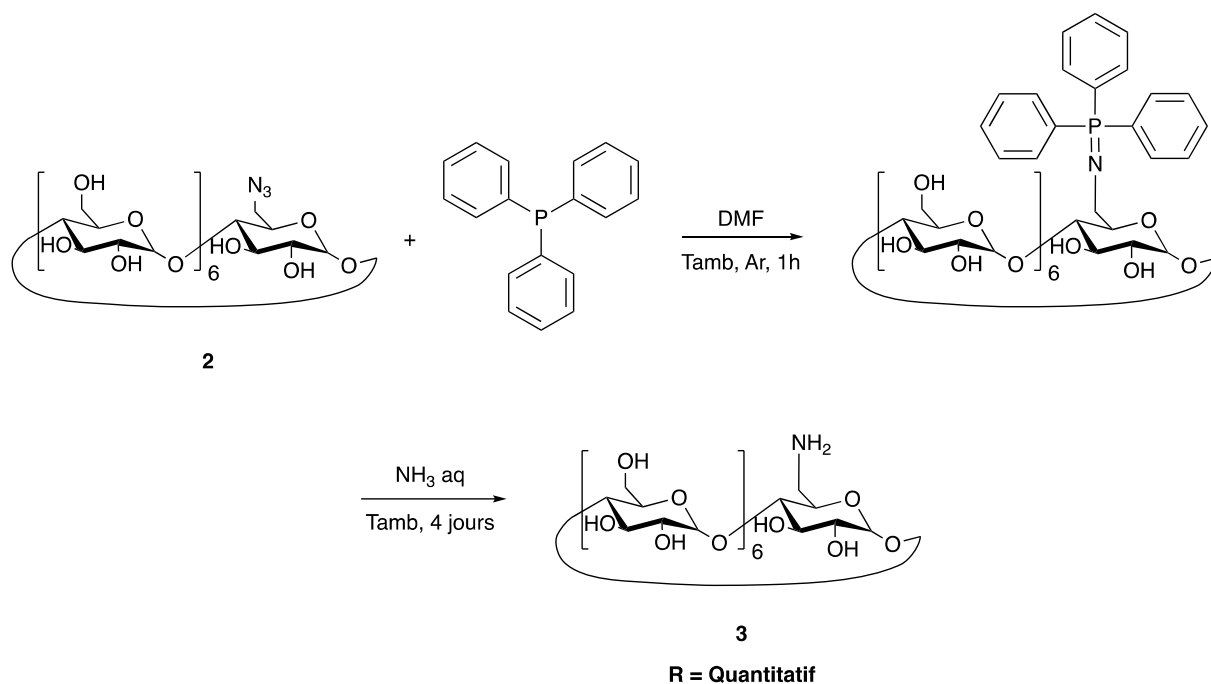


Schéma 3 : Conversion en deux étapes de la β -cyclodextrine azidée en β -cyclodextrine aminée.

En FT-IR, la disparition de la bande caractéristique de l'azide (2106 cm^{-1}) et l'apparition de bandes à 1608 et 3302 cm^{-1} , respectivement caractéristiques de la déformation et de l'étirement de la liaison N-H d'une amine, ont permis de confirmer la réduction de la fonction azide.

Ces premières fonctionnalisations de la β -cyclodextrine ont ainsi permis d'obtenir des dérivés contenant des fonctions réactives vis-à-vis des différents groupements fonctionnels du chitosan et de l'alginate de sodium, donc des dérivés adaptés au greffage de la β -cyclodextrine sur ces deux polyélectrolytes.

III – Fonctionnalisation du chitosan et de l'alginate par la β -cyclodextrine pour la formulation ultérieure de CoPEC capables de contenir et relarguer des molécules hydrophobes

III. 1. Greffage de la β -cyclodextrine sur le chitosan

La β -cyclodextrine a été greffée au chitosan en suivant une méthode décrite par Pattarapond *et al.*²³⁵

Dans cette méthode, le greffage s'est produit par une substitution nucléophile impliquant le groupement tosyloxy de la β -cyclodextrine tosylée **1**, jouant le rôle de groupement partant, et l'amine du chitosan, jouant le rôle de nucléophile, en milieu acide permettant la solubilisation du polymère (**Schéma 4**).

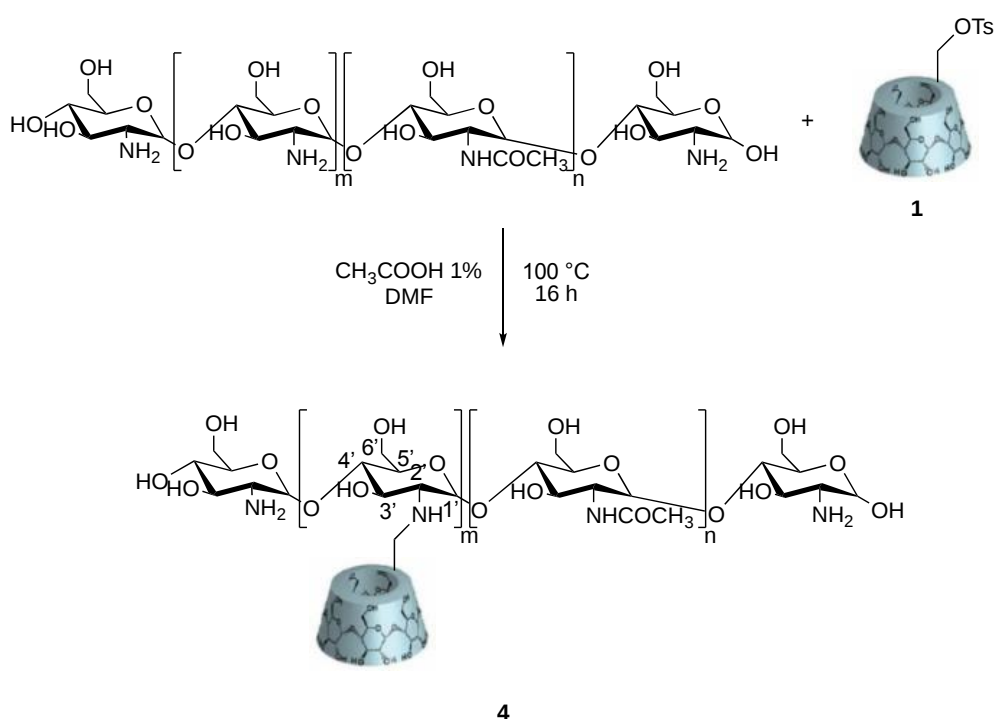


Schéma 4 : Greffage de la β -cyclodextrine sur le chitosan.

Une dialyse, à travers une membrane avec un seuil de rétention des molécules de 3 500 Da, a permis de purifier le produit **4** en évacuant les cyclodextrines n'ayant pas réagi avec le chitosan puis une lyophilisation a permis d'obtenir le produit sous forme solide.

Le succès du greffage a alors pu être apprécié par ^1H RMN (**Figure 43**). En effet, on peut constater sur le spectre une présence conjointe des signaux caractéristiques du chitosan (un massif vers 4 ppm correspondant aux protons en position 1', 3', 4', 5' et 6' et un singulet large à environ 3 ppm correspondant au proton en position 2' des cycles) et de la β -cyclodextrine (un massif vers 4 ppm correspondant aux protons en position 2, 3, 4, 5 et 6 et un singulet à environ 5 ppm correspondant au proton en position 1 des cycles).

On distingue parmi ces signaux un signal isolé spécifique à la cyclodextrine autour de 5 ppm et un signal isolé spécifique au chitosan autour de 3 ppm.

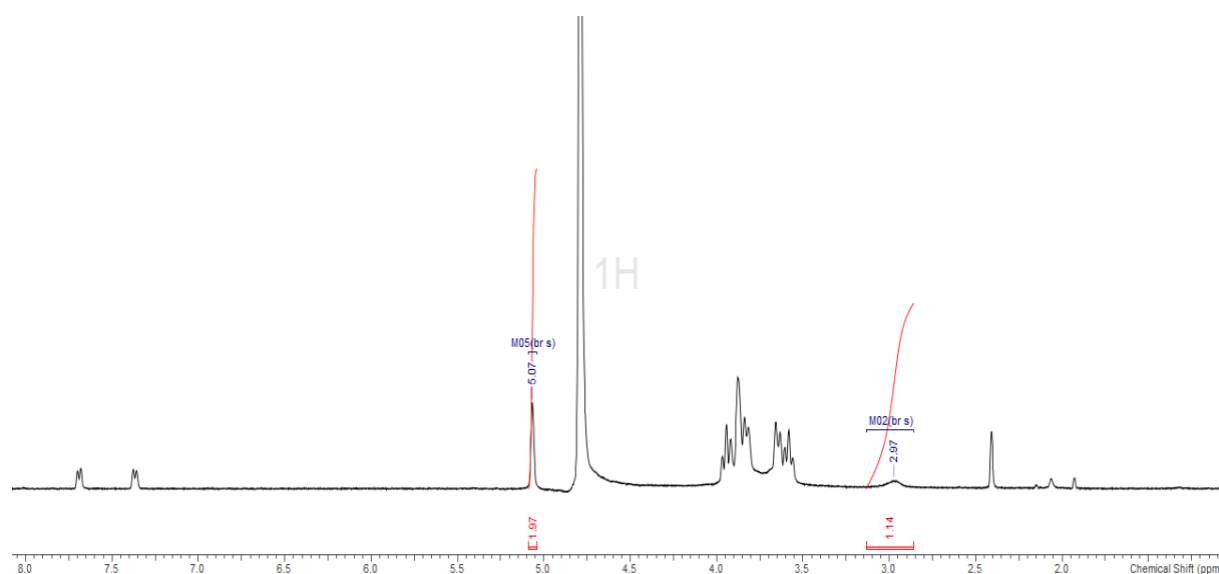


Figure 43 : Spectre ^1H RMN du βCD -chitosan.

Ces deux signaux ont ainsi permis la détermination du degré de substitution (DS) du polymère, correspondant à la proportion de β -cyclodextrines greffées par rapport aux unités de répétition de polymère. En effet, le signal de la cyclodextrine à 5 ppm correspond au proton en position 1 sur les cycles de β -cyclodextrine et représente donc 7 protons (car il y a 7 cycles dans la β -cyclodextrine). Le signal du chitosan à environ 3 ppm correspond, quant à lui, au proton en position 2 des cycles de chitosan qui est présent une fois par unité de répétition du polymère. Pour faciliter le calcul tout en restant cohérent, l'approximation que le chitosan était totalement désacétylé a été faite, ce qui était acceptable étant donné que le chitosan était selon le fournisseur désacétylé à hauteur d'au moins 90 %. Le degré de substitution du chitosan greffé a donc pu être déterminé *via* l'équation :

$$DS (\%) = ((H_1CD / 7) / H_2Chi) \times 100$$

où H_1CD correspond à l'intégration du signal RMN du proton en position 1 de la β -cyclodextrine et H_2Chi correspond à l'intégration du signal RMN du proton en position 2 du chitosan. Dans ces travaux, deux lots de β CD-chitosan, préparés selon le même protocole, ont été utilisés. Des degrés de substitution du même ordre, c'est-à-dire de 19 et 25 %, ont été obtenus. Ces degrés ont été considérés comme adaptés à l'utilisation des polymères greffés correspondant dans la conception de CoPEC car ils étaient suffisamment faibles pour conserver une quantité de sites ioniques ($-NH_3^+$) relativement importante afin de former des complexes avec les polyanions, tout en permettant l'inclusion d'une quantité significative de molécules extérieures.

III. 2. Greffage de la β -cyclodextrine sur l'alginate

Concernant le greffage de la β -cyclodextrine sur l'alginate, deux méthodes ont été envisagées, chacune d'elles permettant de greffer la cyclodextrine sur un groupement différent du polymère.

Dans la première méthode (Méthode 1), inspirée du travail de Yang *et al.*,²³⁶ le greffage a été effectué sur le groupement carboxylate de l'alginate (**Schéma 5**). Les groupements carboxylates de l'alginate ont dans un premier temps été partiellement protonés dans du DMF en présence d'acide paratoluènesulfonique. Un couplage entre les fonctions acides carboxyliques ainsi obtenues et un groupement hydroxyle de la β -cyclodextrine, grâce à l'utilisation d'EDC-HCl en tant qu'activateur d'acide carboxylique et d'APTS en tant que catalyseur de réaction d'estérification, a alors permis d'obtenir le β CD-alginate qui a été précipité par ajout d'éthanol. Une dialyse du produit dissous dans de l'eau a alors permis de le purifier. Le β CD-alginate purifié **5** a été isolé par lyophilisation.

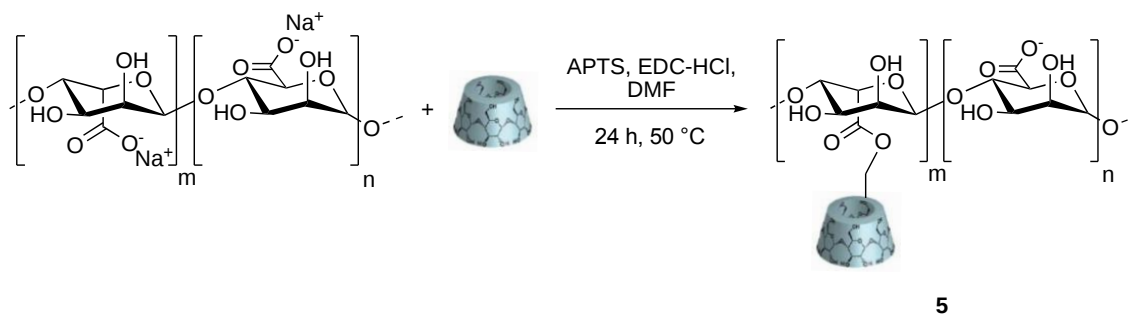


Schéma 5 : Greffage de la β -cyclodextrine sur l'alginate selon la méthode 1.

Le spectre ^1H RMN (**Figure 44**) a permis de confirmer le succès du greffage par la présence des signaux caractéristiques de l'alginate (signaux autour de 3,5-4 ppm) et de la β -cyclodextrine (signaux autour de 3,5-4 ppm et à 5 ppm).

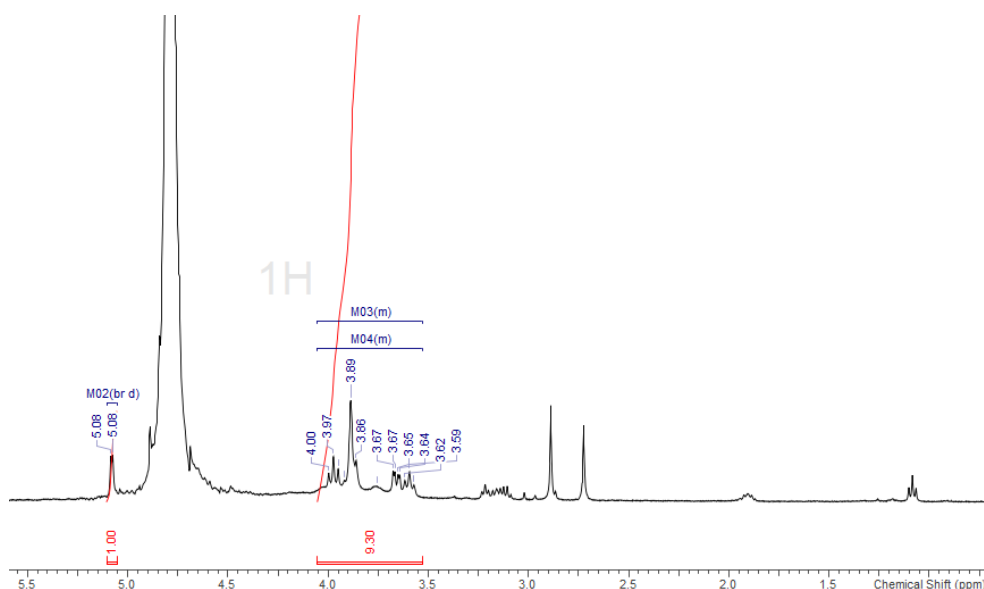


Figure 44 : Spectre ^1H RMN du β CD-alginate synthétisé selon la méthode 1.

Le degré de substitution a dans ce cas été calculé en utilisant les équations suivantes, décrites dans l'étude de Tan *et al.* :²³⁷

$$H_{1\text{CD}} / H_{\text{tert}} = 7X / (28X + 4n)$$

$$\text{DS (\%)} = (X / n) \times 100$$

où $H_{1\text{CD}}$ correspond à l'intégration du signal RMN des protons en position 1 de la β -cyclodextrine (autour de 5 ppm), H_{tert} correspond à l'intégration du signal RMN des protons situés sur les carbones tertiaires de l'alginate et de la β -cyclodextrine (3,5-4 ppm), X

correspond au nombre de moles de β -cyclodextrine greffée et n correspond au nombre moyen de monosaccharides dans une chaîne d'alginate (la masse molaire d'une chaîne d'alginate étant dans le cas présent de 155 000 g/mol, n vaut ici 783).

Le degré de substitution du β CD-alginate formulé selon la méthode 1 était de 11 % ce qui, tout comme dans le cas du β CD-chitosan, semblait suffisant pour l'inclusion d'une quantité significative de molécules extérieures tout en étant assez faible pour permettre aux CoPEC de se former.

Dans la seconde méthode (Méthode 2), inspirée du travail de Puemsab *et al.*²³⁸ adapté ici à un autre type de cyclodextrine, le greffage a été effectué sur les groupements hydroxyles de l'alginate et non pas sur le carboxylate (**Schéma 6**).

Cette fonctionnalisation a dans ce cas nécessité deux étapes. Lors de la première étape, les groupements hydroxyles de l'alginate ont été activés par réaction avec du bromure de cyanogène en milieu basique, formant un ester de cyanate **6**.²³⁹ Une première dialyse à travers une membrane avec un seuil de rétention des molécules de 12-14 000 Da a permis d'évacuer le bromure de cyanogène n'ayant pas réagi. Dans la seconde étape, les esters de cyanate de l'intermédiaire **6** ont réagi avec les amines de la β -cyclodextrine aminée **3** pour former le β CD-alginate **7**.

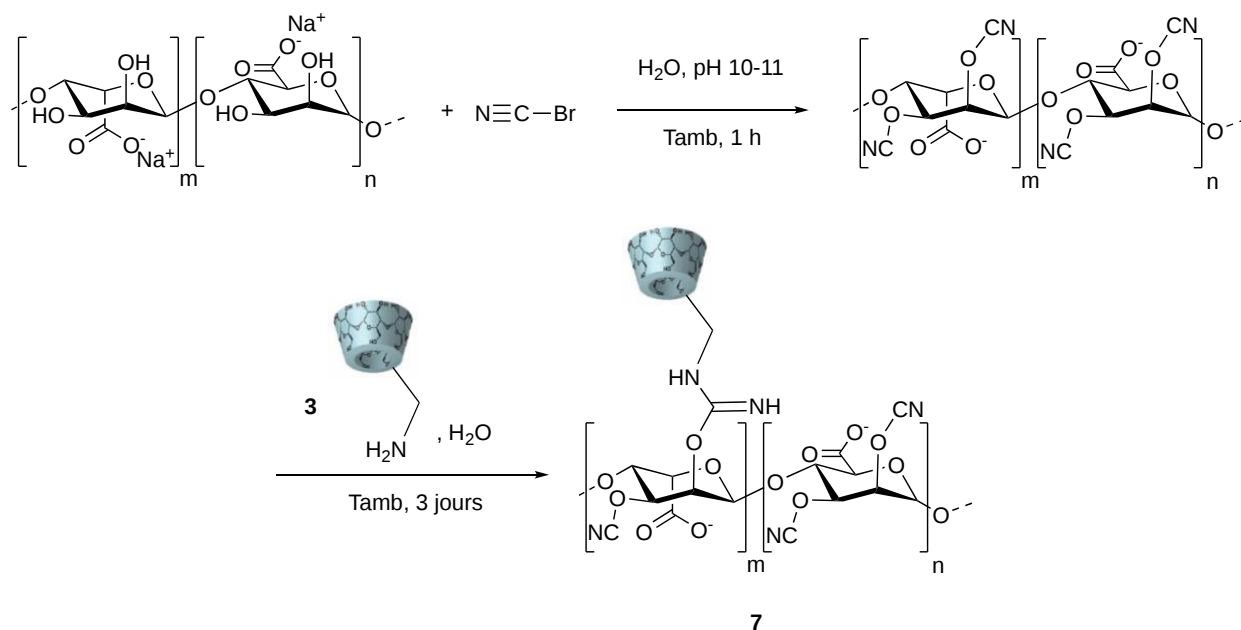


Schéma 6 : Greffage en deux étapes de la β -cyclodextrine sur l'alginate selon la méthode 2.

Une nouvelle dialyse, à travers une membrane avec un seuil de rétention des molécules de 12-14 000 Da, a permis de purifier l'alginate greffé en évacuant les molécules de cyclodextrine n'ayant pas réagi avec le polymère.

La réussite du greffage a à nouveau été vérifiée par la présence des signaux caractéristiques de l'alginate (signaux autour de 3,5-4 ppm) et de la β -cyclodextrine (signaux autour de 3,5-4 ppm et à 5 ppm) sur le spectre ^1H RMN du polymère greffé (**Figure 45**).

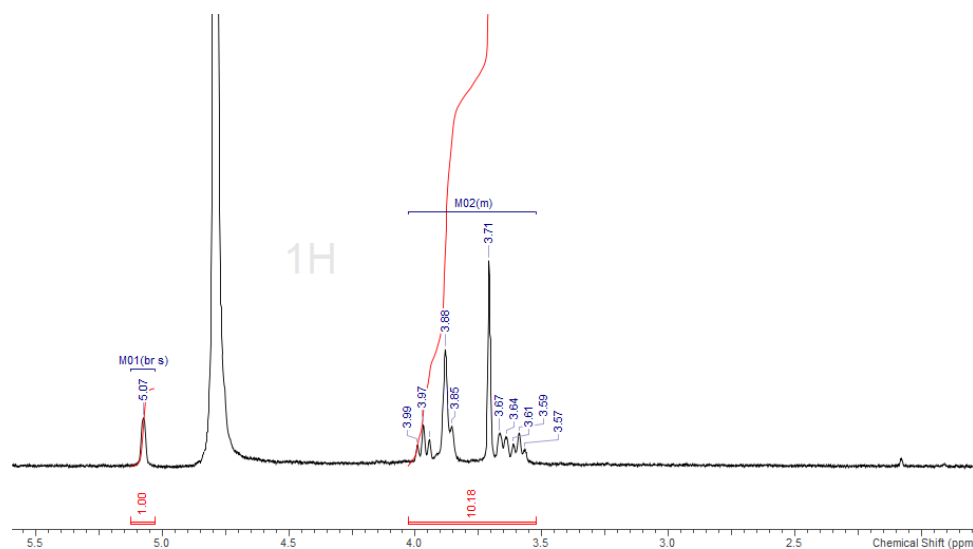


Figure 45 : Spectre ^1H RMN du β CD-alginate synthétisé selon la méthode 2.

Le degré de substitution du β CD-alginate **7** formulé selon la seconde méthode, calculé avec les équations de Tan *et al.* détaillées précédemment, était de 9 % donc toujours adéquat par rapport à l'utilisation ultérieure du polyelectrolyte.

Ce second type de fonctionnalisation de l'alginate est particulièrement adapté à l'utilisation ultérieure des polymères greffés dans ces études. En effet, ce greffage n'implique pas les fonctions carboxylates de l'alginate qui restent ainsi entièrement disponibles pour la formation de complexes avec des polycations lors de la formulation de CoPEC.

Ainsi, à travers diverses réactions impliquant notamment des β -cyclodextrines fonctionnalisées et les deux polymères choisis, le chitosan et l'alginate portant des β -cyclodextrines ont été synthétisés et ont pu être utilisés dans le cadre de la formulation de matériaux biosourcés fonctionnels (qui seront abordés en chapitre 3).

IV. Synthèse de dérivés d'adamantane et de cholestérol pour la formulation de CoPEC capables de contenir et relarguer des molécules hydrophiles

Les cyclodextrines étant adaptées à la complexation de molécules hydrophobes uniquement, une stratégie complémentaire a été mise en place afin de rendre également possible l'inclusion de molécules hydrophiles dans les matériaux finaux. Dans le cadre de cette stratégie, deux molécules contenant une partie hydrophobe connue pour former un complexe d'inclusion avec la β -cyclodextrine, c'est-à-dire l'adamantane ou le cholestérol, et une fonction maléimide, réactive vis-à-vis de molécules hydrophiles contenant notamment un groupement thiol, ont été synthétisées.

IV. 1. L'adamantane et le cholestérol en complexe d'inclusion avec la β -cyclodextrine

IV. 1. 1. L'adamantane en complexe d'inclusion avec la β -cyclodextrine

Du fait notamment de son importante hydrophobicité, l'adamantane, ou tricyclo[3. 3. 1. 1,3,7]décane, une molécule essentiellement composée de carbone, forme un complexe d'inclusion avec la β -cyclodextrine. Ce complexe d'inclusion présente une stœchiométrie 1 : 1 dans laquelle l'intégralité de l'adamantane se situe dans la cavité hydrophobe de la cyclodextrine (**Figure 46**).²⁴⁰ Une constante d'association entre l'adamantane et la β -cyclodextrine de 1410 M^{-1} a récemment été reportée.²⁴¹

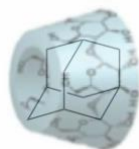


Figure 46 : Représentation du complexe d'inclusion β -cyclodextrine/adamantane.

La capacité de l'adamantane et de la β -cyclodextrine à former des complexes d'inclusion a été utilisée dans divers travaux pour la formulation d'assemblages polymériques

comme par exemple un réseau polymérique à base de poly(acide acrylique),²⁴² des hydrogels physiques à base de polyacrylamide²⁴³ ou encore des assemblages supramoléculaires à base d'acide hyaluronique.²⁴⁴

IV. 1. 2. Le cholestérol en complexe d'inclusion avec la β -cyclodextrine

Du fait de sa structure, et en particulier de la présence de cycles et d'une chaîne aliphatique au sein de celle-ci, le cholestérol, ou 10, 13-diméthyl-17-(6-méthylheptan-2-yl)-2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17-tétradécahydro-1*H*-cyclopenta[*a*]phenanthren-3-ol, est capable de former un complexe d'inclusion avec la β -cyclodextrine. Il a été très récemment démontré que ce complexe est en fait formé selon une stœchiométrie β -cyclodextrine : cholestérol 2 : 1, avec le groupement stérol du cholestérol dans la cavité d'une première cyclodextrine et sa queue aliphatique dans la cavité d'une seconde cyclodextrine (**Figure 47**)²⁴⁵. Dans la littérature, une constante d'association entre la β -cyclodextrine et le cholestérol de 17 000 M⁻¹ a été reportée.²⁴⁶

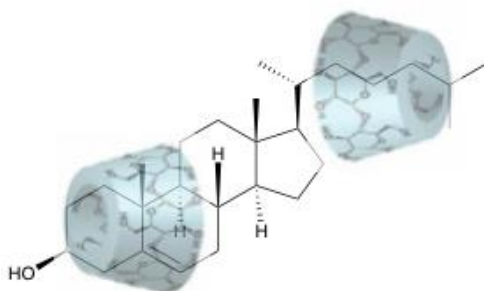


Figure 47 : Représentation du complexe d'inclusion β -cyclodextrine/cholestérol.

De la même manière que dans le cas de l'adamantane, les complexes β -cyclodextrine/cholestérol ont été mis à profit pour la formulation d'assemblages polymériques comme par exemple d'hydrogels.²⁴⁷ Par ailleurs, la formation de ces complexes a été valorisée par des applications dans le domaine agro-alimentaire. En effet, la β -cyclodextrine a été largement utilisée pour réduire la quantité de cholestérol présente dans certains aliments manufacturés communs, tels que le lait²⁴⁸ ou le fromage.²⁴⁹

Ainsi, l'adamantane et le cholestérol sont des candidats très intéressants pour la synthèse de molécules présentant une partie formant un complexe d'inclusion avec la β -cyclodextrine, ce qui justifie leur utilisation dans le cadre de cette thèse.

IV. 2. Synthèse d'un dérivé d'adamantane présentant une fonction maléimide

Une méthode décrite par Hooley *et al.*²⁵⁰ a été utilisée pour synthétiser une molécule présentant une partie adamantane et une fonction maléimide.

Cette synthèse a été effectuée en deux étapes (**Schéma 7**). Tout d'abord, l'acide *N*-adamantaneméthylmaléamique **8** a été obtenu par réaction entre l'anhydride maléique et l'amine primaire du 1-adamantaneméthylamine dans de l'éther éthylique anhydre et sous atmosphère d'argon. L'intermédiaire réactionnel **8**, insoluble dans l'éther, a alors formé un précipité blanc qui a facilement été collecté par filtration puis a été lavé à l'éther éthylique et enfin séché sous pression réduite avant d'être engagé dans la seconde étape sans autre forme de purification.

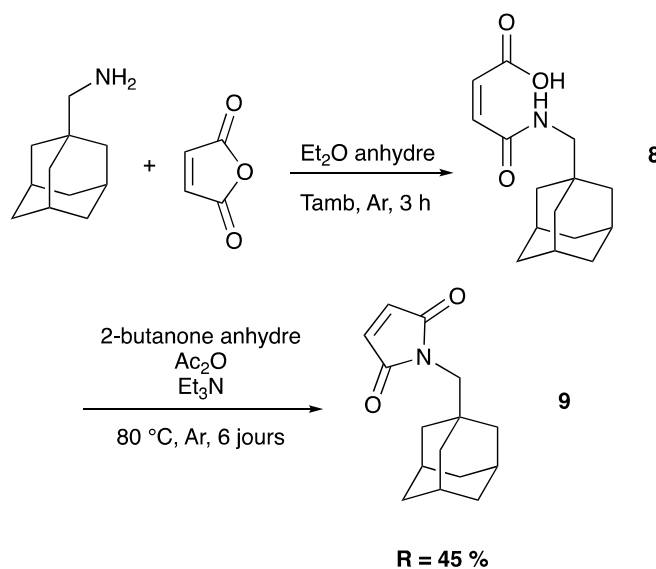


Schéma 7 : Synthèse en deux étapes du N-adamantylméthyl maléimide.

Lors de la seconde étape, l'acide *N*-adamantaneméthylmaléamique **8** a été cyclisé en présence d'anhydride acétique et de triéthylamine dans de la 2-butanone anhydre et sous atmosphère d'argon pour finalement former le *N*-adamantylméthyl maléimide **9**. Le produit a

été purifié par différentes extractions (NH₄Cl aqueux, saumure et eau ultrapure) puis par chromatographie sur colonne de gel de silice et a été obtenu avec un rendement de 45 %, identique à celui obtenu dans le travail de référence.

La réussite de la synthèse a été attestée par ¹H RMN, le spectre présentant les signaux spécifiques de la partie adamantane (les différents signaux entre 1,4 et 3,2 ppm) et de la fonction maléimide (signal à 6,9 ppm caractéristique des protons éthyléniques de la fonction maléimide).

IV. 3. Synthèse d'un dérivé de cholestérol présentant une fonction maléimide

Pour coupler le maléimide au cholestérol, une molécule de *N*-(2-aminoéthyl)maléimide sous forme de sel de TFA, contenant une amine primaire réactive, a été synthétisée. La synthèse de cette molécule a été effectuée suivant trois étapes (**Schéma 8**).

IV. 3. 1. Synthèse du *N*-(2-aminoéthyl)maléimide·TFA

Tout d'abord, le *tert*-butyl (2-aminoéthyl)carbamate **10** a été synthétisé en s'appuyant sur le travail de Ton *et al.*²⁵¹ par une méthode de protection classique d'une des deux amines de l'éthylènediamine par réaction avec du Boc₂O dans du chloroforme. Cette réaction a ainsi permis de protéger une des deux amines de la molécule afin de conserver cette fonction dans la molécule finale après régénération par déprotection. Le produit, soluble dans le chloroforme, a été purifié par des lavages à la saumure puis à l'eau avant d'être isolé sous la forme d'une huile jaune par évaporation du solvant sous pression réduite. Ce premier intermédiaire a été obtenu avec un très bon rendement (94 %) comparable à celui obtenu dans la littérature de référence (rendement quantitatif). L'obtention de cet intermédiaire a été vérifiée par le spectre ¹H RMN.

Au cours de la seconde étape, l'amine primaire de l'intermédiaire **10** a réagi avec l'anhydride maléique afin de former le *tert*-butyl (2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)éthyl)carbamate **11**. La réaction à reflux dans de l'acétone a été catalysée par la triéthylamine en présence d'anhydride acétique en tant qu'agent déshydratant. Le produit **11**, qui a été purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice, a été obtenu avec un rendement de 63 %. La ¹H RMN a à nouveau permis de vérifier l'obtention du produit avec la

disparition du signal des protons de l'amine (1,3 ppm) et l'apparition du signal caractéristique des protons éthyléniques du maléimide (6,7 ppm).

Enfin, lors de la troisième étape, l'intermédiaire **11** a été déprotégé par l'acide trifluoroacétique pour donner le *N*-(2-aminoéthyl)maléimide-TFA **12**. Après réaction dans le dichlorométhane, le produit, qui a été récupéré sous forme de résidu liquide après évaporation du solvant sous pression réduite, a été dilué dans du méthanol puis purifié par précipitation et lavage dans l'anhydride acétique. Le composé **12** a alors été obtenu avec un très bon rendement (92 %) et la disparition du signal propre au Boc (1,4 ppm) sur le spectre ^1H RMN a permis de confirmer la déprotection.

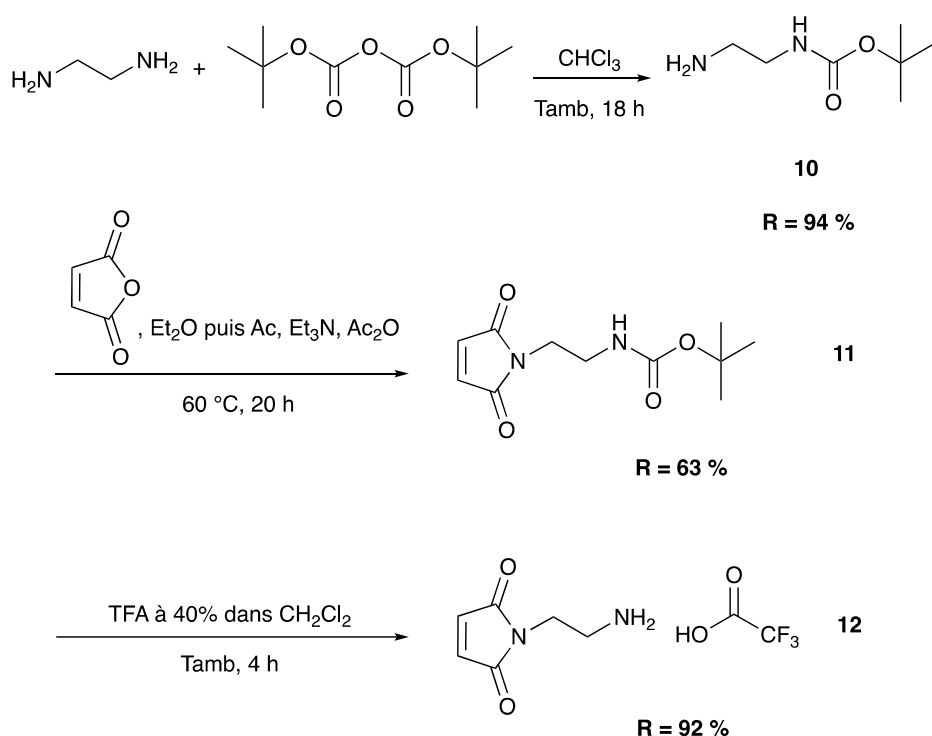


Schéma 8 : Synthèse en trois étapes du *N*-(2-aminoéthyl)maléimide-TFA.

IV. 3. 2. Synthèse de l'hémisuccinate de cholestérol

Afin de rendre le cholestérol réactif vis-à-vis de la fonction amine du *N*-(2-aminoéthyl)maléimide-TFA, son hémisuccinate a été synthétisé afin d'y introduire une fonction acide carboxylique. Cette synthèse a été effectuée en se basant sur les travaux de Yang *et al.*²⁵²

La synthèse en une étape a consisté en une réaction d'estérification entre le groupement hydroxyle du cholestérol et l'acide succinique activé sous forme d'anhydride,

catalysée par la DMAP dans du dichlorométhane (**Schéma 9**). Le léger excès d'anhydride succinique utilisé a permis d'assurer la réaction de l'ensemble des groupements hydroxyles terminaux du cholestérol. La consommation du cholestérol et la formation de l'hémisuccinate à 60 °C ont été suivies par CCM. L'anhydride succinique n'étant pas soluble à froid dans le dichlorométhane, une simple filtration après refroidissement de la solution en fin de réaction a permis l'élimination de l'excès de cet anhydride. Le produit a ensuite été purifié par des lavages à l'eau et l'hémisuccinate **13**, soluble dans le dichlorométhane, a été collecté par évaporation du solvant sous pression réduite. Le très bon rendement de la réaction, de 87 %, était cohérent par rapport à la littérature de référence (97 %).

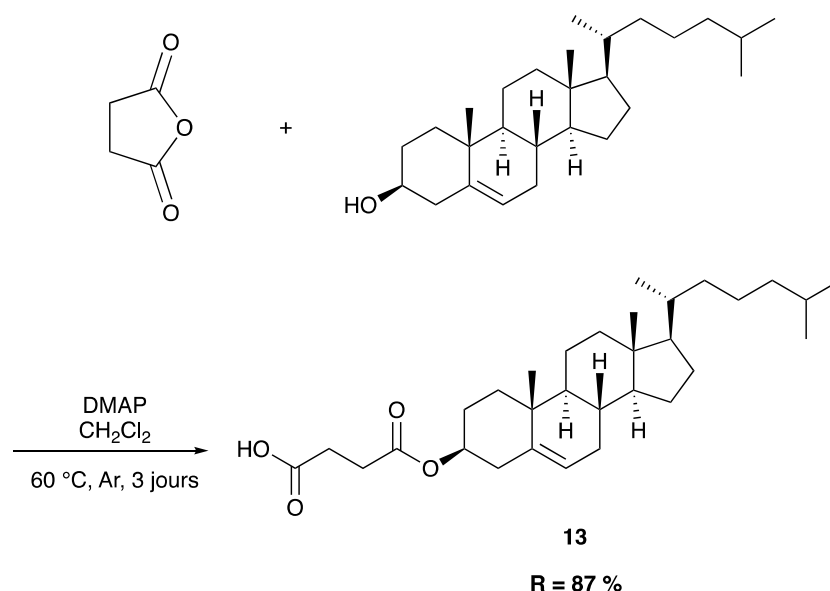


Schéma 9 : Synthèse de l'hémisuccinate de cholestérol.

Le spectre ^1H RMN a permis de vérifier l'obtention de la molécule. On y retrouvait en effet les signaux caractéristiques du cholestérol (entre 0,5 et 2,5 ppm et à 5,4 ppm) ainsi que de nouveaux signaux validant la présence de la chaîne ajoutée au cholestérol (signaux autour de 2,65 ppm correspondant aux protons liés aux deux carbones de la chaîne située entre l'acide carboxylique et l'ester).

IV. 3. 3. Synthèse du (3S, 8S, 9S, 10R, 13R, 14S, 17R)-10,13-diméthyl-17-((R)-6-méthylheptan-2-yl)-2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17-tétradécahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-yl 4-((2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)éthyl)amino)-4-oxobutanoate

La synthèse du dérivé de cholestérol **14** par couplage entre le *N*-(2-aminoéthyl)maléimide·TFA et l'hémisuccinate de cholestérol **13** a été inspirée par le travail de Foley *et al.*²⁵³ qui ont utilisé le même dérivé de maléimide mais pour un couplage avec une molécule de rhodamine.

Cette synthèse a consisté en la formation d'un lien amide entre l'amine primaire du *N*-(2-aminoéthyl)maléimide·TFA **12** et l'acide carboxylique terminal de l'hémisuccinate de cholestérol **13** (**Schéma 10**). Ce couplage, effectué dans le DMF et à température ambiante, a été catalysé par l'utilisation du couple HBTU (un agent de couplage)/DIEA, permettant l'activation de l'acide carboxylique. La réaction a été suivie par CCM permettant de constater la disparition de l'hémisuccinate de cholestérol. Après dilution dans l'acétate d'éthyle, le produit **14** a été purifié, d'abord par des lavages à la saumure et à l'eau puis par chromatographie sur colonne de gel de silice. Il a alors été obtenu avec un bon rendement (79 %) et la ¹H RMN a permis de s'assurer de la réussite du couplage en constatant la présence simultanée des signaux propres à l'hémisuccinate de cholestérol (de 0,5 à 2,7 ppm, à 4,6 ppm et à 5,4 ppm) et à la partie maléimide (signaux correspondant aux protons de la chaîne carbonée autour de 3,5 ppm et protons éthyléniques de la fonction maléimide à 6,7 ppm).

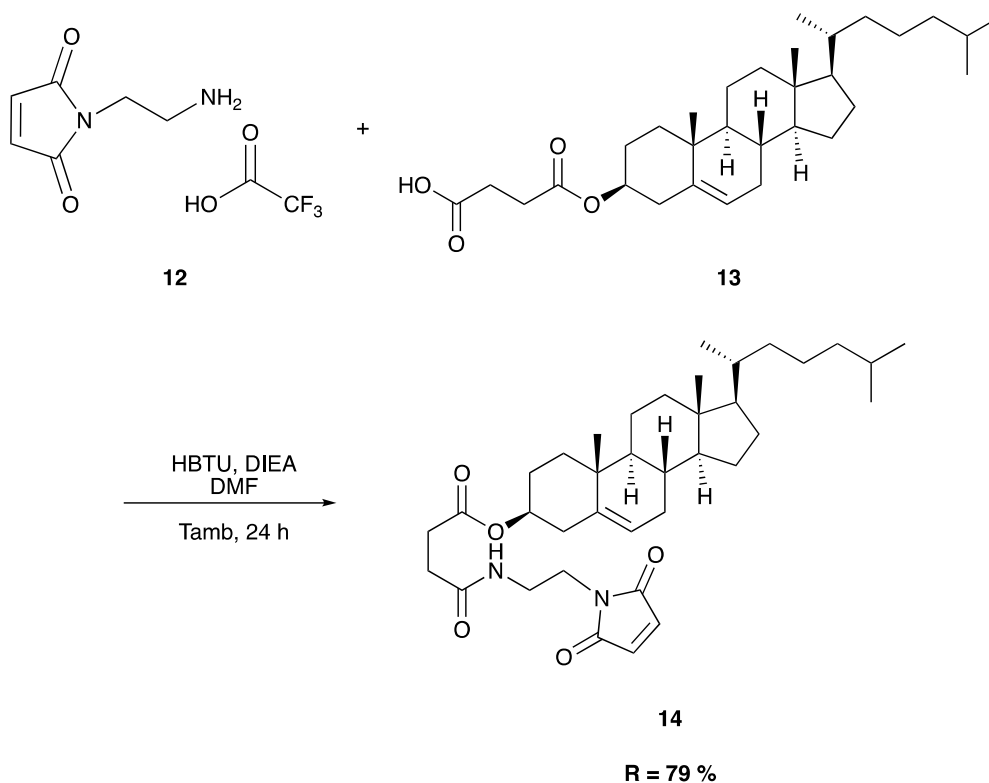
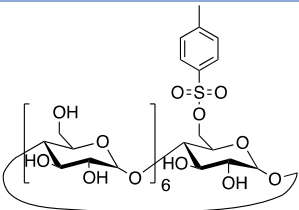
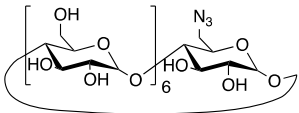
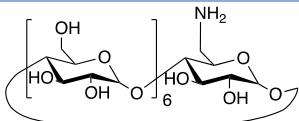
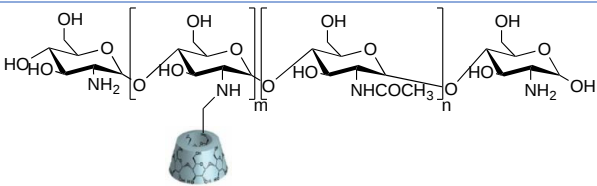
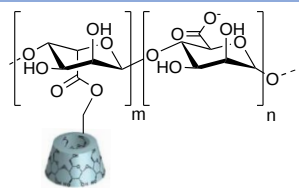
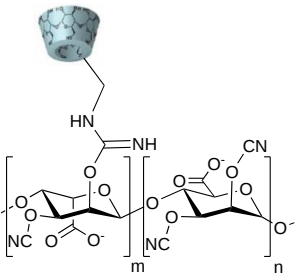
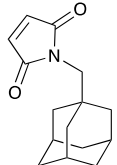
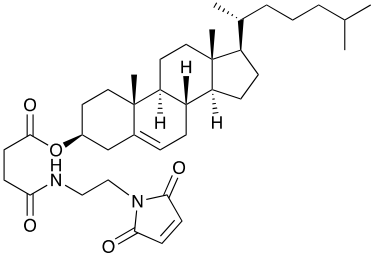


Schéma 10 : Synthèse du (3*S*, 8*S*, 9*S*, 10*R*, 13*R*, 14*S*, 17*R*)-10,13-diméthyl-17-((*R*)-6-méthylheptan-2-yl)-2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17-tétradécahydro-1*H*-cyclopenta[*a*]phenanthren-3-yl 4-((2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)éthyl)amino)-4-oxobutanoate.

Ainsi, deux molécules composées d'une partie formant facilement un complexe d'inclusion avec la β -cyclodextrine, à savoir l'adamantane ou le cholestérol, et une partie maléimide réactive vis-à-vis de nombreuses molécules contenant notamment une fonction thiol ont été synthétisées pour être ensuite utilisées dans une stratégie d'inclusion de tout type de molécules extérieures, et en particulier de molécules hydrophiles, dans les CoPEC (stratégie détaillée dans le chapitre 4).

Le **Tableau 9** récapitule les principales molécules synthétisées au cours de ces travaux de thèse.

Tableau 9 : Structures des principales molécules synthétisées.

Numéro	Structure
1	
2	
3	
4	
5	
7	
9	
14	

V. Conclusion partielle

La β -cyclodextrine a été modifiée afin d'y introduire différentes fonctions réactives. Ces dérivés de cyclodextrines ont alors été greffés sur les deux polymères d'intérêt dans ces travaux, le chitosan et l'alginate de sodium, en impliquant les principaux groupements fonctionnels de ces derniers. Les degrés de substitution des polymères fonctionnalisés obtenus ont été jugés comme adéquats pour une utilisation ultérieure lors de la formulation des matériaux et lors de leur utilisation pour capter et relarguer des molécules hydrophobes. Afin de permettre également aux matériaux finaux de contenir et relarguer des molécules hydrophiles, deux molécules constituées d'une fonction maléimide et d'une partie soit adamantane, soit cholestérol, ont été synthétisées. De cette façon, des molécules contenant par exemple un groupement thiol peuvent être attachées à ces molécules par une réaction de type addition de Michael, tandis que l'autre partie des molécules, c'est-à-dire l'adamantane ou le cholestérol, peut former un complexe d'inclusion avec les β -cyclodextrines greffées aux polymères composants les matériaux formulés ultérieurement.

Les différents polymères fonctionnalisés ont alors été utilisés dans la formulation de diverses formes de CoPEC.

VI. Partie expérimentale

VI. 1. Généralités

Les différents solvants étaient de chez Acros Organics, Carlo Erba Reagents, Merck, Sds, Sigma-Aldrich.

Le 1-adamantaneméthylamine, l'anhydride maléique, l'azoture de sodium, le Boc_2O , le cholestérol et la triphénylphosphine provenaient de chez Sigma-Aldrich, la β -cyclodextrine, le chlorure de tosyle, la DIEA et le DMAP de chez Alfa Aesar, le bromure de cyanogène et l'éthylènediamine de chez Acros Organics, l'anhydride succinique de chez Fluka, le HBTU de chez Novabiochem.

Le chitosan (poids moléculaire moyen de 250 000 g/mol, viscosité de 30-100 cP, degré de désacétylation > 90 %) provenait de chez Glentham life sciences et l'alginate de sodium (poids moléculaire moyen de 155 000 g/mol, viscosité de 15-20 cP, taux M/G de 1,56) de chez Sigma-Aldrich.

La résine échangeuse de protons utilisée lors de la synthèse de la β -cyclodextrine tosylée était de l'Amberlite® IR 120, H de chez Acros Organics.

L'eau ultrapure (18 m Ω) utilisée lors des expériences était obtenue à partir d'un appareil Elga de chez Veolia.

Les membranes de dialyse, présentant des seuils de rétention des molécules de 3 500 et 12-14 000 Da, étaient du type Spectra/Por® de chez Spectrum Laboratories.

Les CCM ont été réalisées sur des plaques de gel de silice 60 F₂₅₄ de chez Merck.

Les évaporations sous pression réduite étaient effectuées sur un évaporateur rotatif de chez Heidolph relié à un groupe de pompage PC 101 NT de chez Vacuubrand (Wertheim, Allemagne).

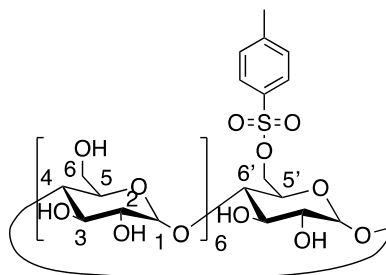
Les lyophilisations étaient faites sur un lyophilisateur Alpha 1-2 LD de chez Bioblock Scientific.

Les spectres RMN ont été acquis sur un spectromètre Bruker Advance DPX 400. Les solvants deutérés utilisés étaient de chez Sigma-Aldrich excepté l'acétone-d₆ qui provenait de chez Euriso-top.

Les analyses infrarouges ont été effectuées sur un spectromètre FT-IR Spectrum 2000 de chez Perkin Elmer (Waltham, MA).

VI. 2. Synthèse des dérivés de β -cyclodextrine

VI. 2. 1. Synthèse de la β -cyclodextrine monotosylée **1**



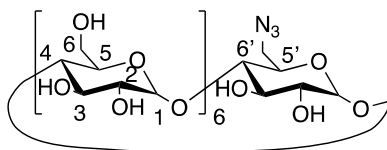
$$\text{PM} = 1289,2 \text{ g/mol}$$

29,8 g (26,3 mmol, 1 éq) de β -cyclodextrine sont suspendus dans 270 mL d'eau ultrapure. La cyclodextrine est dissoute par ajout de 105 mL de NaOH 2,5 M aqueuse et le mélange est agité pendant 5 minutes à température ambiante. 7,6 g (39,9 mmol, 1,5 éq) de chlorure de tosyloxy sont introduits en plusieurs portions dans la solution et le mélange est agité pendant 1 h à température ambiante. Le précipité formé est éliminé par filtration sur papier filtre qualitatif et le résidu est lavé à l'eau ultrapure (2 x 30 mL). Le filtrat est acidifié par ajout de résine échangeuse de protons ($\text{pH}_{\text{final}} = 2-3$) afin de précipiter **1**. Les billes de résine sont séparées du mélange par tamisage (pores du tamis de 300 μm). 7,7 g (6,0 mmol) de **1** sont collectés par filtration sur fritté, lavés à l'eau ultrapure (3 x 90 mL) et lyophilisés.

Rendement : 23 %.

^1H RMN, $\text{DMSO}-d_6$: δ (ppm) = 7,75 (d, 2H, Ph), 7,43 (d, 2H, Ph), 5,84-5,62 (m, 14H, OH_2 et OH_3), 4,89-4,74 (m, 7H, H_1), 4,56-4,38 (m, 6H, OH_6), 4,38-4,28 (m, 2H, $\text{H}_{6'}$), 4,24-4,10 (m, 1H, $\text{H}_{5'}$), 3,74-3,51 (m, 25H, H_3 , H_5 et H_6), 3,41-3,17 (m, H_2 et H_4), 2,43 (s, 3H, Ph-CH_3).

VI. 2. 2. Synthèse de la β -cyclodextrine monoazidée 2



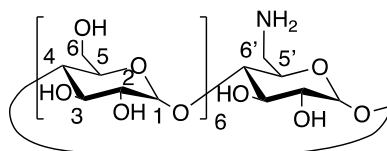
PM = 1160,0 g/mol

5,0 g (3,9 mmol, 1 éq) de **1** sont dissous dans 70 mL de DMF et 3,3 g (50,8 mmol, 13 éq) de NaN₃ sont ajoutés au mélange. La solution est chauffée à 80 °C pendant 24 h puis 6,7 g (5,8 mmol) de **2** sont obtenus sous la forme d'un solide blanchâtre par précipitation à l'acétone.

Rendement : Quantitatif.

¹H RMN, DMSO-*d*₆ : δ (ppm) = 5,78-5,63 (m, 14H, OH₂ et OH₃), 4,86-4,79 (m, 7H, H₁), 4,52-4,45 (m, 6H, OH₆), 3,67-3,53 (m, 25H, H₃, H₅ et H₆), 3,40-3,26 (m, H₂ et H₄).

VI. 2. 3. Synthèse de la β -cyclodextrine monoaminée 3



PM = 1134,0 g/mol

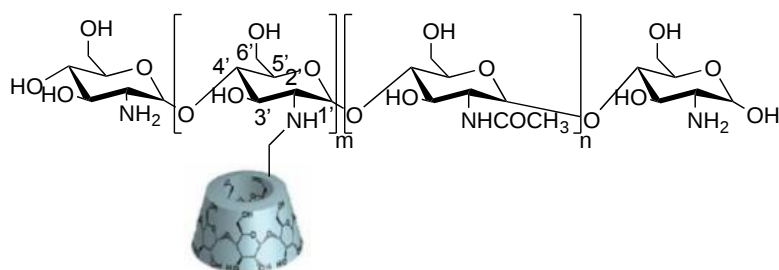
3,0 g (2,6 mmol, 1 éq) de **2** et 2,7 g (10,3 mmol, 4 éq) de triphénylphosphine sont dissous dans 37,5 mL de DMF et le mélange est agité pendant 1 h à température ambiante et sous argon. Le mélange est ensuite placé dans un bain de glace, 15 mL de NH₄OH aqueux 30 % m/m sont introduits puis le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 4 jours. Après évaporation du DMF sous pression réduite, l'oxyde de triphénylphosphine est précipité par addition d'eau puis est éliminé par filtration. Le solvant du filtrat est alors évaporé pour donner 2,9 g (2,6 mmol) de **3** sous la forme d'un solide blanchâtre qui est lavé à l'acétone.

Rendement : Quantitatif.

^1H RMN, DMSO- d_6 : δ (ppm) = 5,78-5,67 (m, 14H, OH₂ et OH₃), 4,85-4,80 (m, 7H, H₁), 4,50-4,44 (m, 6H, OH₆), 3,66-3,53 (m, 27H, H₃, H₅, H₆ et -NH₂), 3,39-3,26 (m, H₂ et H₄ superposés avec H₂O).

VI. 3. Fonctionnalisation de l'alginate et du chitosan par la β -cyclodextrine

VI. 3. 1. Synthèse du β -cyclodextrine-chitosan (β CD-chitosan) **4**



PM (unité de répétition contenant une β CD, en faisant l'approximation que le chitosan est totalement désacétylé) = 1764,6 g/mol

2,0 g (12,4 mmol d'unités de répétition, 1 éq) de chitosan sont tout d'abord dissous dans 160 mL de CH₃COOH 1% v/v aqueux. Une solution de 7,0 g (5,4 mmol, 0,4 éq) de **1** dans 80 mL DMF est introduite dans la solution de chitosan et le mélange est chauffé à reflux à 100 °C pendant 16 h. Le mélange est concentré sous pression réduite puis est dialysé pendant 2 jours à travers une membrane avec un seuil de rétention des molécules de 3 500 Da, contre une solution aqueuse de NaCl 0,1 M puis contre de l'eau ultrapure. La solution est finalement lyophilisée pour donner 2,7 g de **4** sous la forme d'un solide blanc.

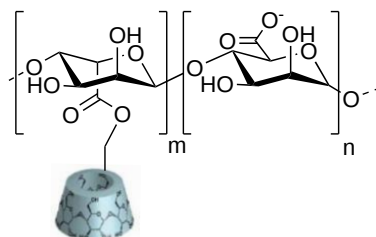
DS : 25 % (déterminé par ^1H RMN).

^1H RMN, D₂O : δ (ppm) = 7,69 (d, Ph de **1**), 7,37 (d, Ph de **1**), 5,07 (s, H₁ de **1**), 3,97-3,48 (m, H₂, H₃, H₄, H₅, H₆ de **1** et H_{1'}, H_{3'}, H_{4'}, H_{5'} et H_{6'}), 2,97 (s, H_{2'}), 2,41 (s, Ph-CH₃ de **1**).

VI. 3. 2. Synthèse du β -cyclodextrine-alginate (β CD-alginate)

Méthode 1

Synthèse du β -cyclodextrine-alginate 5

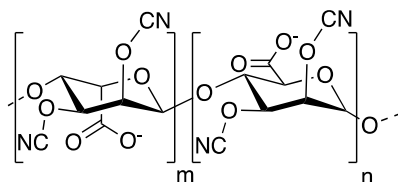


PM (unité de répétition contenant une β CD) = 2719,1 g/mol

1,0 g (5,1 mmol d'unités de répétition, 1 éq) d'alginate de sodium est dissous dans 50 mL de DMF contenant 1,1 mL (7,2 mmol, 1,4 éq) d'APTS. La solution est agitée pendant 30 minutes à 50 °C puis 12,7 g (11,2 mmol, 2,2 éq) de β -cyclodextrine et 1,3 g (6,8 mmol, 1,3 éq) d'EDC-HCl sont ajoutés. La solution est agitée à 50 °C pendant 24 h puis 100 mL d'éthanol sont introduits, formant un précipité blanc qui est filtré et lavé à l'éthanol. Ce précipité est ensuite dissous dans de l'eau, la solution obtenue est neutralisée (pH 7) par ajout de Na_2CO_3 15% aqueux puis est dialysée contre de l'eau ultrapure pendant 4 jours. **5** est alors isolé sous forme solide par lyophilisation.

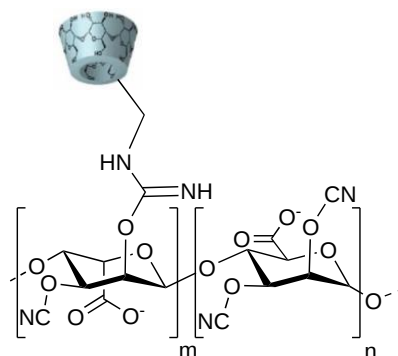
DS : 11 % (déterminé par ^1H RMN).

^1H RMN, D_2O : δ (ppm) = 5,08 (s, H_1 de la β CD), 4,05-3,53 (m, H_2 , H_3 , H_4 , H_5 , H_6 de β CD et hydrogènes tertiaires de l'alginate).

Méthode 2*Étape 1 : Synthèse du cyano-alginate **6***

M (unité de répétition) = 225,1 g/mol

2,0 g (10,1 mmol d'unités de répétition, 1 éq) d'alginate de sodium sont dissous dans 500 mL d'eau distillée et 1,2 g (11,3 mmol, 1,1 éq) de bromure de cyanogène est ajouté dans le mélange. Le pH du milieu réactionnel est fixé entre 10 et 11 par ajout de NaOH 1 M aqueuse et la solution est agitée 1 h à température ambiante. La solution est ensuite concentrée sous pression réduite avant d'être dialysée pendant 3 jours dans une membrane avec un seuil de rétention des molécules de 12-14 000 Da contre de l'eau ultrapure. **6** est alors obtenu par lyophilisation sous la forme d'une poudre cotonneuse non isolée et utilisée sans autre forme de purification.

*Étape 2 : Synthèse du β -cyclodextrine-alginate (β CD-alginate) **7***

PM (unité de répétition contenant une β CD) = 3635,5 g/mol

0,2 g (1,8 mmol de fonctions -OCN, 1 éq) de **6** est dissous dans 150 mL d'eau distillée et 1,5 g (1,3 mmol, 0,7 éq) de **3** est ajouté dans la solution. Le milieu réactionnel est agité

pendant 3 jours à température ambiante puis est concentré sous pression réduite. La solution est ensuite dialysée pendant 3 jours dans une membrane avec un seuil de rétention des molécules de 12-14 000 Da contre de l'eau ultrapure. **7** est alors obtenu sous la forme d'une poudre cotonneuse beige après lyophilisation.

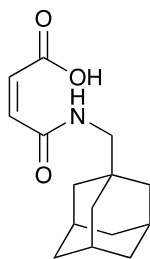
DS : 9 % (déterminé par ^1H RMN).

^1H RMN, D_2O : δ (ppm) = 5,07 (s, H_1 de **3**), 4,02-3,52 (m, H_2 , H_3 , H_4 , H_5 , H_6 de **3** et hydrogènes tertiaires de l'alginate).

VI. 4. Synthèse des dérivés d'adamantane et de cholestérol

VI. 4. 1. Synthèse du dérivé d'adamantane

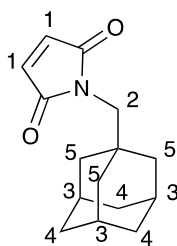
*Étape 1 : Synthèse de l'acide N-adamantaneméthylmaléamique **8***



PM = 263,3 g/mol

834 mg (8,5 mmol, 1 éq) d'anhydride maléique sont dissous dans 40 mL d' Et_2O anhydre sous argon. 1,5 mL (8,5 mmol, 1 éq) de 1-adamantaneméthylamine est alors ajouté goutte à goutte dans la solution puis le mélange est agité pendant 3 h sous argon et à température ambiante. Le précipité blanc formé est alors récupéré par filtration, lavé à l' Et_2O et séché sous pression réduite pour donner 2,4 g (9,1 mmol) de **8** qui sont engagés dans l'étape 2 sans autre forme de purification.

Rendement : Quantitatif.

Étape 2 : Synthèse du N-adamantylméthyl maléimide 9

PM = 245,3 g/mol

2,4 g (9,1 mmol, 1 éq) de **8** sont placés dans un ballon surmonté d'un réfrigérant et sous argon. 100 mL de 2-butanone anhydre sont alors introduits et une suspension est obtenue. 1262 μ L (13,4 mmol, 1,5 éq) d'anhydride acétique puis 2489 μ L (17,8 mmol, 2 éq) d' Et_3N sont ajoutés à la suspension puis la solution résultante est chauffée à reflux (80 °C) pendant 135 h. Après refroidissement à température ambiante, le milieu réactionnel est dilué avec 200 mL de CH_2Cl_2 et une extraction est effectuée avec 60 mL de NH_4Cl aqueux. La phase aqueuse est lavée avec 3 x 30 mL de CH_2Cl_2 . Les phases organiques sont rassemblées puis lavées avec 100 mL de saumure puis 100 mL d'eau ultrapure. Le solvant est évaporé sous pression réduite pour donner un solide marron-noir qui est ensuite dissous dans de l' Et_2O et purifié par chromatographie sur colonne (phase stationnaire : silice, éluant = Et_2O /Heptane, 50/50 v/v) pour former 1,0 g (4,1 mmol) de **9**.

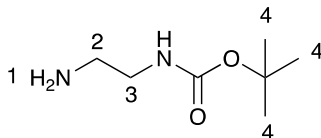
Rendement : 45 %.

^1H RMN, Acétone- d_6 : δ (ppm) = 6,87 (s, 2H, H_1), 3,13 (s, 2H, H_2), 1,93 (s large, 3H, H_3), 1,64 (m, 6H, H_4), 1,49 (d, 6H, $J = 2,5$ Hz, H_5).

^{13}C RMN, Acétone- d_6 : δ (ppm) = 172,4; 135,2; 50,1; 41,5; 37,5; 35,8.

VI. 4. 2. Synthèse du dérivé de cholestérol

Étape 1 : Synthèse du *tert*-butyl (2-aminoéthyl)carbamate **10**



PM = 160,2 g/mol

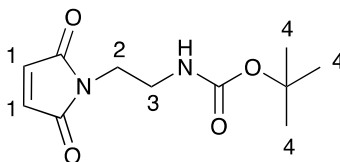
20 mL d'éthylènediamine (299 mmol, 10 éq) dilués dans 300 mL de CHCl_3 sont placés dans un bain de glace. Une solution de 6,5 g (29,8 mmol, 1 éq) de Boc_2O dans 150 mL de CHCl_3 est alors ajoutée goutte à goutte sur une période de 2 h à la solution d'éthylènediamine et le mélange réactionnel est agité pendant 18 h à température ambiante. La solution est lavée avec 4 x 100 mL de saumure puis 100 mL d'eau ultrapure et la phase organique est séchée sur MgSO_4 . 4,5 g (28,1 mmol) de **10**, sous la forme d'une huile jaune, sont obtenus après évaporation sous pression réduite.

Rendement : 94 %.

^1H RMN, CDCl_3 : δ (ppm) = 4,94 (s large, 1H), 3,15 (q, 2H, H_3 , $J = 5,8$ Hz), 2,77 (t, 2H, H_2 , $J = 6,0$ Hz), 1,42 (s, 9H, H_4), 1,27 (s, 2H, H_1).

^{13}C RMN, CDCl_3 : δ (ppm) = 156,4; 79,3; 43,4; 41,9; 31,3; 28,5.

Étape 2 : Synthèse du *tert*-butyl (2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)éthyl)carbamate **11**



PM = 240,2 g/mol

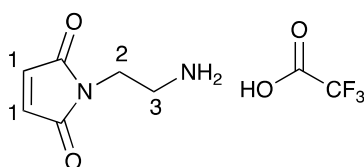
4,0 g (25,0 mmol, 1 éq) de **10** dilués dans 50 mL d' Et_2O sont placés dans un bain de glace pendant 30 minutes. Une solution de 2,5 g (25,5 mmol, 1 éq) d'anhydride maléique dans 50 mL d' Et_2O est alors ajoutée goutte à goutte à la solution de **10** sur une période de 20 minutes. Le mélange est agité pendant 4 h à température ambiante, donnant une suspension

blanche. Le solvant est évaporé sous pression réduite jusqu'à obtenir un solide jaunâtre qui est dissous dans 100 mL d'acétone. 14 mL (100 mmol, 4 éq) d'Et₃N puis 3,5 mL (37,0 mmol, 1,5 éq) d'anhydride acétique sont alors introduits dans la solution obtenue. Le milieu réactionnel est chauffé à reflux (60 °C) pendant 20 h puis le solvant est évaporé sous pression réduite pour donner un solide noir-marron. 3,8 g (15,8 mmol) de **11** sont isolés par chromatographie sur colonne (phase stationnaire : silice, éluant : cyclohexane/acétate d'éthyle, 50/50 v/v).

Rendement : 63 %.

¹H RMN, CDCl₃ : δ (ppm) = 6,71 (s, 2H, H₁), 4,74 (s large, 1H), 3,65 (t, 2H, H₂, *J* = 5,5 Hz), 3,33 (q, 2H, H₃, *J* = 5,4 Hz), 1,40 (s, 9H, H₄).

Étape 3 : Synthèse du *N*-(2-aminoéthyl)maléimide-TFA **12**



PM = 254,2 g/mol

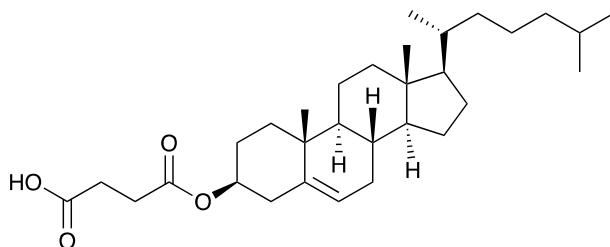
3,4 g (14,2 mmol) de **11** sont dissous dans 160 mL de TFA à 40 % dans du CH₂Cl₂ et la solution est agitée pendant 4 h à température ambiante. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le liquide résiduel est dilué avec 5 mL de MeOH. **12** est précipité par ajout d'anhydride acétique, filtré puis lavé à l'anhydride acétique pour donner 3,3 g (13,0 mmol) de solide jaunâtre.

Rendement : 92 %.

¹H RMN, D₂O : δ (ppm) = 6,93 (s, 2H, H₁), 3,87 (t, 2H, H₂, *J* = 5,8 Hz), 3,26 (t, 2H, H₃, *J* = 5,9 Hz).

¹³C RMN, D₂O : δ (ppm) = 172,7; 134,8; 38,5; 35,1.

*Étape 4 : Synthèse de l'hémisuccinate de cholestérol **13***



PM = 486,7 g/mol

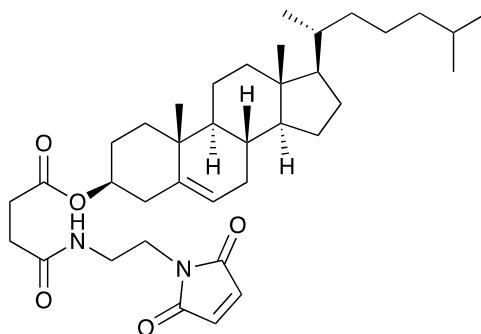
3,0 g (7,8 mmol, 1 éq) de cholestérol, 1,6 g (16,0 mmol, 2 éq) d'anhydride succinique et 0,5 g (4,1 mmol, 0,5 éq) de DMAP sont dissous dans 80 mL de CH₂Cl₂. Le mélange est chauffé à reflux à 60 °C et sous argon pendant 65 h et la réaction est suivie par CCM (éluant = CH₂Cl₂/MeOH, 95/5 v/v, R_f du produit = 0,30). Le milieu réactionnel est ensuite filtré, la phase organique est lavée avec 3 x 150 mL d'eau ultrapure puis séchée sur MgSO₄. 3,3 g (6,8 mmol) de **13** sont alors obtenus par évaporation du solvant sous pression réduite.

Rendement : 87 %.

¹H RMN, CDCl₃ : δ (ppm) = 5,37 (d, 1H, *J* = 3,6 Hz), 4,63 (m, 1H), 2,72-2,55 (m, 4H), 2,37-2,28 (m, 2H), 2,06-1,76 (m, 6H), 1,70-0,77 (m, 42H), 0,67 (s, 3H).

¹³C RMN, CDCl₃ : δ (ppm) = 178,0; 172,0; 140,0; 123,2; 75,0; 57,2; 56,6; 50,5; 42,8; 40,2; 40,0; 38,5; 37,4; 37,1; 36,7; 36,3; 32,4; 32,3; 29,7; 29,4; 28,7; 28,5; 28,2; 24,8; 24,3; 23,3; 23,0; 21,5; 19,8; 19,2; 12,3.

*Étape 5 : Synthèse du (3S, 8S, 9S, 10R, 13R, 14S, 17R)-10,13-diméthyl-17-((R)-6-méthylheptan-2-yl)-2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17-tétradécahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-yl 4-((2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)éthyl)amino)-4-oxobutanoate **14***



PM = 608,9 g/mol

1,9 g (3,9 mmol, 1 éq) de **13** est dissous dans 100 mL de DMF. 1,5 g (4,0 mmol, 1 éq) de HBTU puis 1,4 mL (8,0 mmol, 2 éq) de DIEA sont ajoutés à la solution de **13** puis le milieu réactionnel est agité pendant 30 minutes à température ambiante. 2,0 g (7,9 mmol, 2 éq) de **12** dissous dans 10 mL de DMF sont alors introduits et le mélange est agité à température ambiante pendant 24 h, la réaction étant suivie par CCM (éluant : CH₂Cl₂/MeOH, 92/8 v/v). Le milieu réactionnel est dilué avec 200 mL d'acétate d'éthyle et la phase organique est lavée avec 3 x 200 mL de saumure puis 200 mL d'eau ultrapure avant d'être séchée sur MgSO₄. Le solide obtenu par évaporation sous pression réduite de la phase organique est dissous dans du CH₂Cl₂ puis est purifié par chromatographie sur colonne (phase stationnaire : silice, éluant : CH₂Cl₂ puis CH₂Cl₂/MeOH 98/2 v/v puis MeOH) pour conduire à 1,9 g (3,1 mmol) de **14**.

Rendement : 79 %.

¹H RMN, CDCl₃ : δ (ppm) = 6,71 (s, 2H), 6,01 (s large, 1H), 5,36 (d, 1H, J = 3,8 Hz), 4,59 (m, 1H), 3,69 (t, 2H, J = 5,3 Hz), 3,46 (q, 2H, J = 5,6 Hz), 2,64-2,37 (m, 4H), 2,34-2,27 (m, 2H), 2,06-1,76 (m, 6H), 1,63-0,81 (m, 42H), 0,67 (s, 3H).

¹³C RMN, CDCl₃: δ (ppm) = 172,4; 170,9; 139,6; 134,2; 122,7; 74,4; 56,7; 56,2; 50,0; 42,3; 39,7; 39,5; 38,9; 38,1; 37,5; 37,0; 36,6; 36,2; 35,8; 31,9; 31,0; 29,7; 28,2; 28,0; 27,7; 24,3; 23,8; 22,8; 22,5; 21,0; 19,3; 18,7; 11,8.

Chapitre 3 : Mise en forme et caractérisation des biomatériaux

Lors du développement d'un matériau, et en particulier d'un biomatériau, une des étapes cruciales est la formulation de celui-ci. Au cours de cette étape, les constituants de base, comme par exemple les polyélectrolytes dans le cas des CoPEC, sont mis en forme afin d'obtenir le matériau final à proprement parler. L'idéal est alors de pouvoir formuler de diverses manières un matériau. En effet, le matériau final peut alors prendre des formes variées et ainsi être adapté en fonction de son utilisation.

Au cours de ces travaux, des CoPEC ont été formulés à partir de chitosan et d'alginate de sodium et également à partir des polymères de β CD-chitosan et β CD-alginate synthétisés. Ces CoPEC ont dans un premier temps été formulés par ultracentrifugation, la principale méthode utilisée au laboratoire pour d'obtention de ce type de matériaux. Le CoPEC β CD-chitosan/alginate, alors considéré comme le plus prometteur, a été caractérisé afin d'en déterminer la composition exacte et la microstructure. Une méthode permettant d'induire une porosité contrôlée dans ces matériaux, *via* l'utilisation de particules de carbonate de calcium en tant qu'éléments porogènes, a alors été mise en place. Cette méthode a été ajustée afin d'être adaptée à la formulation de CoPEC sous forme de microparticules poreuses. Enfin, une autre voie de formulation de CoPEC, selon laquelle la compaction est effectuée par sédimentation et évaporation, a été adaptée aux polyélectrolytes et la microstructure des matériaux obtenus a été étudiée.

Dans ce chapitre, à la suite d'une introduction sur les associations entre le chitosan et l'alginate dans le domaine biomédical, les formulations et caractérisations des divers matériaux préparés au cours de ces travaux de recherche seront exposées.

I. Les associations entre le chitosan et l'alginate dans le domaine biomédical

Du fait de leurs propriétés très intéressantes pour des applications dans le domaine biomédical et également de leur capacité à former des complexes grâce à des interactions entre leurs groupements ioniques, l'association du chitosan et de l'alginate sous forme de biomatériaux est actuellement très étudiée par la communauté scientifique. De nombreux travaux ont ainsi démontré de potentielles applications de ces associations, tout particulièrement dans les domaines du revêtement, de la culture cellulaire 3D, de la délivrance d'éléments actifs, des pansements et de l'ingénierie tissulaire.

I. 1. Les associations chitosan/alginate en tant que revêtements

Plusieurs travaux ont évalué l'application de l'association chitosan/alginate pour le revêtement de systèmes thérapeutiques, de la macro- à la nano-échelle.

Silva *et al.*²⁵⁴ ont ainsi revêtu par dépôt « layer by layer » (LbL) plusieurs lentilles de contact contenant du diclofénac avec des couches d'alginate et de chitosan et ont démontré que ce revêtement permet de contrôler la libération de la substance active anti-inflammatoire. Kyung *et al.*²⁵⁵ ont démontré que des films à base de chitosan et d'alginate préparés par dépôt LbL et réticulés par l'utilisation de glutaraldéhyde, de chlorure de calcium ou par traitement thermique peuvent être considérés comme des revêtements performants pour biomatériaux. En effet, ces films présentent une activité antithrombotique ainsi qu'une stabilité physique accrue grâce à la réticulation. Shanmugasundaram *et al.*^{256, 257} ont, quant à eux, recouvert des pansements à base de coton par du chitosan et de l'alginate, améliorant ainsi les propriétés de cicatrisation de ces matériaux.

Enfin, Feng *et al.*²⁵⁸ ont recouvert des nanoparticules de silice mésoporeuses par de l'alginate et du chitosan par dépôt LbL avant de charger ces nouveaux systèmes avec de la doxorubicine. Leurs études ont montré que ce revêtement permet d'augmenter la biocompatibilité des nanoparticules et de contrôler le relargage de la substance active, qui peut alors avoir lieu au niveau intracellulaire, de manière pH-dépendante. La doxorubicine véhiculée dans ce système bénéficie alors d'une durée de circulation systémique augmentée et d'une vitesse d'élimination plasmatique réduite.

I. 2. Les associations chitosan/alginate pour la culture cellulaire 3D

Du fait notamment du caractère poreux des matériaux pouvant être obtenus à partir de chitosan et d'alginate, ces systèmes ont été étudiés pour le développement de supports 3D pour la culture cellulaire.

Kievit *et al.*²⁵⁹ démontrèrent en 2014 que des échafaudages poreux à base de chitosan et d'alginate préparés par lyophilisation et réticulés par du chlorure de calcium, utilisés comme support de culture de cellules de glioblastome, permettaient de promouvoir la prolifération et l'enrichissement des cellules souches cancéreuses. Kievit *et al.*²⁶⁰ ont alors utilisé ce type d'échafaudage pour évaluer l'impact du microenvironnement tumoral du glioblastome sur son développement et sa malignité. Florczyk *et al.*²⁶¹ montrèrent que ce même type d'échafaudage pouvait également être adapté à la culture d'autres cellules cancéreuses, comme les cellules cancéreuses de la prostate, du foie et du sein. Wang *et al.*²⁶² ont démontré que ce type d'échafaudage pouvait être utilisé afin d'évaluer le ciblage et la délivrance de matériel génétique induits par des nanoparticules dans le cadre du cancer de la prostate. Chung *et al.*,²⁶³ quant à eux, ont formulé des éponges poreuses à base de chitosan galactosylé et d'alginate par lyophilisation et ont montré que ces dernières permettaient l'attachement d'hépatocytes.

I. 3. Les associations chitosan/alginate pour la délivrance d'éléments actifs

De très nombreuses applications de l'association chitosan/alginate se trouvent dans le domaine de la délivrance d'éléments actifs. Les associations sont formulées de diverses manières comme par exemple sous forme de nano- ou microparticules ou encore de billes. L'association chitosan/alginate peut également être utilisée en tant qu'excipient dans la formulation de granules et comprimés. Ces systèmes sont alors adaptés à la délivrance de nombreux types de substances actives (**Tableau 10**).

Tableau 10 : Exemples de systèmes de délivrance d'éléments actifs à base de chitosan et d'alginate.

Forme de l'association chitosan/alginate	Exemples de substances actives véhiculées
Nanoparticules (quelques dizaines à quelques centaines de nanomètres)	Enoxaparine (anticoagulant et antithrombotique), ²⁶⁴ nifédipine (antagoniste calcique), ²⁶⁵ 5-fluorouracile (antinéoplasique) ²⁶⁶ Antigènes rougeoleux (pour vaccination) ²⁶⁷ BSA ²⁶⁸ Vitamine B ₂ ²⁶⁹
Microparticules (quelques micromètres à quelques centaines de micromètres)	Céfixime (antibiotique), ²⁷⁰ diclofénac (AINS), ²⁷¹ rifampicine, isoniazide et pyrazinamide (antituberculeux), ²⁷² diéthylcarbamazine et doxycycline (antifilariens), ²⁷³ prednisolone (corticoïde) et inuline (prébiotique) ²⁷⁴ Huile essentielle de menthe (antimicrobien) ²⁷⁵ BSA ^{276, 277} Lactoferrine (glycoprotéine se liant au fer) ²⁷⁸
Billes (quelques millimètres)	Albendazole (antiparasitaire), ²⁷⁹ carbamazépine (antiépileptique et régulateur de l'humeur), ²⁸⁰ prednisolone et inuline ²⁷⁴
Granules	Maléate de chlorphénamine (antihistaminique) ²⁸¹
Comprimés	Théophylline (antiasthmatic), paracétamol (antalgique), chlorhydrate de metformine (antidiabétique) et chlorhydrate de trimétazidine (antiangoreux) ²⁸²

I. 4. Les associations chitosan/alginate pour le développement de pansements

Plusieurs travaux sur les associations chitosan/alginate, formulées de diverses façons, ont porté sur l'étude de leurs capacités à être utilisées en tant que pansements.

Kaygusuz *et al.*²⁸³ ont formulé des films contenant du chitosan, de l'alginate et des ions cérium, obtenant alors des matériaux dotés de propriétés physiques, mécaniques et antibactériennes compatibles avec leur utilisation en tant que pansements.

Wang *et al.*²⁸⁴ ont développé des membranes de complexes de polyélectrolytes chitosan/alginate formulées par sédimentation et évaporation en présence de chlorure de calcium. Ces membranes étaient alors non-cytotoxiques, aptes à la prolifération cellulaire et permettaient la cicatrisation *in vivo* de plaies provoquées par incision chez le rat.

Des éponges à base de chitosan et d'alginate en tant que pansements ont également été formulées et étudiées. Hu *et al.*²⁸⁵ ont formulé une éponge à partir de carboxyméthylchitosan et d'alginate par lyophilisation, en présence de chlorure de calcium en tant qu'agent réticulant. Le matériau poreux obtenu présentait alors une forte capacité d'absorption d'eau ainsi qu'un caractère procoagulant significatif, deux propriétés très favorables à une application sur les plaies. Öztürk *et al.*²⁸⁶ ont, quant à eux, formulé des éponges par lyophilisation d'alginate, réticulation par le chlorure de calcium et revêtement par du chitosan avant une nouvelle lyophilisation finale. Ces éponges poreuses ont été chargées avec un antibiotique, la ciprofloxacine. Ces matériaux ont démontré des capacités d'absorption d'eau ainsi que de relargage de la substance active très intéressantes dans l'optique de leur application sur des plaies.

Enfin, Dumont *et al.*²⁸⁷ ont formulé des fibres d'alginate par filage en voie humide qu'ils ont revêtues de chitosan. Ils ont montré que ces fibres présentaient un caractère antibactérien, donc un potentiel d'application dans le développement de pansements.

I. 5. Les associations chitosan/alginate pour l'ingénierie tissulaire

Les associations de chitosan et d'alginate ont également trouvé de très nombreuses applications dans le domaine de l'ingénierie tissulaire. Des travaux décrivant différentes formulations de ces associations pour des applications en ingénierie du cartilage, du foie, de

l'os, du ligament et du tendon ou encore en neuro-ingénierie ont ainsi été menés (**Tableau 11**).

Tableau 11 : Exemples d'application de diverses formulations d'association chitosan/alginate dans l'ingénierie tissulaire.

Type d'ingénierie tissulaire	Forme de l'association chitosan/alginate
Ingénierie du cartilage	Échafaudage poreux préparé par lyophilisation ^{288, 289} Fibres ²⁹⁰
Ingénierie du foie	Échafaudage poreux préparé par lyophilisation ²⁹¹⁻²⁹³
Neuro-ingénierie	Échafaudage poreux préparé par lyophilisation ²⁹⁴ Hydrogel ²⁹⁵
Ingénierie de l'os	Échafaudage poreux préparé par lyophilisation ²⁹⁶⁻²⁹⁸ Hydrogel ²⁹⁹ Gel ³⁰⁰
Ingénierie du ligament et du tendon	Fibres ³⁰¹

Ainsi, les associations entre le chitosan et l'alginate constituent un domaine de recherche en plein essor et de nombreux travaux ont à ce jour déjà été conduits sur ce sujet. Les applications de ces associations sont diverses dans le domaine biomédical, allant de la délivrance d'éléments actifs à l'ingénierie tissulaire. Ces associations prennent alors des formes variées telles que des nano- et microparticules, des billes ou encore des échafaudages 3D.

Comme il l'a été abordé au cours de l'état de l'art en début de ce manuscrit, le potentiel d'application dans le domaine biomédical de ces associations a également motivé l'utilisation du couple chitosan/alginate dans la formulation de CoPEC par Phoeung *et al.*¹⁰⁵ Ces auteurs ont alors déterminé les conditions d'expérience optimales pour l'obtention d'un matériau aux propriétés mécaniques et biologiques compatibles avec leur utilisation en tant que biomatériaux.

Il peut cependant être noté qu'*a priori* aucun matériau à base de chitosan et d'alginate présentant des capacités de vectorisation de substances actives sous la forme d'un élément plastique de type implant n'a pour le moment été développé. Au cours de cette thèse, l'accent

a alors été porté sur le développement de tels matériaux innovants, en s'appuyant sur les travaux préliminaires de Phoeung *et al.*¹⁰⁵

II. Fabrication de CoPEC à base de chitosan et d'alginate par ultracentrifugation

II. 1. Préparation de CoPEC chitosan/alginate, chitosan/ β CD-alginate et β CD-chitosan/ β CD-alginate par ultracentrifugation

Le CoPEC chitosan/alginate a été formulé en se basant sur les précédents travaux du laboratoire et en particulier sur ceux de Phoeung *et al.*¹⁰⁵ Les solutions de chitosan et d'alginate de sodium ont ainsi été préparées à une concentration de 1,25 mg/mL et avec une concentration en NaBr de 1 M, permettant d'obtenir un matériau final stœchiométrique, compact et présentant un comportement plastique. A la suite de l'association des deux solutions de polyélectrolytes *via* une pompe péristaltique, la centrifugation (15 min, 9 400 g, 20 °C) puis l'ultracentrifugation (12 h, 308 000 g, 23 °C) ont permis l'obtention de CoPEC homogènes et ne se désintégrant pas (**Figure 48**).



Figure 48 : CoPEC chitosan/alginate préparés par ultracentrifugation.

Après élimination de l'eau de formulation résiduelle par lyophilisation (**Figure 49 a**), les CoPEC deviennent cassants et peuvent facilement être transformés en microparticules de moins de 300 μ m par broyage au pilon/mortier et tamisage (**Figure 49 b**).

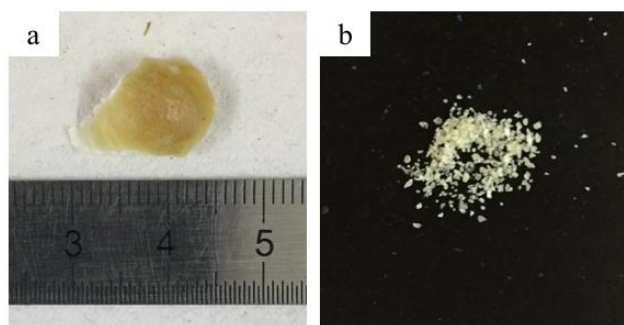


Figure 49 : CoPEC chitosan/alginate a) après lyophilisation et b) après broyage et tamisage à 300 μm .

Ces microparticules sont alors plus adaptées aux différents tests, notamment *in vitro*, qui ont été par la suite menés au cours de cette thèse.

La microstructure des CoPEC obtenus a été observée en Microscopie Électronique à Balayage (MEB), à la fois sur le matériau brut obtenu après ultracentrifugation et lyophilisation (**Figure 50**) et sous forme de microparticules (**Figure 51**). La surface et l'intérieur du matériau brut (**Figure 50**) apparaissent alors homogènes et dépourvus de porosité.

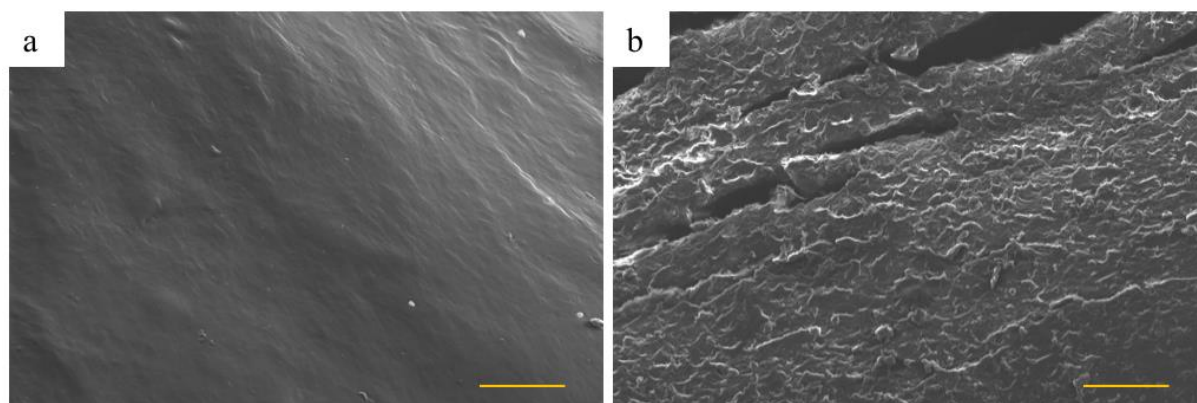


Figure 50 : Images MEB de a) la surface et b) l'intérieur du CoPEC chitosan/alginate. Échelles = 100 μm .

Tout comme dans le cas du matériau brut, les microparticules de CoPEC chitosan/alginate (**Figure 51**) ont un aspect non poreux. Ces dernières apparaissent hétérogènes en termes de taille et de morphologie, ce qui peut s'expliquer par la méthode utilisée (pilon-mortier puis tamisage).

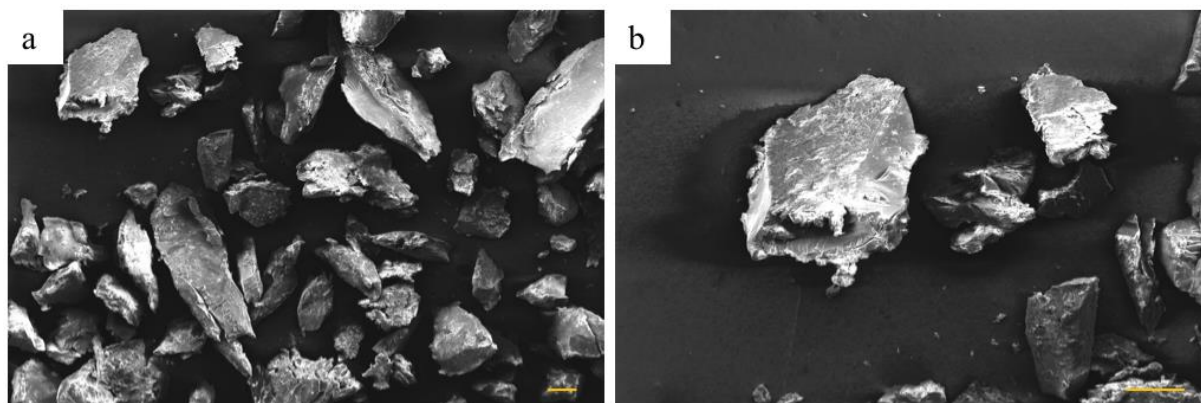


Figure 51 : Images MEB de microparticules de CoPEC chitosan/alginate (grossissement a) $\times 100$ et b) $\times 200$). Échelles = $100\ \mu\text{m}$.

Des procédures similaires ont été employées pour la formulation de CoPEC chitosan/ β CD-alginate et β CD-chitosan/ β CD-alginate, permettant également l'obtention de matériaux compacts. Des premiers tests biologiques ont cependant démontré un caractère pro-inflammatoire de ces deux derniers CoPEC (voir dans le chapitre 4). Cette propriété étant incompatible avec des applications en tant que biomatériaux pour le traitement de l'inflammation, ces matériaux n'ont pas été caractérisés de manière approfondie et leur formulation n'a pas été optimisée, contrairement au CoPEC β CD-chitosan/alginate abordé dans la suite du manuscrit.

II. 2. Préparation de CoPEC β CD-chitosan/alginate par ultracentrifugation

II. 2. 1. Adaptation de la formulation de CoPEC au couple β CD-chitosan/alginate

Pour préparer le CoPEC β CD-chitosan/alginate, la procédure décrite par Phoeung *et al.*¹⁰⁵ a été suivie. Néanmoins, les β CD-chitosan synthétisés présentant des degrés de substitution non négligeables (de 19 et 25 %), la quantité de ce polymère fonctionnalisé a été ajustée afin de compenser le nombre de charges rendues indisponibles du fait de la présence de la cyclodextrine.

Par exemple, dans le cas du β CD-chitosan présentant un DS de 25 %, en faisant l'approximation que le chitosan de départ est totalement désacétylé, l'unité de répétition du polymère devient celle présentée en **Figure 52**.

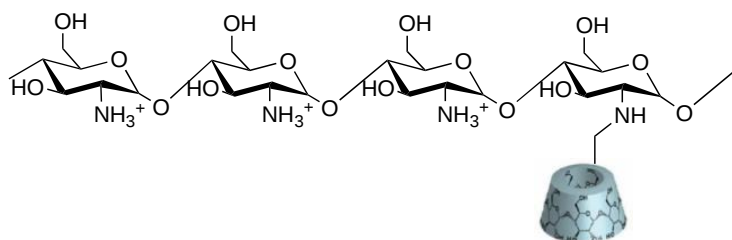


Figure 52 : Représentation de l'unité de répétition du β CD-chitosan présentant un degré de substitution de 25 %.

Ainsi, la masse molaire de l'unité de répétition du polymère greffé est de 1764 g/mol et cette unité contient trois amines primaires protonnables pouvant s'apparier *via* des interactions électrostatiques avec les groupements carboxylate de l'alginate. Donc, si l'on formule un CoPEC avec le β CD-chitosan analogue au CoPEC chitosan/alginate non fonctionnalisé et contenant 300 mg de chitosan, soit 1,86 mmol de fonctions amines, alors on utilisera $(1,86 / 3) \times M(\text{unité de répétition}) = 1\,094$ mg de β CD-chitosan, qui permettront d'avoir 1,86 mmol de -NH_3^+ . Ce raisonnement a alors été suivi afin de formuler les CoPEC β CD-chitosan/alginate utilisés dans le cadre de cette thèse. De la même manière que dans le cas des CoPEC chitosan/alginate, cette voie de formulation permet d'obtenir des CoPEC β CD-chitosan/alginate compacts et ne se désintégrant pas (**Figure 53**).



Figure 53 : CoPEC β CD-chitosan/alginate préparé par ultracentrifugation.

Tout comme dans le cas du CoPEC chitosan/alginate, la surface (**Figure 54 a**) et l'intérieur (**Figure 54 b**) du CoPEC β CD-chitosan/alginate ont été observés en Microscopie Électronique à Balayage.

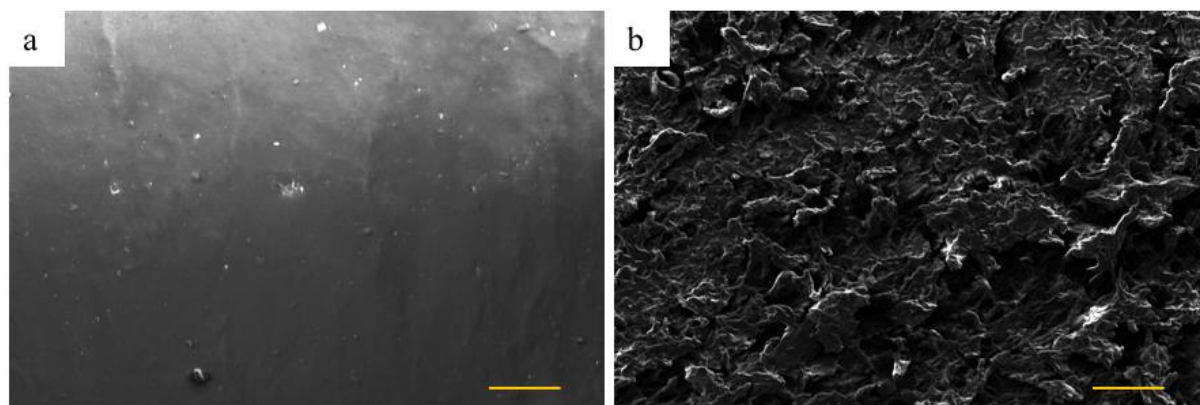


Figure 54 : Images MEB de a) la surface et b) l'intérieur d'un CoPEC β CD-chitosan/alginate. Échelles = 100 μ m.

Il peut alors être constaté que la surface et l'intérieur de ce CoPEC sont homogènes et non poreux. L'aspect microscopique de ce CoPEC fonctionnalisé est similaire à celui du CoPEC chitosan/alginate, indiquant que la fonctionnalisation du CoPEC par la β -cyclodextrine n'a pas d'influence notable sur la microstructure du matériau final.

De la même manière que pour le CoPEC chitosan/alginate, après déshydratation par lyophilisation, le CoPEC fonctionnalisé peut être broyé au pilon-mortier et tamisé afin d'obtenir des microparticules. Les observations en Microscopie Électronique à Balayage (**Figure 55**) suggèrent également une absence de porosité chez ces microparticules et un aspect comparable à celui des microparticules de CoPEC chitosan/alginate, ce qui est cohérent au vu de la similitude de microstructure des CoPEC bruts.

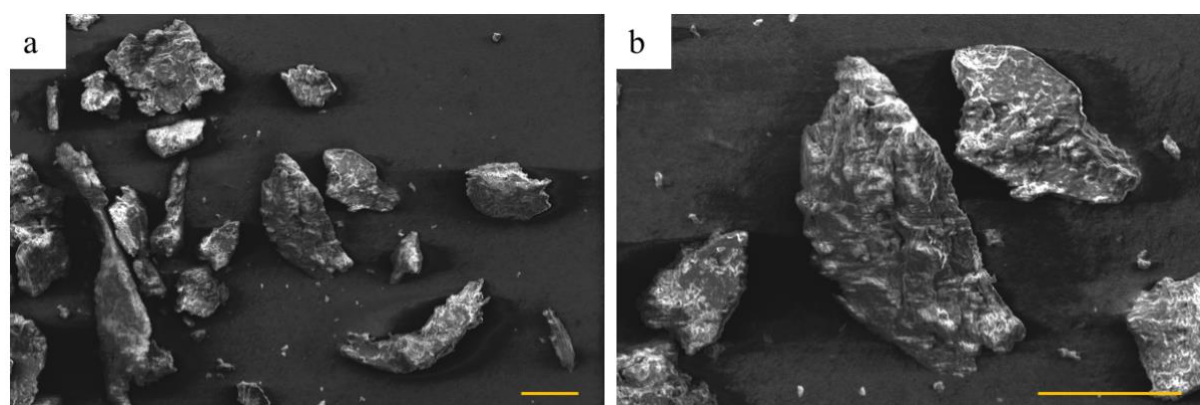


Figure 55 : Images MEB de microparticules de CoPEC β CD-chitosan/alginate (grossissement a) $\times$ 200 et b) $\times$ 500). Échelles = 100 μ m.

Ainsi, la fonctionnalisation du CoPEC chitosan/alginate par la β -cyclodextrine ne semble altérer ni la formulation du matériau, ni sa microstructure finale.

II. 2. 2. Détermination de la composition du CoPEC β CD-chitosan/alginate

Afin de déterminer la composition exacte (ratio entre les deux polyélectrolytes) des CoPEC β CD-chitosan/alginate ainsi formulés, un tel CoPEC a été préparé avec de l'alginate marqué à la rhodamine, un fluorophore facilement traçable, notamment en spectroscopie UV-Visible. Le β CD-chitosan utilisé lors de cette étude était alors celui présentant un degré de substitution de 25 %.

L'alginate a ainsi été marqué en se basant sur le travail de Ziv *et al.*³⁰² suivant une réaction impliquant les fonctions alcool de l'alginate de sodium et les fonctions isothiocyanate de l'isothiocyanate de rhodamine B (**Schéma 11**).

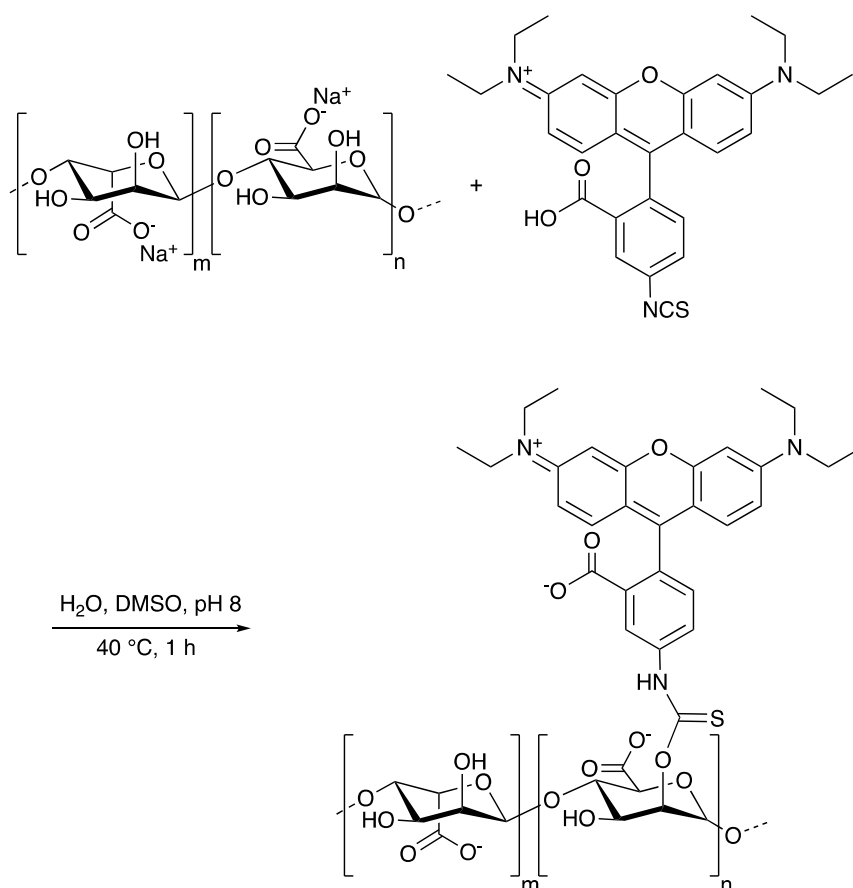


Schéma 11 : Marquage de l'alginate par réaction avec l'isothiocyanate de rhodamine B.

La réaction, conduite à 40 °C pendant 1 h en milieu légèrement basique (pH 8), a été arrêtée par ajout de NH_4Cl . Une dialyse à travers une membrane avec un seuil de rétention des molécules de 12-14 000 Da a ensuite permis de purifier le polymère en éliminant l'isothiocyanate de rhodamine B n'ayant pas réagi avec l'alginate de sodium. L'alginate marqué a été obtenu sous sa forme solide après lyophilisation.

Le degré de substitution du polymère a alors été déterminé par spectrophotométrie UV-Visible à 560 nm dans du tampon phosphate à pH 8.³⁰³ Une gamme a été construite à partir de solutions d'isothiocyanate de rhodamine B. D'après ce dosage, sur une masse de départ de 9,4 mg d'alginate marqué, 0,18 mg (0,00034 mmol) correspondait à de la rhodamine et donc 9,22 mg (0,047 mmol d'unités de répétition) à de l'alginate. Le degré de substitution du polymère marqué était donc de 0,7 %, ce qui paraissait particulièrement adapté à son utilisation dans le cadre de cette étude. En effet, il était suffisant pour pouvoir suivre en spectroscopie le polymère tout en étant assez faible pour ne pas altérer la formation du CoPEC.

Un CoPEC β CD-chitosan/alginate-rhodamine a alors été formulé. Le degré de substitution de l'alginate-rhodamine étant très faible, ce CoPEC a été préparé en suivant la même procédure et en utilisant les mêmes proportions de polymères que dans le cas de la formulation d'un CoPEC β CD-chitosan/alginate. 10,3 mg d'alginate-rhodamine et 36,6 mg de β CD-chitosan ont été engagés. Cette procédure a mené à un matériau comparable d'aspect au CoPEC β CD-chitosan/alginate après lyophilisation, à la différence de la couleur rougeâtre caractéristique de la présence de rhodamine (**Figure 56**).



Figure 56 : Aspect du CoPEC β CD-chitosan/alginate-rhodamine après lavage et lyophilisation.

Lors du procédé, le polymère alginate-rhodamine qui n'avait pas formé de complexe s'est retrouvé dans le surnageant après l'association des deux polyélectrolytes. Ainsi, l'alginate-rhodamine présent dans ce surnageant lors du procédé a été dosé par

spectrophotométrie UV-Visible à 560 nm, en construisant une courbe étalon à partir de solutions de cet alginate marqué. Selon ce dosage, le surnageant des complexes de polyélectrolytes, d'un volume total de 15 mL, avait une concentration en alginate-rhodamine de 15,36 mg/L. Cela signifie que seulement 0,2 mg (soit moins de 2 %) d'alginate-rhodamine sur les 10,3 mg utilisés en début de procédé se retrouvait dans le surnageant. La masse du matériau sec final étant de 18,4 mg, on peut en déduire la présence de 8,3 mg de β CD-chitosan. En termes molaires, il y avait donc dans ce CoPEC 0,051 mmol d'unités de répétition d'alginate et 0,0041 mmol d'unités de répétition de β CD-chitosan. Cela signifie qu'il y avait dans ce CoPEC 0,051 mmol de $(-\text{COO}^- + \text{COOH})$ de l'alginate et 0,012 mmol de $(-\text{NH}_2 + -\text{NH}_3^+)$ provenant du β CD-chitosan (car on retrouve trois fonctions amines dans une unité de répétition de β CD-chitosan). Cette différence de nombre de charges provenant de chaque polyélectrolyte dans le CoPEC, avec un certain « excès » de charges d'alginate, peut probablement s'expliquer par un encombrement stérique venant des cyclodextrines greffées au chitosan. En effet, dans ce cas, si une cyclodextrine se trouve entre deux charges du chitosan, alors il faudra probablement que l'alginate investisse plus d'unités de répétitions pour « rejoindre » la charge de chitosan suivante située après la cyclodextrine que dans le cas où il n'y aurait pas de cyclodextrine (voir une illustration de cette hypothèse en **Figure 57**).

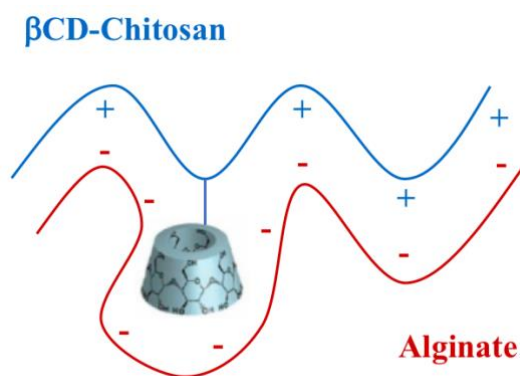


Figure 57 : Illustration de l'hypothèse de l'encombrement stérique provenant de la cyclodextrine dans le CoPEC β CD-chitosan/alginate.

D'après cette étude, il peut être considéré que, lors de la formulation de CoPEC β CD-chitosan/alginate, la totalité de l'alginate engagé en début de procédé se retrouve dans le matériau final. Cette conclusion permet donc de déterminer la composition de tout CoPEC formulé à partir de β CD-chitosan et d'alginate.

Ainsi, la méthode d'ultracentrifugation a permis de développer avec succès un nouveau CoPEC fonctionnel à base de β CD-chitosan et d'alginate. Ce nouveau matériau a alors été caractérisé afin d'en déterminer la composition exacte et la microstructure.

Cette microstructure étant cependant non poreuse, à l'image de celle du CoPEC chitosan/alginate non fonctionnalisé, une méthode a été développée afin d'induire cette porosité très recherchée dans le domaine des biomatériaux car augmentant notamment la surface de contact des matériaux obtenus.

III. Préparation de CoPEC poreux à base de chitosan et d'alginate par ultracentrifugation

Dans le domaine des matériaux et en particulier dans celui des biomatériaux, la porosité est un paramètre primordial. Elle augmente considérablement la surface de contact du matériau, ce qui engendre une augmentation de ses effets ayant lieu par contact. Par exemple, pour des applications en milieu biologique d'un implant véhiculant une molécule active, la porosité peut permettre d'augmenter le nombre de cellules pouvant coloniser le matériau et donc pouvant avoir accès à la substance active.

III. 1. Préparation de CoPEC bruts poreux à base de chitosan et d'alginate

III. 1. 1. Principe de la formulation de CoPEC bruts poreux à base de chitosan et d'alginate

Le CoPEC chitosan/alginate n'étant pas spontanément poreux, une méthode de formulation d'une version poreuse de ce matériau a été mise en place. Lors de cette formulation, le CoPEC est formulé quasiment de la même façon que dans le cas du CoPEC non poreux. La principale différence consiste en l'introduction de particules de carbonate de calcium (CaCO_3) en tant qu'éléments porogènes sacrificiels dans l'une des solutions de polyélectrolytes (celle de chitosan) avant le mélange de ces solutions. Afin de répartir de façon homogène les particules dans le CoPEC final, la solution de chitosan dans laquelle sont suspendues les particules est maintenue sous agitation lors de l'association des deux

polyélectrolytes à la pompe péristaltique. Les conditions de centrifugation et d'ultracentrifugation de la suspension de complexes de polyélectrolytes sont conservées par rapport à la méthode de préparation de CoPEC non poreux décrite précédemment. Après ultracentrifugation, le CoPEC contenant les particules de carbonate de calcium apparaît blanchâtre du fait de la présence de ces particules (**Figure 58**) et ces dernières sont visibles sous la forme de cristaux (reconnaissables à leur forme cubique) par observation MEB (**Figure 59**). Le CoPEC est alors plongé dans une solution permettant d'éliminer ces particules afin de libérer des espaces, menant ainsi à l'apparition de pores.



Figure 58 : CoPEC chitosan/alginate contenant des particules de carbonate de calcium, après ultracentrifugation.

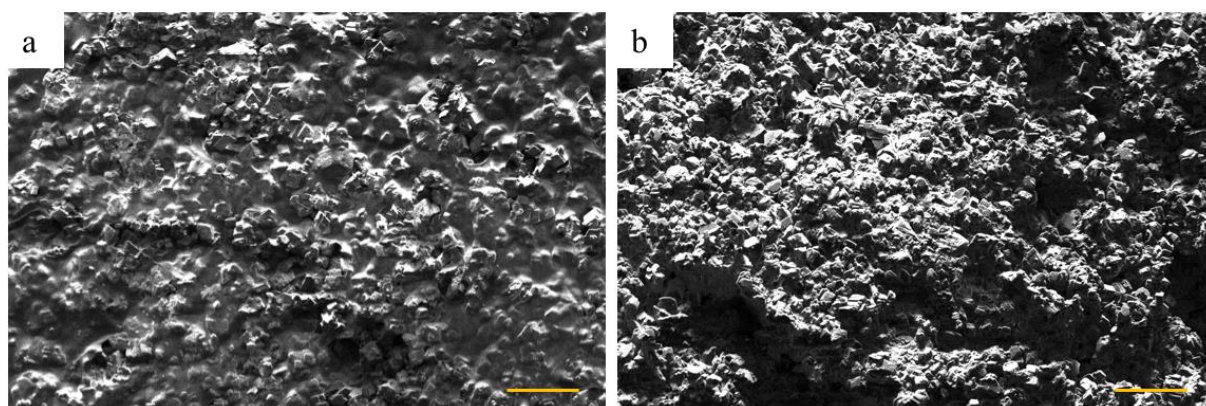


Figure 59 : Images MEB de a) la surface et b) l'intérieur d'un CoPEC chitosan/alginate préparé par ultracentrifugation, contenant des particules de carbonate de calcium. Échelles = 50 μ m.

III. 1. 2. Comparaison de deux milieux de dissolution des particules porogènes

Deux milieux, agissant sur les particules de deux manières distinctes, ont été employés afin d'éliminer les particules de carbonate de calcium présentes dans le CoPEC chitosan/alginate après ultracentrifugation :

- Une solution d'EDTA 0,1 M à pH 5 permettant d'éliminer les particules *via* la chélation des ions Ca^{2+} (**Figure 60**).

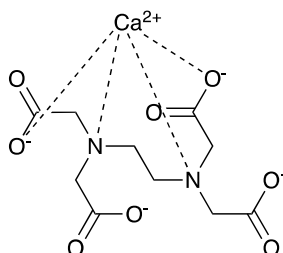


Figure 60 : Représentation de la chélation d'un ion Ca^{2+} par l'EDTA.

Dans cette première stratégie, la concentration en EDTA est fixée à 0,1 M car la limite de solubilité de l'EDTA dans l'eau est de 0,3 M. Le pH est quant à lui fixé à 5 car la littérature³⁰⁴ fait état d'une efficacité de déminéralisation par l'EDTA plus importante à un pH compris entre 5 et 6.

- Une solution saline acide (NaBr 1M en HCl à pH 1) permettant de dissoudre les particules selon la réaction :



Dans ce cas, le pH est fixé à 1 afin de favoriser la dissolution en augmentant la quantité d'ions hydronium en solution. La dissolution des particules de carbonate de calcium dans ce cas de figure mène à la production de dioxyde de carbone visible sous la forme d'un dégagement gazeux lors de l'expérience. Le CoPEC est alors retiré de la solution une fois que le dégagement gazeux n'est plus détectable.

Des CoPEC formulés dans des conditions identiques avec pour seule différence le milieu de dissolution des particules de carbonate de calcium ont ainsi été préparés. Dans les deux cas, le passage du CoPEC contenant les particules de carbonate dans le milieu de dissolution des particules a résulté en une modification de l'aspect du matériau, la blancheur de ce dernier semblant atténuée du fait de la disparition des particules (**Figure 61**).

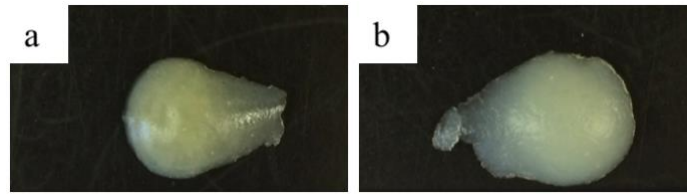


Figure 61 : CoPEC chitosan/alginate formulé par ultracentrifugation avec des particules de carbonate de calcium, après dissolution des particules dans a) une solution d'EDTA 0,1 M à pH 5 et b) une solution aqueuse de NaBr 1 M en HCl à pH 1.

L'impact du milieu de dissolution sur la microstructure du CoPEC final a été évalué par des observations MEB de la surface et de l'intérieur des matériaux (**Figure 62**). Ces microstructures ont été comparées à celle d'un CoPEC chitosan/alginate préparé sans utilisation de particules de carbonate de calcium.

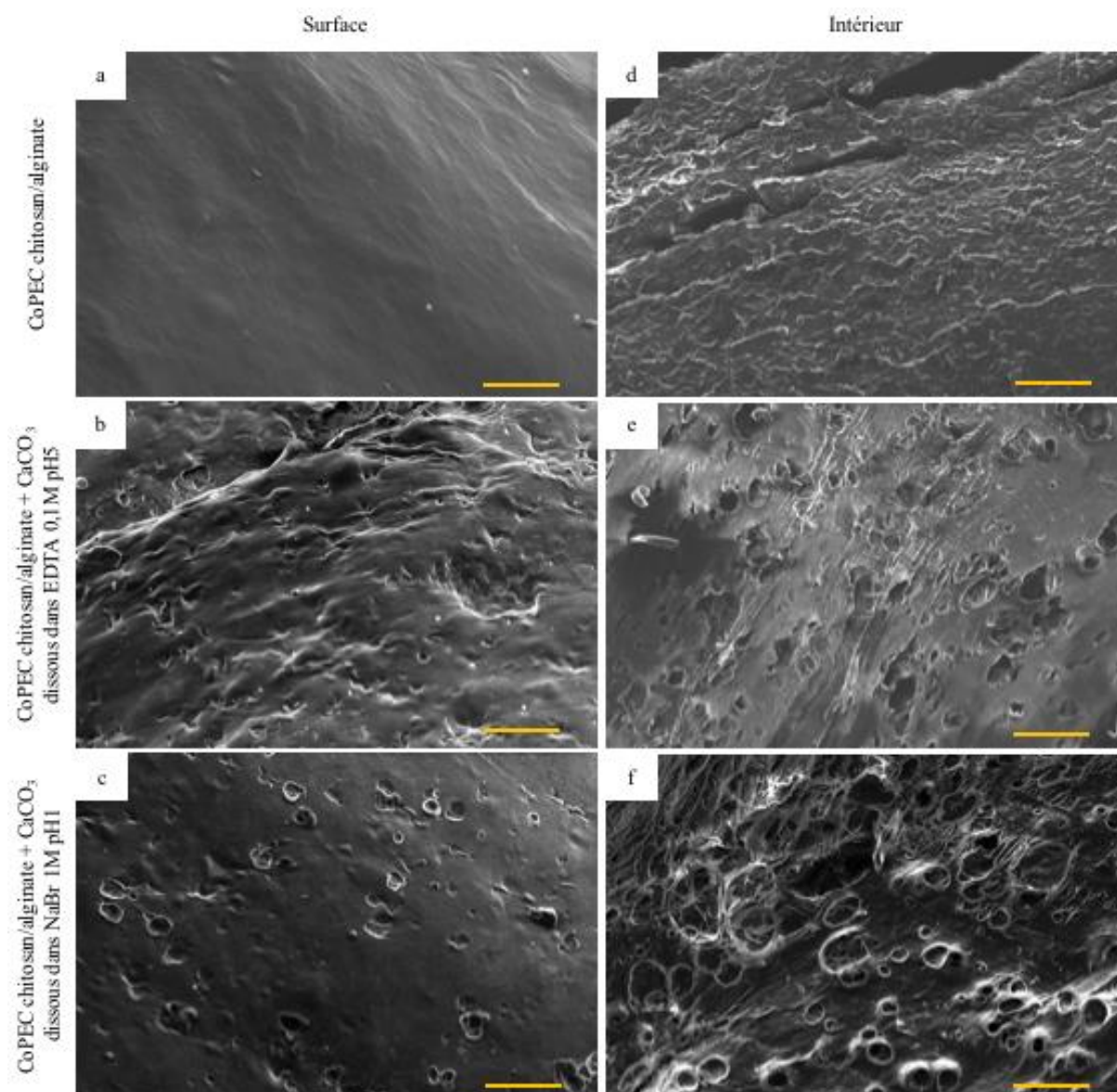


Figure 62 : Images MEB de la surface et de l'intérieur du CoPEC chitosan/alginate préparé sans CaCO_3 (a, d) et des CoPEC chitosan/alginate préparés avec une proportion massique polyélectrolytes : CaCO_3 1 : 1 et avec dissolution du CaCO_3 dans une solution aqueuse d'EDTA 0,1 M à pH 5 (b,e) ou dans une solution aqueuse de NaBr 1 M en HCl à pH 1 (c, f). Échelles = 100 μm .

Sur ces images, il peut être constaté que les deux milieux de dissolution employés mènent à une légère porosité du matériau final, aussi bien en surface (**Figure 62 b et c**) qu'à l'intérieur (**Figure 62 e et f**) de celui-ci (bien que plus évidente sur les clichés intérieurs). Néanmoins, cette porosité paraît plus importante dans le cas de la solution saline de NaBr 1 M en HCl à pH 1 (**Figure 62 c et f**). Ce milieu a alors été retenu pour les études ultérieures sur les CoPEC poreux.

III. 1. 3. Détermination de la durée nécessaire d'immersion du CoPEC dans la solution saline acide pour dissoudre l'intégralité des particules de carbonate de calcium

Afin de s'assurer de la complète dissolution des particules de carbonate de calcium dans notre méthode, un essai de suivi de masse en cours de dissolution des particules a été mené. Lors de cet essai, le CoPEC chitosan/alginate + CaCO_3 obtenu après ultracentrifugation a dans un premier temps été lavé à l'eau ultrapure puis lyophilisé avant d'être pesé. Une masse de 60,4 mg a alors été relevée. Le CoPEC a ensuite été placé pendant 2 jours (durée nécessaire à la fin du dégagement gazeux) dans une solution aqueuse saline (1 M NaBr) acide (pH 1) avec un renouvellement quotidien de cette solution. Le CoPEC a ensuite été lavé à l'eau ultrapure puis à nouveau lyophilisé et pesé, donnant une masse de 45,1 mg, soit une perte de 25 % de la masse de départ. Le matériau a alors été de nouveau immergé dans la solution saline acide pendant 24 h avant un nouveau lavage, une nouvelle lyophilisation et une nouvelle pesée, donnant cette fois une masse de 43,6 mg, soit une perte supplémentaire de seulement 2,5 % de la masse initiale du matériau. Pour contrôle, une procédure identique a été appliquée sur un autre CoPEC fabriqué de la même manière mais immergé simplement dans de l'eau ultrapure et non dans la solution saline acide. Des pertes de masse de 0,7 % après 2 jours et de 0,5 % supplémentaire après 24 h de plus ont ainsi été relevées, validant d'une part la non-dissolution des particules dans l'eau ultrapure et montrant également les très légères pertes de masse indépendantes de la dissolution des particules pouvant être relevées lors des manipulations. Ainsi, il peut être considéré que la quasi-totalité des particules de carbonate présentes initialement dans le CoPEC était dissoute après 48 h d'immersion dans la solution saline acide, c'est-à-dire à partir du moment où il n'y avait plus de dégagement gazeux provenant du matériau.

Ce test nous permet alors de valider notre méthode de dissolution des particules de carbonate dans la solution saline acide et nous assure que la dissolution de ces particules est complète une fois l'absence de dégagement gazeux constatée.

III. 1. 4. Impact de la proportion de particules porogènes sur la microstructure du matériau final

Afin d'évaluer l'impact de la proportion de particules de carbonate de calcium sur la microstructure du CoPEC final, des CoPEC chitosan/alginate avec des proportions massiques

polyélectrolytes : CaCO_3 de 1 : 2, 1 : 5 et 1 : 10 ont été formulés. Logiquement, la durée d'immersion des matériaux dans la solution saline acide (durée jusqu'à la fin du dégagement gazeux, correspondant à la fin de la dissolution des particules) a augmenté avec la proportion de particules utilisée (**Tableau 12**).

Tableau 12 : Durée d'immersion du CoPEC dans la solution acide en fonction de la proportion massique polyélectrolytes : CaCO_3 utilisée.

Proportion massique polyélectrolytes : CaCO_3	Durée d'immersion
1 : 2	3 jours
1 : 5	7 jours
1 : 10	15 jours

Tout comme dans l'étude de l'influence du milieu de dissolution des particules, l'impact de la proportion de ces particules sur la microstructure du matériau final a été évalué par des observations MEB durant lesquelles la surface et l'intérieur des matériaux ont été visualisés (**Figure 63**).

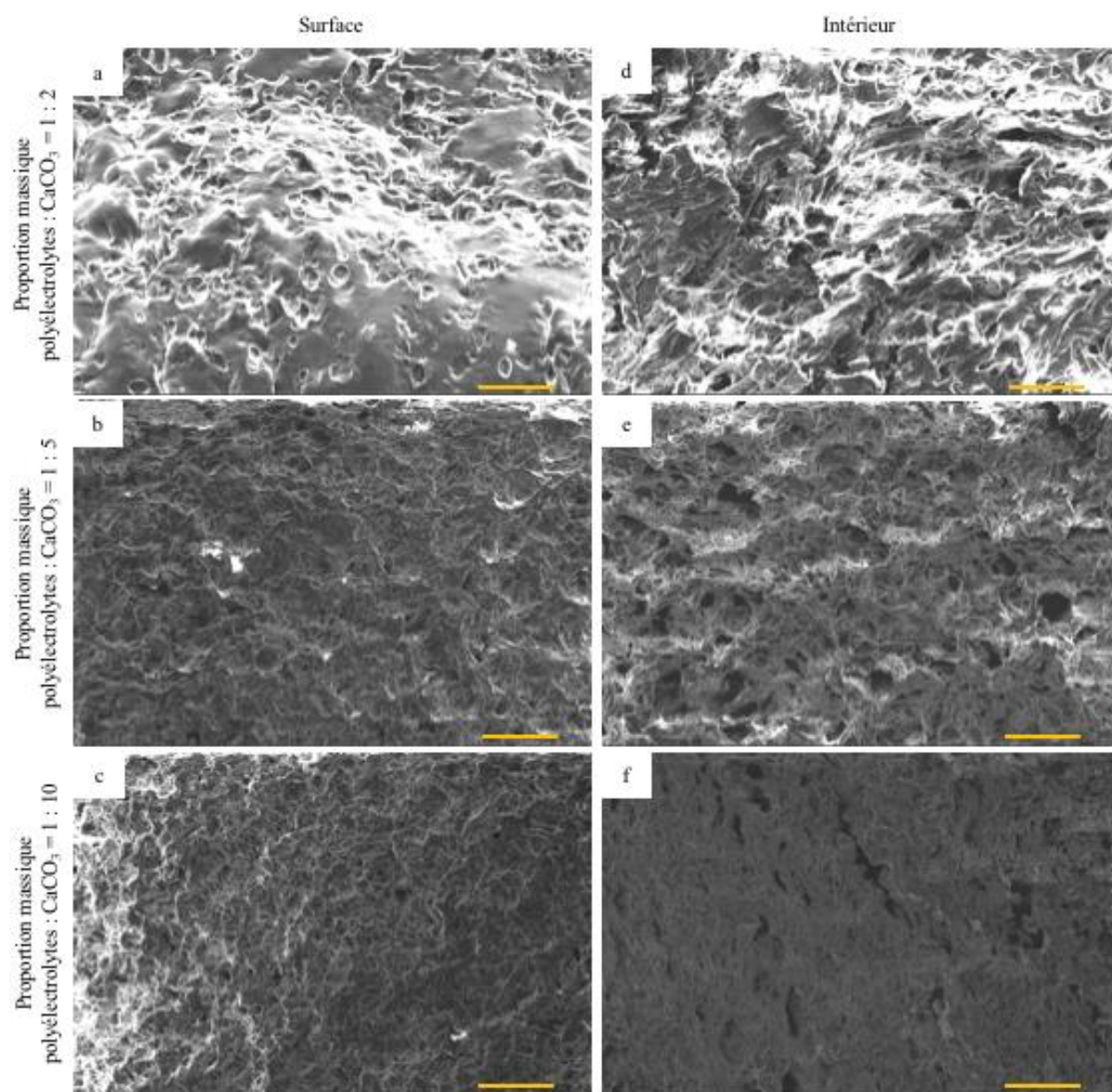


Figure 63 : Images MEB de la surface et de l'intérieur des CoPEC chitosan/alginate préparés avec des proportions massiques polyélectrolytes : CaCO_3 de 1 : 2 (a, d), 1 : 5 (b, e) et 1 : 10 (c, f) et avec dissolution du CaCO_3 dans une solution de NaBr 1 M en HCl à pH 1. Échelles = 100 μm .

Les observations MEB permettent clairement de mettre en évidence une influence de la proportion de particules de carbonate de calcium utilisée lors de la formulation sur la porosité du matériau final. En effet, on peut constater que la porosité du matériau final augmente avec la proportion de particules utilisée et ceci est visible aussi bien en surface (**Figure 63 a, b et c**) qu'à l'intérieur (**Figure 63 d, e et f**) du matériau. Pour une proportion massique polyélectrolytes : CaCO_3 de 1 : 5, on obtient même une microstructure de type « nid d'abeille » (**Figure 63 b et e**), un type de microstructure très intéressant dans le domaine des matériaux, en particulier pour des applications médicales. En effet, ce type de microstructure présente une surface de contact très importante permettant au biomatériau d'avoir un grand

nombre d'interactions avec divers éléments biologiques et en particulier avec des cellules qui peuvent éventuellement coloniser l'édifice. L'AlgiMatrix™, une plateforme tridimensionnelle poreuse à base d'alginate commercialisée par ThermoFisher Scientific, est par exemple utilisée comme support de culture 3D qui, colonisé par exemple par des cellules tumorales, permet d'obtenir un modèle *in vitro* de tumeur bien plus représentatif que les modèles classiques de culture cellulaire 2D.³⁰⁵

Ainsi, il est possible de contrôler la microporosité des CoPEC à base de chitosan et d'alginate en faisant varier le ratio massique polyélectrolytes : CaCO₃ utilisé lors de la formulation. La méthode développée permet donc très simplement d'ajuster la microstructure du matériau final en fonction des besoins et des applications envisagées. Cette méthode a alors été appliquée pour la formulation d'un CoPEC β CD-chitosan/alginate poreux.

III. 1. 5. Préparation de CoPEC β CD-chitosan/alginate poreux

La méthode de formulation de CoPEC poreux détaillée avec le CoPEC chitosan/alginate a également été appliquée à un CoPEC β CD-chitosan/alginate. Dans ce cas, la proportion massique polyélectrolytes : CaCO₃ choisie était de 1 : 5 étant donné que cette proportion avait permis d'obtenir une porosité particulièrement intéressante dans le cadre de l'étude sur l'impact de cette proportion massique sur la microstructure finale des matériaux.

Dans ce cas, la microstructure du matériau, observée en Microscopie Électronique à Balayage, apparaît à nouveau très poreuse, aussi bien en surface (**Figure 64 a**) qu'à l'intérieur (**Figure 64 b**) du CoPEC.

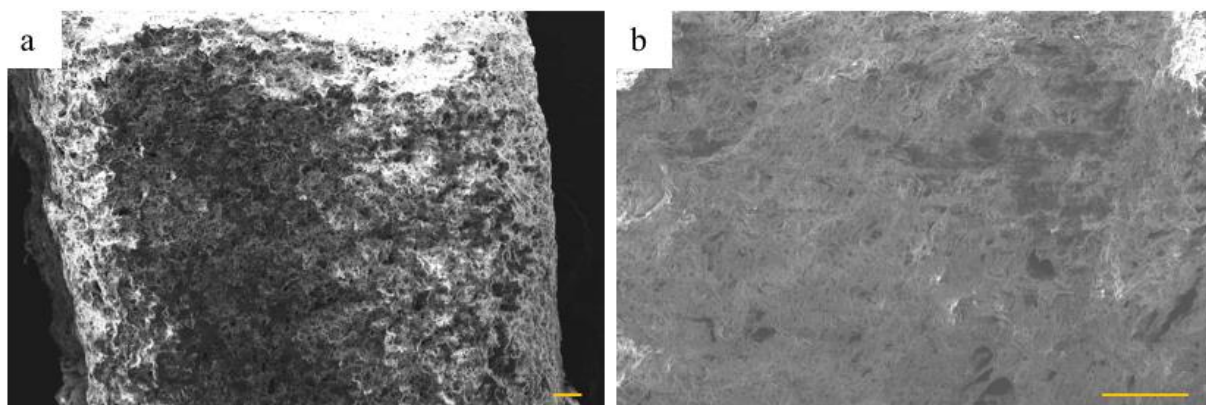


Figure 64 : Images MEB de a) la surface et b) l'intérieur d'un CoPEC β CD-chitosan/alginate préparé avec une proportion massique polyélectrolytes : CaCO_3 de 1 : 5 et avec dissolution du CaCO_3 dans une solution de NaBr 1 M en HCl à pH 1. Échelles = 100 μm .

Ainsi, la méthode de formulation de CoPEC poreux à base d'alginate de sodium et de chitosan permet de contrôler simplement la microstructure du matériau final, que le chitosan soit fonctionnalisé ou non par la β -cyclodextrine. Cette microstructure poreuse peut ainsi être adaptée à l'utilisation finale envisagée pour le matériau.

La porosité induite au sein des CoPEC devrait permettre d'améliorer leurs propriétés en augmentant considérablement la surface de contact disponible à différents éléments extérieurs et en particuliers à divers éléments biologiques tels que des cellules. De plus, les cyclodextrines présentes dans le CoPEC fonctionnalisé devraient, dans ce cas, être plus exposées et permettre un meilleur accès aux molécules hydrophobes ultérieurement incluses dans le matériau.

A la suite de la mise en place de la formulation de CoPEC bruts poreux, il a été envisagé d'adapter cette méthode à la formulation de microparticules poreuses de CoPEC.

III. 2. Préparation de particules poreuses de CoPEC à base de chitosan et d'alginate

III. 2. 1. Préparation de particules poreuses de CoPEC chitosan/alginate

Afin d'augmenter la surface de contact des microparticules de CoPEC, une méthode d'obtention de microparticules microporeuses de CoPEC à base de chitosan et d'alginate a été développée.

Il a tout d'abord été essayé de préparer des CoPEC alginate/chitosan avec des particules de CaCO_3 puis de dissoudre ces particules avant de lyophiliser le matériau (alors poreux) pour finalement le broyer. Cependant, les microparticules obtenues suivant cette méthode ne présentaient aucune porosité, probablement du fait de la forte sollicitation mécanique infligée par le broyage entraînant un écroulement de l'édifice tridimensionnel et menant finalement à la perte du caractère poreux du matériau.

Une autre méthode a donc été mise en place. Selon cette méthode, le matériau est préparé avec des particules de CaCO_3 (d'une taille inférieure à $30\ \mu\text{m}$), comme lors de la formulation de CoPEC bruts poreux abordée en III. 1., jusqu'à l'ultracentrifugation. Le CoPEC, contenant alors les particules de carbonate, est ensuite directement lyophilisé avant d'être broyé et tamisé entre 63 et $300\ \mu\text{m}$. Ce double-tamissage permet de ne récupérer que des particules d'une taille suffisamment supérieure à $30\ \mu\text{m}$ pour contenir les microparticules de carbonate. Il en résulte donc des microparticules de CoPEC contenant des microparticules de carbonate de calcium qui sont alors visibles par observation MEB sous la forme de cristaux (**Figure 65**).

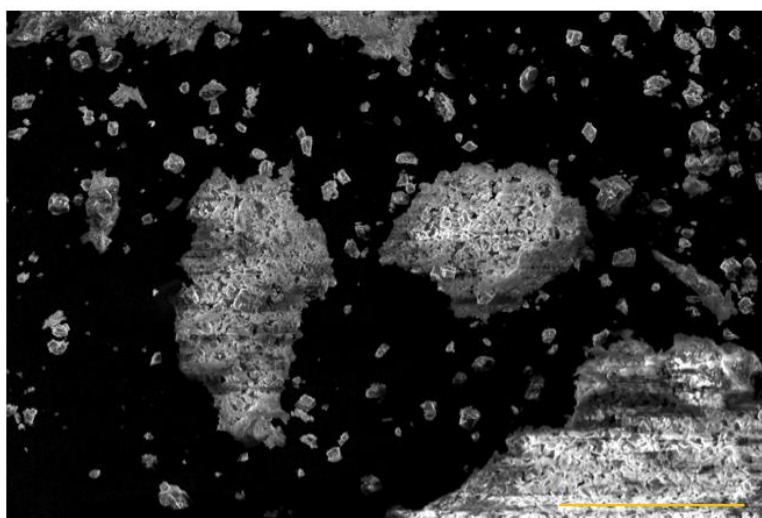


Figure 65 : Image MEB de particules de CoPEC chitosan/alginate contenant des microparticules de CaCO_3 . Échelle = $100\ \mu\text{m}$.

Les particules sont alors immergées dans un mélange d'éthanol et d'acide chlorhydrique concentré (9,52 : 1 v/v) qui est renouvelé jusqu'à constater la fin du dégagement gazeux induit par la dissolution du carbonate. L'éthanol permet ici d'éviter une éventuelle déformation des particules lors de l'immersion en augmentant leur dureté, tandis que l'acide permet la dissolution des particules de carbonate. Le sel n'étant pas nécessaire

dans ce cas (bien au contraire car il pourrait engendrer une déformation des particules), le milieu de dissolution du carbonate est préparé sans NaBr. Les particules de CoPEC sont enfin récupérées à l'état sec après passage à l'étuve (37 °C). En MEB, on observe alors une microstructure radicalement différente après dissolution des particules de carbonate (**Figure 66**).

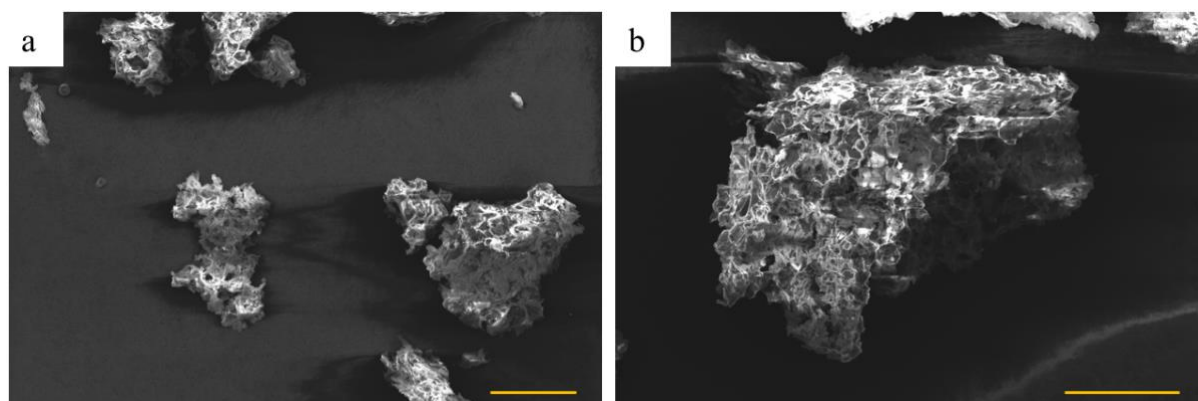


Figure 66 : Images MEB de particules de CoPEC chitosan/alginate poreuses (grossissement a) x 300 et b) x 400). Échelles = 100 μ m.

On constate en effet la disparition des cristaux caractéristiques du carbonate de calcium, qui laissent alors place à des micropores de l'ordre de la dizaine de micromètres. Des microparticules microporeuses de CoPEC chitosan/alginate sont ainsi obtenues. Cette nouvelle méthode a alors été adaptée à la formulation de microparticules microporeuses de CoPEC fonctionnalisé par la β -cyclodextrine.

III. 2. 2. Préparation de particules poreuses de CoPEC β CD-chitosan/alginate

Le protocole mis en place pour la préparation de particules poreuses de CoPEC chitosan/alginate a également été appliqué au CoPEC β CD-chitosan/alginate. De la même manière que lors de la formulation de particules de CoPEC chitosan/alginate poreuses, après ultracentrifugation, lyophilisation et broyage du CoPEC et avant le passage des particules dans une solution saline de 1 M NaBr en HCl à pH 1, on peut constater en microscopie électronique à balayage la présence des cristaux de CaCO_3 au sein des particules (**Figure 67 a**). Après passage de ces particules dans la solution saline acide, on constate la disparition des microparticules de carbonate (**Figure 67 b**). Des particules de CoPEC β CD-

chitosan/alginate poreuses, avec des pores de l'ordre de la dizaine de micromètres, sont ainsi obtenues.

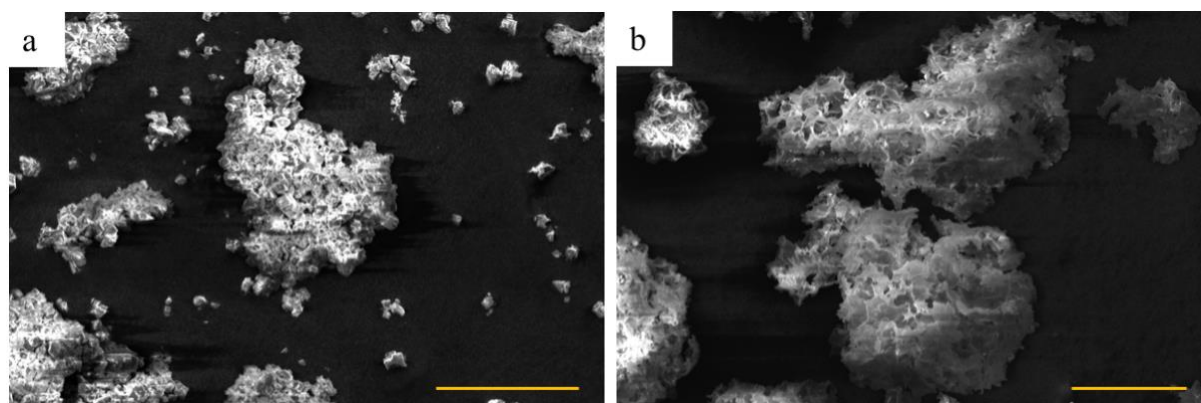


Figure 67 : Images MEB de particules de CoPEC β CD-chitosan/alginate formulé avec des particules de carbonate de calcium, a) avant et b) après dissolution du CaCO_3 . Échelles = 100 μm .

Ainsi, une méthode de formulation de microparticules microporeuses de CoPEC a pu être mise en place. Cette méthode peut aussi bien s'appliquer au CoPEC chitosan/alginate non fonctionnalisé qu'à celui contenant la β -cyclodextrine. De la même manière que dans le cas des CoPEC poreux bruts, la porosité induite au sein des microparticules de CoPEC devrait permettre d'améliorer leurs propriétés en augmentant considérablement la surface de contact disponible à différents éléments extérieurs et en facilitant l'accès aux cyclodextrines présentes dans les particules de CoPEC fonctionnalisées.

Après avoir optimisé et caractérisé la formulation du CoPEC β CD-chitosan/alginate sous forme brute ou sous forme de microparticules et sous forme poreuse ou non, une autre méthode de formulation de CoPEC, permettant notamment la production à grande échelle de matériaux, a été adaptée au couple β CD-chitosan/alginate ; la méthode de sédimentation et évaporation.

IV. Fabrication de CoPEC à base de chitosan et d'alginate par sédimentation et évaporation

En s'inspirant de la méthode décrite par Costa *et al.*⁹⁷ abordée dans le chapitre 1, des membranes à base d'alginate et de chitosan, fonctionnalisées ou non par la β -cyclodextrine, ont été préparées. Différentes conditions de formulation ont alors été employées afin de moduler les dimensions des membranes finales obtenues.

IV. 1. Fabrication de membranes de CoPEC à base de chitosan et d'alginate par sédimentation et évaporation dans une plaque de 12 puits

IV. 1. 1. Fabrication de membranes de CoPEC chitosan/alginate par sédimentation et évaporation dans une plaque de 12 puits

Une méthode inspirée de celle décrite par Costa *et al.*⁹⁷, abordée lors de l'état de l'art en début de ce manuscrit, a été développée. Selon cette méthode, des complexes de polyélectrolytes sont préparés de la même manière que lors de la formulation de CoPEC par ultracentrifugation, en mélangeant deux solutions de polyélectrolytes de charges opposées en présence de sel (1 M NaBr). La suspension de complexes ainsi obtenue est alors centrifugée (9 400 g, 15 min, 20 °C) pour former un résidu de complexes qui peut alors être re-suspendu de manière homogène dans un volume de surnageant adapté au volume du puits dans lequel il sera versé (dans ce cas 7 mL). Une fois la suspension introduite dans un puits de plaque de 12 puits, cette plaque est placée à l'étuve (37 °C) pendant sept jours, ce qui permet au surnageant de s'évaporer. Les complexes sont alors compactés par sédimentation et évaporation/séchage, formant une membrane au fond du puits. Afin d'éliminer le sel précipité lors de la compaction, un lavage à l'eau ultrapure est opéré puis le matériau est de nouveau placé à l'étuve pendant 20 h pour finalement former une membrane sèche présentant un diamètre compris entre 1 et 2 cm (diamètre imposé par les puits qui eux ont un diamètre de 2,1 cm) et une épaisseur de 1-2 mm (**Figure 68**).

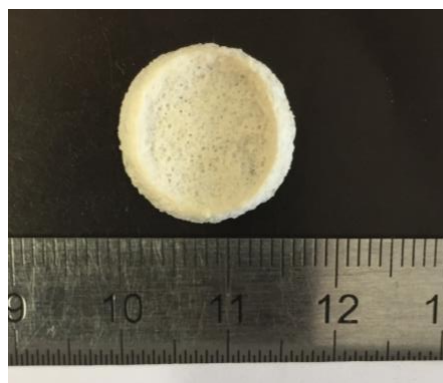


Figure 68 : Membrane de chitosan et d'alginate préparée par sédimentation et évaporation dans une plaque de 12 puits.

On peut alors constater à l'œil nu la présence d'une certaine porosité en surface du matériau formulé.

Afin de caractériser de manière plus précise la microstructure de cette membrane, des observations MEB ont été menées (**Figure 69**).

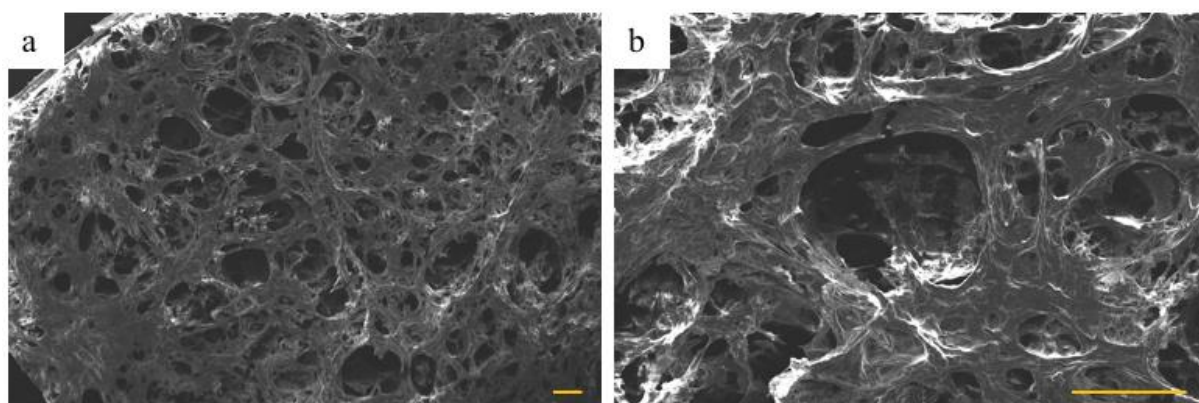


Figure 69 : Images MEB d'une membrane chitosan/alginate préparée par sédimentation et évaporation dans une plaque de 12 puits (grossissement de a) $\times 50$ et b) $\times 200$). Échelles = 200 μm .

D'après ces observations MEB et de manière évidente, l'importante porosité visible à l'œil en surface de la membrane est confirmée. On distingue ainsi des pores conséquents en surface, de l'ordre de 300 μm . En arrière-plan des pores importants de surface, on peut également distinguer d'autres pores, plus petits (de l'ordre de quelques dizaines de micromètres), suggérant une porosité en profondeur de la membrane et avec potentiellement des interconnexions entre les pores. Ce type de microstructure, avec une interconnexion des pores, offre une surface de contact très conséquente et est donc très intéressante pour des applications biologiques mais aussi dans d'autres domaines nécessitant de grandes surfaces de contact avec les matériaux, tels que la catalyse par exemple.

Cette méthode de formulation de membranes de CoPEC par sédimentation et évaporation a également été appliquée au couple β CD-chitosan/alginate.

IV. 1. 2. Fabrication de membranes de CoPEC β CD-chitosan/alginate par sédimentation et évaporation dans une plaque de 12 puits

Une membrane à base d'alginate et de β CD-chitosan de degré de substitution de 19 % a été formulée en suivant le même protocole que dans le cas du chitosan non fonctionnalisé mais en augmentant la masse de β CD-chitosan afin de compenser les charges rendues indisponibles par la fonctionnalisation. En effet, dans le cas du β CD-chitosan présentant un degré de substitution de 19 %, l'unité de répétition du polymère peut être présentée selon la **Figure 70**.

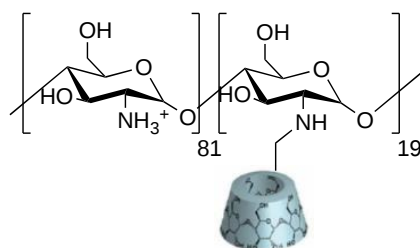


Figure 70 : Représentation de l'unité de répétition du β CD-chitosan présentant un DS de 19 %.

Dans ce cas, une unité de répétition, contenant 81 groupements -NH_3^+ , a une masse molaire de 37 404 g/mol. En partant de 50 mg d'alginate de sodium, soit 0,25 mmol de groupements -COO^- , on utilise donc 115 mg de β CD-chitosan, permettant d'avoir 0,003 mmol d'unités de répétition, soit 0,25 mmol de groupements -NH_3^+ .

En suivant le protocole expliqué en IV. 1. 1., une membrane comparable d'aspect, de diamètre et d'épaisseur à celle constituée d'alginate et de chitosan non fonctionnalisé a été obtenue après lyophilisation (**Figure 71**). A l'œil nu, une porosité de surface pouvait à nouveau être constatée.



Figure 71 : Membrane de β CD-chitosan et d'alginate préparée par sédimentation et évaporation dans une plaque de 12 puits.

Des observations au MEB ont alors permis de conclure à une microstructure très similaire à celle de la membrane de chitosan et d'alginate préparée dans les mêmes conditions, avec une importante porosité de surface ainsi que des indices d'interconnexions avec des pores plus petits en profondeur dans le matériau (**Figure 72**).

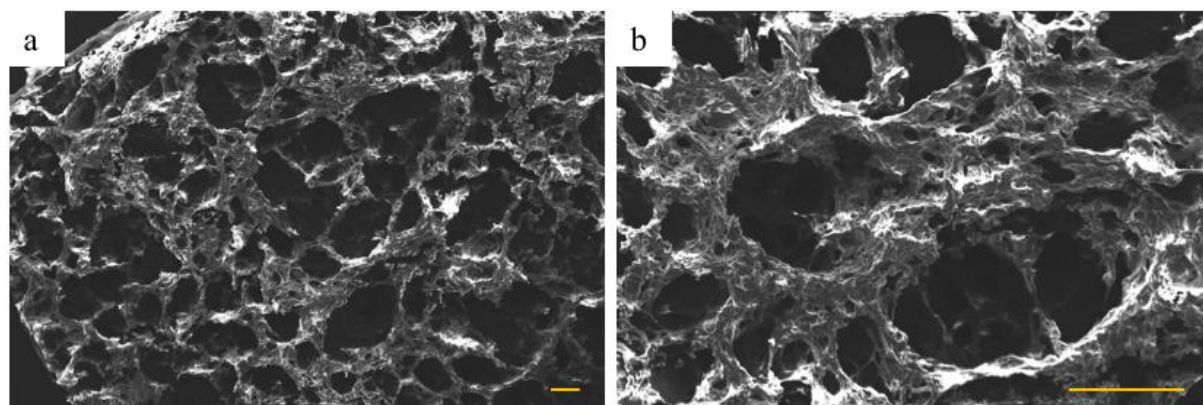


Figure 72 : Images MEB d'une membrane β CD-chitosan/alginate préparée par sédimentation et évaporation dans une plaque de 12 puits (grossissement de a) $\times 50$ et b) $\times 200$). Échelles = 200 μ m.

La fonctionnalisation du chitosan par la β -cyclodextrine n'a donc pas d'influence sur la microstructure de la membrane préparée dans une plaque de 12 puits. La membrane conserve alors l'intéressante porosité évoquée au sujet de la membrane chitosan/alginate.

Afin de moduler la taille des matériaux préparés, des membranes à base de chitosan, de β CD-chitosan et d'alginate ont également été préparées dans une plaque de 24 puits, présentant des puits d'un diamètre moins important que celui de leurs analogues à 12 puits.

IV. 2. Fabrication de membranes de CoPEC à base de chitosan et d'alginate par sédimentation et évaporation dans une plaque de 24 puits

IV. 2. 1. Fabrication de membranes de CoPEC chitosan/alginate par sédimentation et évaporation dans une plaque de 24 puits

Pour la formulation de membranes à base de chitosan et d'alginate dans une plaque de 24 puits, une procédure similaire à celle employée pour la fabrication des mêmes membranes dans une plaque de 12 puits a été mise en œuvre. Les quantités et volumes ont cependant été ajustés afin d'être adaptés à la plus petite taille des puits. Des membranes compactes d'un diamètre de l'ordre du centimètre (diamètre toujours imposé par celui des puits qui était dans ce cas de 1,6 cm) et d'une épaisseur d'environ 1 mm ont alors été obtenues (**Figure 73**).

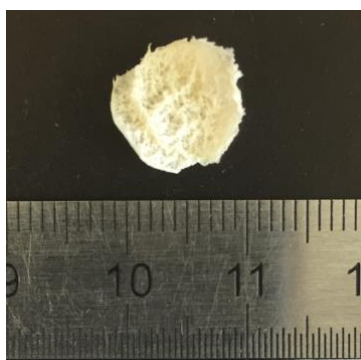


Figure 73 : Membrane de chitosan et d'alginate préparée par sédimentation et évaporation dans une plaque de 24 puits.

Des observations MEB de ces nouvelles membranes ont alors révélé une microstructure similaire à celle des mêmes membranes préparées dans une plaque de 12 puits (**Figure 74**).

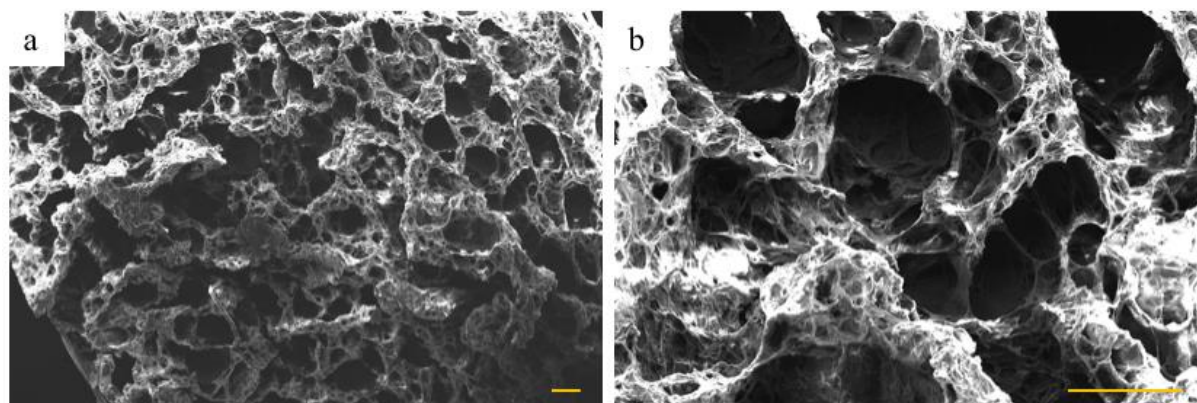


Figure 74 : Images MEB d'une membrane chitosan/alginate préparée par sédimentation et évaporation dans une plaque de 24 puits (grossissement de a) $\times 50$ et b) $\times 200$). Échelles = 200 μm .

On retrouve alors l'importante porosité de surface (de l'ordre de quelques centaines de micromètres) déjà évoquée dans le cas des membranes préparées dans des plaques de 12 puits, avec de possibles interconnexions avec des pores plus petits (de l'ordre de quelques dizaines de micromètres) en profondeur. Il semble ainsi que la modification de la taille des puits n'ait d'influence ni sur la faisabilité de la préparation de membranes chitosan/alginate, ni sur la microstructure des matériaux obtenus. Les uniques caractéristiques variables semblent alors être les dimensions du matériau, ce qui offre alors un moyen simple de modulation de la taille des membranes à base de chitosan et d'alginate tout en conservant les caractéristiques microstructurales des matériaux finaux.

La modulation de la taille des puits afin de varier les dimensions des membranes obtenues a également été appliquée au couple β CD-chitosan/alginate.

IV. 2. 2. Fabrication de membranes de CoPEC β CD-chitosan/alginate par sédimentation et évaporation dans une plaque de 24 puits

La procédure de formulation de membranes de chitosan et d'alginate dans une plaque de 24 puits a été employée pour la formulation de membranes β CD-chitosan (DS = 19 %)/alginate dans ce même type de plaque, en ajustant simplement la quantité de β CD-chitosan utilisée, toujours pour compenser les charges rendues indisponibles par la fonctionnalisation avec la cyclodextrine. Des membranes aux dimensions similaires à celles des mêmes membranes à partir de chitosan non fonctionnalisé ont alors été obtenues (Figure 75).



Figure 75 : Membrane de β CD-chitosan et d'alginate préparée par sédimentation et évaporation dans une plaque de 24 puits.

A nouveau, les images MEB (**Figure 76**) montrent une porosité importante au sein des matériaux obtenus, avec des indices d'interconnexions entre les pores.

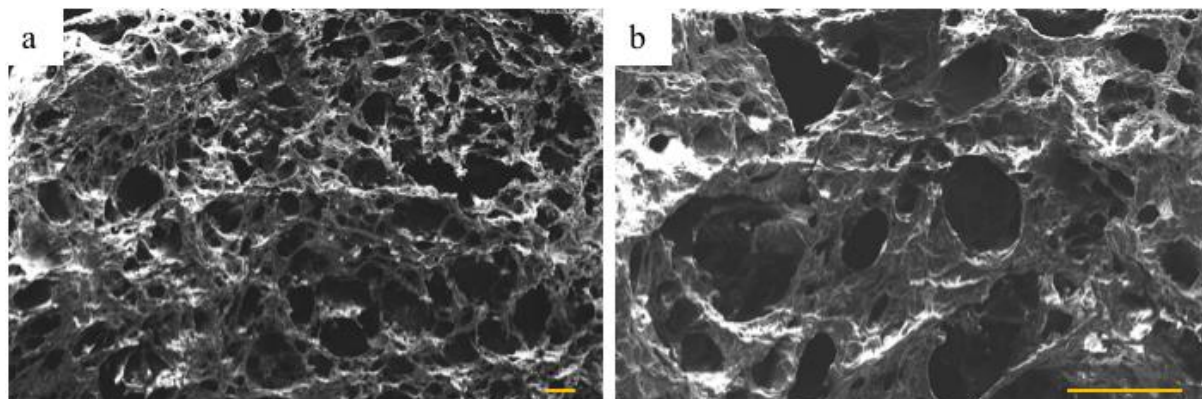


Figure 76 : Images MEB d'une membrane β CD-chitosan/alginate préparée par sédimentation et évaporation dans une plaque de 24 puits (grossissement de a) $\times 50$ et b) $\times 200$). Échelles = 200 μ m.

Ainsi, tout comme dans le cas des membranes préparées dans des plaques de 12 puits, la fonctionnalisation du chitosan par la β -cyclodextrine n'influence pas les dimensions et la microstructure des membranes préparées dans des plaques de 24 puits.

Des membranes à base de chitosan, de β CD-chitosan et d'alginate peuvent donc être formulées selon la méthode développée. Les dimensions des membranes (principalement leur diamètre) peuvent alors être facilement ajustées en utilisant des puits de dimensions différentes et en faisant varier les quantités de polymères. Le matériau peut alors être façonné en fonction de l'application finale envisagée. Dans tous les cas, il en résulte des membranes présentant une porosité importante, avec de possibles interconnexions entre les pores. De manière intéressante, les membranes chitosan/alginate formulées par Costa *et al.*,⁹⁷ dont la

méthode a inspiré celle développée ici, ne présentaient aucune porosité. La méthode développée dans le cadre de cette thèse permet donc l'obtention de membranes chitosan/alginate aux caractéristiques microporeuses propres, d'un très grand intérêt au vu de la très grande surface de contact qu'elles offrent.

V. Conclusion partielle

Des Complexes de Polyélectrolytes Compacts ont été préparés à partir de chitosan et d'alginate de sodium fonctionnalisés par la β -cyclodextrine.

Ces CoPEC ont tout d'abord été formulés par ultracentrifugation en présence de sel et ont été obtenus sous la forme de matériaux compacts, comparables d'aspect au CoPEC chitosan/alginate précédemment formulé au laboratoire. Le CoPEC fonctionnalisé le plus prometteur, c'est-à-dire le CoPEC β CD-chitosan/alginate, a alors été caractérisé de manière approfondie. Sa composition exacte a ainsi été déterminée et sa microstructure a été observée en microscopie électronique à balayage et comparée à celle d'un CoPEC chitosan/alginate non fonctionnalisé. Il a été montré que la fonctionnalisation du chitosan par la cyclodextrine n'a pas d'impact significatif sur la microstructure homogène et non poreuse du matériau final, qui est alors comparable à celle du CoPEC chitosan/alginate.

Afin d'augmenter la surface de contact des matériaux développés pour améliorer leurs propriétés, une méthode de préparation de CoPEC poreux, basée sur l'utilisation de microparticules de carbonate de calcium en tant qu'éléments porogènes, a été développée et optimisée. Cette méthode permet d'induire une microporosité dans les matériaux, fonctionnalisés ou non par la cyclodextrine et cette porosité peut être simplement contrôlée en modulant la quantité de particules porogènes utilisées. Des microparticules microporeuses de CoPEC chitosan/alginate fonctionnalisé ou non ont également été obtenues en ajustant cette méthode développée.

Enfin, des CoPEC à base de chitosan et d'alginate, fonctionnalisés ou non par la β -cyclodextrine, ont été formulés selon une méthode de sédimentation et évaporation. Cette méthode a permis l'obtention de matériaux sous la forme de membranes et il a été montré que les dimensions, et notamment le diamètre, de ces matériaux pouvaient être contrôlées en faisant varier la taille des puits dans lesquels elles sont préparées. La microstructure des membranes ainsi obtenues a alors été observée en microscopie électronique à balayage. Les observations ont permis de conclure à un caractère intrinsèquement poreux de ces membranes, avec des indices laissant présumer des interconnexions entre les différents pores en profondeur dans les membranes. Ces dernières paraissent alors très intéressantes pour le domaine biomédical, dans lequel des membranes à forte porosité sont très prisées car elles permettent notamment de proposer une surface de contact très importante et adaptée à la colonisation par de nombreux types de cellules.

Ces divers travaux ont alors permis l'obtention de matériaux fonctionnels à base de chitosan et d'alginate, sous différentes formes et avec des microstructures variables et contrôlables, qui ont par la suite été étudiés en termes d'applications, en particulier à des fins thérapeutiques.

VI. Partie expérimentale

VI. 1. Généralités

La formation des complexes de polyélectrolytes a été effectuée *via* une pompe péristaltique ISMATEC IPC de chez Cole-Parmer (Vernon Hills, IL).

Les centrifugations ont été effectuées sur une centrifugeuse 4K15 munie d'un rotor 12169H de chez Sigma et les ultracentrifugations sur une ultracentrifugeuse Optima™ L-90K munie d'un rotor Type 90 Ti et dans des tubes d'ultracentrifugation de chez Beckman Coulter (Brea, CA).

Les lyophilisations étaient effectuées sur des lyophilisateurs Alpha 1-2 LD de chez Bioblock Scientific ou Flexi-Dry de chez FTS Systems.

Le tamis de maille 300 µm était de chez CISA et celui de maille 63 µm provenait de chez Retsch.

Les observations en Microscopie Électronique à Balayage ont été effectuées sur un Quanta™ 250 FEG de FEI Company (Eindhoven, Pays-Bas).

Les plaques de culture à 12 puits (Falcon™) étaient de chez Corning (Corning, NY) et les plaques de culture à 24 puits étaient de chez Orange Scientific (Braine-l'Alleud, Belgique).

L'isothiocyanate de rhodamine B (mélange d'isomères), provenait de chez Sigma-Aldrich et les microparticules de carbonate de calcium utilisées pour la formulation des CoPEC poreux, d'une taille ≤ 30 µm, étaient de chez Sigma-Aldrich.

VI. 2. Préparation de CoPEC à base de chitosan et d'alginate par ultracentrifugation

VI. 2. 1. Préparation de CoPEC chitosan/alginate par ultracentrifugation

300 mg (1,5 mmol d'unités de répétition) d'alginate de sodium sont tout d'abord dissous dans 240 mL d'eau ultrapure (concentration de 1,25 mg/mL, pHi = 6,8). Le pH de la solution est ajusté à 6,5 par ajout de CH₃COOH 0,1 M aqueux puis 24,8 g (0,24 mol) de NaBr sont dissous dans la solution (concentration finale en sel de 1 M). 300 mg (1,9 mmol d'unités de répétition) de chitosan sont dissous dans 240 mL d'eau ultrapure auxquels sont ajoutés

450 μL de CH_3COOH permettant la protonation des unités de chitosan et favorisant ainsi sa dissolution ($\text{pH}_i = 3,9$). Le pH de la solution est ajusté à 4,5 par ajout de NaOH 6 M aqueux puis 24,8 g (0,24 mol) de NaBr sont dissous dans la solution (concentration finale en sel de 1 M).

Les deux solutions sont ensuite mélangées *via* une pompe péristaltique (débit = 100 mL/min). La combinaison ainsi obtenue est agitée à 200 tours/min afin d'obtenir une suspension de complexes de polyélectrolytes qui est ensuite transférée dans des tubes de centrifugation en propylène. La suspension est alors centrifugée à 9 400 g pendant 15 minutes à 20 °C. Les complexes ainsi pré-compactés sont finalement transférés dans des tubes d'ultracentrifugation avec du surnageant puis ultracentrifugés à 308 000 g et 23 °C pendant 12 h afin d'obtenir le CoPEC.

Avant d'utiliser le CoPEC ainsi obtenu, celui-ci est tout d'abord lavé pendant 48 h dans du PBS 1X (renouvelé une fois).

VI. 2. 2. Préparation de CoPEC chitosan/ β CD-alginate par ultracentrifugation

500 mg de β CD-alginate sont tout d'abord dissous dans 100 mL d'eau ultrapure (concentration de 5 mg/mL) avec 100 μL de CH_3COOH . 41,2 g (0,4 mol) de NaBr sont dissous dans la solution (concentration finale en sel de 4 M). 500 mg (3,1 mmol d'unités de répétition) de chitosan sont dissous dans 100 mL d'eau ultrapure auxquels sont ajoutés 750 μL de CH_3COOH . Le pH de la solution est ajusté à 4,5 puis 41,2 g (0,4 mol) de NaBr sont dissous dans la solution (concentration finale en sel de 4 M).

Les deux solutions sont ensuite mélangées *via* une pompe péristaltique (débit = 100 mL/min). La combinaison ainsi obtenue est agitée à 200 tours/min afin d'obtenir une suspension de complexes de polyélectrolytes qui est ensuite transférée dans des tubes de centrifugation en propylène. La suspension est alors centrifugée à 9 400 g pendant 15 minutes à 25 °C. Les complexes ainsi pré-compactés sont finalement transférés dans des tubes d'ultracentrifugation avec du surnageant puis ultracentrifugés à 308 000 g et 25 °C pendant 12 h afin d'obtenir le CoPEC.

VI. 2. 3. Préparation de CoPEC β CD-chitosan/ β CD-alginate par ultracentrifugation

Le CoPEC β CD-chitosan/ β CD-alginate a été préparé selon une procédure similaire à celle de préparation du CoPEC chitosan/alginate.

VI. 2. 4. Préparation de CoPEC β CD-chitosan/alginate par ultracentrifugation

Les CoPEC β CD-chitosan/alginate, préparés à partir des deux lots de β CD-chitosan synthétisés (avec des degrés de substitution de 19 et 25 %) ont été formulés en suivant la même procédure que lors de la formulation du CoPEC chitosan/alginate mais en ajustant la masse de β CD-chitosan utilisée afin de garder une quantité équivalente de groupements ioniques malgré le greffage de la cyclodextrine.

VI. 3. Préparation de microparticules de CoPEC

Après lavage, le CoPEC est lyophilisé, broyé à l'aide d'un pilon-mortier et tamisé sur un tamis de maille 300 μm puis éventuellement sur un tamis de maille 63 μm afin de calibrer les microparticules entre 63 et 300 μm .

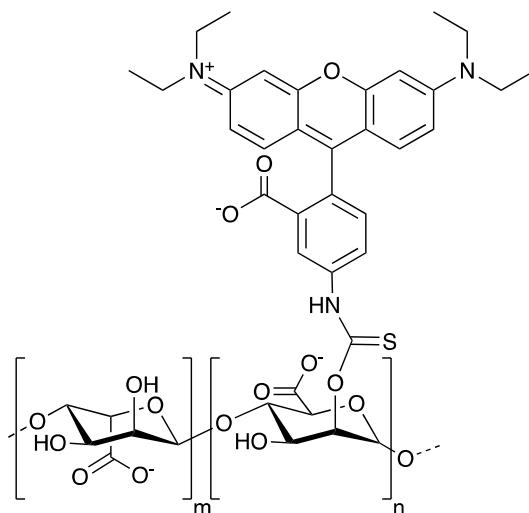
VI. 4. Préparation des échantillons pour les observations au MEB

Pour les observations MEB des matériaux bruts, après lavage, une tranche de CoPEC est coupée au scalpel afin d'avoir une coupe interne du matériau, puis cette tranche est lyophilisée. Une partie du CoPEC présentant la surface de celui-ci est également lyophilisée. L'intérieur et la surface du matériau sont alors observés au MEB.

Concernant l'observation MEB des particules et des membranes, celles-ci sont directement observées après séchage, sans découpe particulière.

VI. 5. Détermination de la composition du CoPEC β CD-chitosan/alginate

VI. 5. 1. Synthèse de l'alginate-rhodamine



300 mg (1,5 mmol d'unités de répétition, 1 éq) d'alginate de sodium sont dissous dans 15 mL d'eau ultrapure et le pH de la solution est ajusté à 8 par ajout de NaOH 1 M aqueuse et de CH₃COOH 1 M aqueux. 20 mg (0,04 mmol, 0,03 éq) d'isothiocyanate de rhodamine B (mélange d'isomères) sont dissous dans 8 mL de DMSO puis la solution obtenue est introduite goutte à goutte dans la solution d'alginate. Le mélange est agité pendant 1 h à 40 °C puis la réaction est arrêtée par ajout de 5,35 g (0,1 mol) de chlorure d'ammonium dans le milieu réactionnel. La solution est alors dialysée dans une membrane avec un seuil de rétention des molécules de 12-14 000 Da contre une solution aqueuse de NaCl à 0,05 M puis contre de l'eau ultrapure jusqu'à ne plus détecter de fluorescence significative (mesurée par spectrophotométrie avec $\lambda_{\text{Exc}} = 543 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{Em}} = 400\text{-}700 \text{ nm}$) dans le milieu de dialyse. 264 mg de **7** sont alors isolés par lyophilisation.

DS : 0,7 % (déterminé par absorbance à 560 nm dans du tampon phosphate pH 8 en établissant une courbe standard).

VI. 5. 2. Préparation de CoPEC β CD-chitosan/alginate-rhodamine

Le CoPEC β CD-chitosan/alginate-rhodamine est préparé en suivant la même procédure et les mêmes proportions que pour la formulation du CoPEC β CD-chitosan/alginate.

VI. 5. 3. Détermination de la quantité d'alginate non incluse dans le CoPEC final

La quantité d'alginate se retrouvant dans le surnageant avant ultracentrifugation (donc la quantité d'alginate non présente dans le matériau final) est déterminée par spectrophotométrie UV-Visible à 560 nm en construisant une courbe standard à partir de solutions d'alginate-rhodamine dans du tampon phosphate pH 8.

VI. 6. Préparation de CoPEC bruts poreux à base de chitosan et d'alginate

VI. 6. 1. Préparation de CoPEC brut chitosan/alginate poreux

Les CoPEC chitosan/alginate poreux sont formulés suivant un protocole similaire à celui permettant de formuler les CoPEC chitosan/alginate avec quelques modifications.

La solution d'alginate est préparée de la même manière que dans le cas du CoPEC non poreux. Concernant la solution de chitosan, le pH n'est pas ajusté après mise en solution du polymère. Après l'ajout du NaBr (1M), des particules de carbonate de calcium (quantité variable selon les expériences) sont suspendues dans la solution et la suspension est agitée jusqu'à un pH de 5,5 – 6. De la même manière qu'en VI. 2. 1., les solutions de polyélectrolytes sont mélangées à la pompe péristaltique mais dans ce cas la solution de chitosan est maintenue sous agitation durant le mélange afin d'assurer une répartition homogène des particules de carbonate dans le matériau final. La centrifugation et l'ultracentrifugation des complexes sont effectuées dans les mêmes conditions qu'en VI. 2. 1. Après ultracentrifugation, le matériau obtenu est immergé dans une solution permettant la dissolution des particules de carbonate (soit une solution d'EDTA 0,1 M à pH 5 soit une solution saline acide de 1 M de NaBr en HCl à pH 1) qui est régulièrement renouvelée. Après dissolution des particules, le CoPEC est lavé dans du PBS 1X (renouvelé une fois).

VI. 6. 2. Préparation de CoPEC brut β CD-chitosan/alginate poreux

Le CoPEC β CD-chitosan/alginate poreux a été préparé de la même manière que dans le cas du CoPEC β CD-chitosan/alginate non poreux avec les mêmes modifications évoquées en VI. 6. 1. Il est dans ce cas préparé avec un ratio massique polyélectrolytes : CaCO_3 de 1 : 5 et les particules de carbonate sont dissoutes dans une solution saline acide de 1 M NaBr en HCl à pH 1 jusqu'à ne plus observer de dégagement gazeux significatif.

VI. 7. Préparation de microparticules poreuses de CoPEC

Les particules de CoPEC poreuses sont préparées avec un ratio massique polyélectrolytes : CaCO_3 de 1 : 5 suivant les procédures décrites en VI. 6. 1. et VI. 6. 2. jusqu'à l'ultracentrifugation. Après ultracentrifugation, les matériaux obtenus, contenant alors des particules de carbonate de calcium, sont lyophilisés puis broyés et tamisés entre 63 et 300 μm . Les particules sont ensuite placées dans une solution EtOH/HCl 9,52 : 1 v/v qui est régulièrement renouvelée jusqu'à ne plus distinguer de dégagement gazeux provenant des particules. Les particules sont isolées par filtration, lavées à l'EtOH puis séchées pendant 24 h à l'étuve (37 °C).

VI. 8. Préparation de membranes de CoPEC à base de chitosan et d'alginate par sédimentation et évaporation

VI. 8. 1. Préparation de membranes chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate par sédimentation et évaporation dans une plaque de 12 puits

Pour les membranes chitosan/alginate, 50 mg (0,25 mmol d'unités de répétition) d'alginate de sodium sont dissous dans 40 mL d'eau ultrapure. Le pH de la solution est fixé à 6,5 par ajout de CH_3COOH 0,1 M aqueux puis 4,1 g (0,04 mol) de NaBr sont introduits (concentration en sel de 1 M). 40 mg (0,25 mmol d'unités de répétition) de chitosan sont dissous dans 40 mL d'eau ultrapure et 75 μL de CH_3COOH sont introduits pour protoner et donc dissoudre le chitosan. Le pH de la solution est ajusté à 4,5 par ajout de NaOH 6 M aqueuse puis 4,1 g (0,04 mol) de NaBr sont introduits (concentration en sel de 1 M).

Les deux solutions sont ensuite mélangées *via* une pompe péristaltique (débit = 100 mL/min). La combinaison ainsi obtenue est agitée à 200 tours/min afin d'obtenir une suspension de complexes de polyélectrolytes qui est ensuite transférée dans des tubes de centrifugation en propylène. La suspension est centrifugée à 9 400 g pendant 15 minutes à 20 °C. Les culots de complexes de polyélectrolytes compactés sont alors re-suspendus dans 7 mL de surnageant puis la suspension est versée dans un puits de plaque de culture à 12 puits. La plaque est placée à l'étuve (37 °C) pendant 7 jours pour que le surnageant s'évapore.

Une fois le surnageant évaporé, la membrane obtenue est lavée pendant 28 h dans 7 mL d'eau ultrapure qui sont renouvelés une fois. La membrane est finalement séchée à l'étuve (37 °C) pendant 20 h.

Cette procédure est également utilisée pour la préparation d'une membrane β CD-chitosan/alginate en plaque de 12 puits à la différence que la masse de β CD-chitosan est ajustée afin d'avoir un nombre équivalent de charges malgré la présence de cyclodextrines.

VI. 8. 2. Préparation de membranes chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate par sédimentation et évaporation dans une plaque de 24 puits

Pour les membranes chitosan/alginate, 20 mg (0,10 mmol d'unités de répétition) d'alginate de sodium sont dissous dans 16 mL d'eau ultrapure. Le pH de la solution est fixé à 6,5 par ajout de CH_3COOH 0,1 M aqueux puis 1,65 g (0,016 mol) de NaBr est introduit (concentration en sel de 1 M). 16 mg (0,10 mmol d'unités de répétition) de chitosan sont dissous dans 16 mL d'eau ultrapure et 30 μL de CH_3COOH sont introduits pour protoner et donc dissoudre le chitosan. Le pH de la solution est ajusté à 4,5 par ajout de NaOH 6 M aqueuse puis 1,65 g (0,016 mol) de NaBr est introduit (concentration en sel de 1 M).

Les deux solutions sont ensuite mélangées *via* une pompe péristaltique (débit = 100 mL/min). La combinaison ainsi obtenue est agitée à 200 tours/min afin d'obtenir une suspension de complexes de polyélectrolytes qui est ensuite transférée dans des tubes de centrifugation en propylène. La suspension est centrifugée à 9 400 g pendant 15 minutes à 20 °C. Les culots de complexes de polyélectrolytes compactés sont alors re-suspendus dans 3 mL de surnageant puis la suspension est versée dans un puits de plaque de culture de 24 puits. La plaque est placée à l'étuve (37 °C) pendant 7 jours pour évaporer le surnageant.

Une fois le surnageant évaporé, la membrane obtenue est lavée pendant 24 h dans 3 mL d'eau ultrapure qui sont renouvelés une fois. La membrane est finalement séchée à l'étuve (37 °C) pendant 4 jours.

Cette procédure est également utilisée pour la préparation de membranes β CD-chitosan/alginate en plaque de 24 puits à la différence que la masse de β CD-chitosan est ajustée afin d'avoir un nombre équivalent de charges malgré la présence de cyclodextrines.

***Chapitre 4 : Premières évaluations
biologiques de l'effet des CoPEC à base de
chitosan et d'alginate fonctionnalisés avec la
 β -cyclodextrine***

L'inflammation aiguë est un phénomène biologique très important et indispensable à la mise en place de toute réponse immunitaire. Néanmoins, lorsqu'elle n'est pas contrôlée par l'organisme et devient chronique, elle peut être la source de nombreuses maladies devenues communes telles que la polyarthrite rhumatoïde, l'arthrose ou encore la maladie de Crohn. Il est de plus maintenant connu que l'inflammation chronique joue un rôle prépondérant dans le développement du cancer en favorisant la progression des tumeurs.³⁰⁶ Ainsi, le développement de systèmes dotés de propriétés anti-inflammatoires est un sujet de recherche d'actualité. En particulier, des biomatériaux aux propriétés anti-inflammatoires sont très attractifs dans ce domaine.

Dans nos travaux, les divers CoPEC à base de chitosan, d'alginate, de β CD-chitosan et de β CD-alginate formulés par ultracentrifugation ont été étudiés *in vitro* dans un modèle d'inflammation impliquant des macrophages activés par le lipopolysaccharide (LPS). Les CoPEC chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate ont alors montré des propriétés anti-inflammatoires intrinsèques, d'une part en diminuant la production d'oxyde nitrique (NO) et de cytokine pro-inflammatoire TNF- α par les macrophages activés et d'autre part en diminuant l'expression du marqueur d'activation CD40 par ces cellules et en « restaurant » la prolifération cellulaire.

Deux anti-inflammatoires, le piroxicam et la prednisolone, ont été inclus avec succès dans les CoPEC chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate, avec une inclusion plus importante dans le matériau contenant des cyclodextrines. L'impact de l'inclusion de ces substances actives sur l'effet des matériaux a alors été étudié à nouveau dans le modèle d'inflammation *in vitro* utilisé.

La présence de cyclodextrines dans les matériaux ne permettant que l'inclusion de molécules hydrophobes dans ces derniers, une stratégie d'inclusion de tout type de molécule, en particulier de molécules hydrophiles, a enfin été mise en place afin d'élargir les domaines thérapeutiques d'application des matériaux développés. Des molécules à base d'adamantane, formant un complexe d'inclusion avec la β -cyclodextrine, contenant une fonction maléimide, réactive notamment vis-à-vis de molécules contenant des groupements thiol, ont été incluses dans des membranes à base d'alginate et de chitosan fonctionnalisés ou non par la β -cyclodextrine. Une molécule fluorescente de rhodamine contenant une fonction thiol a alors été mise au contact des matériaux obtenus, permettant de valider la nouvelle stratégie d'inclusion dans le cas de la membrane contenant la β -cyclodextrine.

Dans ce chapitre, après une introduction sur l'inflammation, les différentes évaluations menées sur les matériaux formulés au cours de ces travaux de thèse seront développées.

I. L'inflammation

I. 1. Le déroulement de la réponse inflammatoire

Lors d'une agression du corps humain, par exemple lorsque certains pathogènes passent les premières barrières de l'anté-immunité et pénètrent les tissus ou lorsque les tissus sont endommagés, une réaction inflammatoire, caractérisée par une rougeur, une douleur, de la chaleur et un gonflement des tissus, se met en place. Cette réaction a pour buts principaux la limitation de la dissémination des pathogènes dans les tissus, l'initiation des différentes réponses immunitaires et la réparation tissulaire.³⁰⁷

La réponse inflammatoire se met en place en suivant plusieurs étapes :

- Les cellules de l'immunité innée (l'immunité présente dès la naissance, qui ne nécessite pas d'apprentissage) résidant dans les tissus, c'est-à-dire les macrophages, les mastocytes et les cellules dendritiques, reconnaissent, *via* leurs récepteurs, certains motifs moléculaires associés aux micro-organismes (appelés MAMP pour "Microbial-Associated Molecular Pattern") ou aux dommages cellulaires (appelés DAMP pour "Damage-Associated Molecular Pattern") ;
- Les macrophages et mastocytes ayant reconnu les MAMP et/ou les DAMP produisent ensuite divers médiateurs chimiques permettant d'augmenter le diamètre des vaisseaux sanguins proches du site de l'inflammation, on parle alors de vasodilatation, ce qui provoque une augmentation du flux sanguin dans cette zone ;
- Une perte d'étanchéité entre les cellules endothéliales provoque également la fuite de liquide vasculaire véhiculant, entre autres, des médiateurs solubles de l'inflammation. Cette perte d'étanchéité favorise alors l'extravasation, c'est-à-dire le passage des leucocytes (ou globules blancs) du sang jusqu'au tissu qui est induit par les facteurs chimiotactiques produits par les macrophages et les mastocytes ainsi que par les molécules d'adhésions exprimées par les cellules endothéliales. Cette extravasation a pour but le recrutement tout d'abord de granulocytes neutrophiles circulants, dont les fonctions principales sont la phagocytose et la destruction des pathogènes extracellulaires ou des débris cellulaires, puis de monocytes se différenciant ultérieurement en nouveaux macrophages ;

- Les médiateurs produits par les macrophages provoquent la coagulation menant à la formation d'un caillot sanguin local prêt du site d'inflammation, ce qui a pour effet de limiter la dissémination des pathogènes dans l'organisme ;
- Les macrophages sécrètent également des facteurs de croissance des fibroblastes, qui sont des cellules sécrétant des composants de la matrice extracellulaire, ce qui permet donc de réparer les tissus lésés lors de l'agression.³⁰⁷

I. 2. Les médiateurs de la réponse inflammatoire

Comme évoqué en I. 1., divers médiateurs solubles de l'inflammation sont impliqués dans la réponse inflammatoire. Ces médiateurs peuvent être classés en trois catégories, les médiateurs produits par les pathogènes, les protéines du plasma et les médiateurs produits par les leucocytes, et ont des fonctions spécifiques dans le processus inflammatoire.³⁰⁷

I. 2. 1. Les médiateurs de l'inflammation produits par les pathogènes

Les pathogènes impliqués dans l'agression de l'organisme produisent eux-mêmes divers MAMP tels que le lipopolysaccharide bactérien (LPS) ou les peptides formylés. Ces MAMP produits par les pathogènes activent alors les macrophages et les mastocytes et ils activent également la cascade du complément par les voies alterne et de la lectine.

I. 2. 2. Les protéines du plasma

Plusieurs protéines du plasma jouent un rôle dans trois systèmes impliqués dans la réponse inflammatoire : la coagulation, le complément et le système des kinines.

I. 2. 2. 1. Les protéines impliquées dans la coagulation

Trois protéines sont impliquées dans le phénomène de coagulation ayant lieu lors de l'inflammation. La thrombine active les cellules endothéliales et provoque ainsi l'expression des molécules d'adhésion facilitant l'entrée des leucocytes sur le lieu de l'inflammation. La fibrine crée un réseau fibreux permettant le piégeage des pathogènes. La plasmine, quant à elle, clive la fibrine et évite alors l'expansion incontrôlée du caillot sanguin formé.

I. 2. 2. 2. Les protéines du système du complément

Le système du complément est constitué de plus de 30 protéines présentes soit comme protéines solubles dans le sang, soit comme protéines liées aux membranes. Son activation mène à une cascade séquentielle de réactions enzymatiques provoquant la formation d'anaphylatoxines C3a et C5a engendrant plusieurs réponses physiologiques allant de la chémoattraction à l'apoptose.³⁰⁸

Deux protéines, à savoir le facteur XII de Hageman et la plasmine, permettent l'activation du système du complément. Cette activation permet notamment la destruction par voie lytique du pathogène impliqué dans l'agression menant à l'inflammation.

I. 2. 2. 3. Les protéines impliquées dans le système des kinines

Le système des kinines est composé de kininogènes, en tant que substrats, et de plasma. Les kininogènes sont responsables de la production de la bradykinine et de la kallidine, deux peptides vasoactifs.³⁰⁹

Au sein de ce système, la kallikréine plasmatique permet le clivage des kininogènes inactifs en kinines actives.

I. 2. 3. Les médiateurs de l'inflammation produits par les leucocytes

Les macrophages qui sont activés lors de l'inflammation produisent (i) des chimiokines, permettant d'attirer des leucocytes, (ii) des leucotriènes et (iii) des prostaglandines, qui favorisent l'activation des cellules endothéliales. Ils sécrètent également des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-1 ou encore l'IL-6 qui peuvent mener à la production de protéines impliquées dans la phase aiguë de l'inflammation telles que la pentraxine ou la ficoline. Ces cytokines pro-inflammatoires mènent également à l'expression de la NO synthase inductible chez de nombreuses cellules telles que les monocytes/macrophages, ce qui engendre une synthèse de très grandes quantités d'oxyde nitrique (excédant alors jusqu'à mille fois la production de NO physiologique).³¹⁰

Les mastocytes, qui sont quant à eux activés par le C5a du système du complément évoqué précédemment, sont pour leur part à l'origine de la production d'histamine, une amine

biogène vasoactive également connue pour son rôle dans l'allergie, et également de leucotriènes et de prostaglandines.

Enfin, les plaquettes produisent le facteur d'activation plaquettaire (PAF) qui recrute d'autres leucocytes sur les lieux de l'inflammation.

Ces divers médiateurs représentent autant de marqueurs de l'inflammation qui peuvent être étudiés dans le cadre de l'évaluation de l'effet de médicaments et de biomatériaux sur la réponse inflammatoire.

La réponse inflammatoire peut être illustrée selon la **Figure 77**.

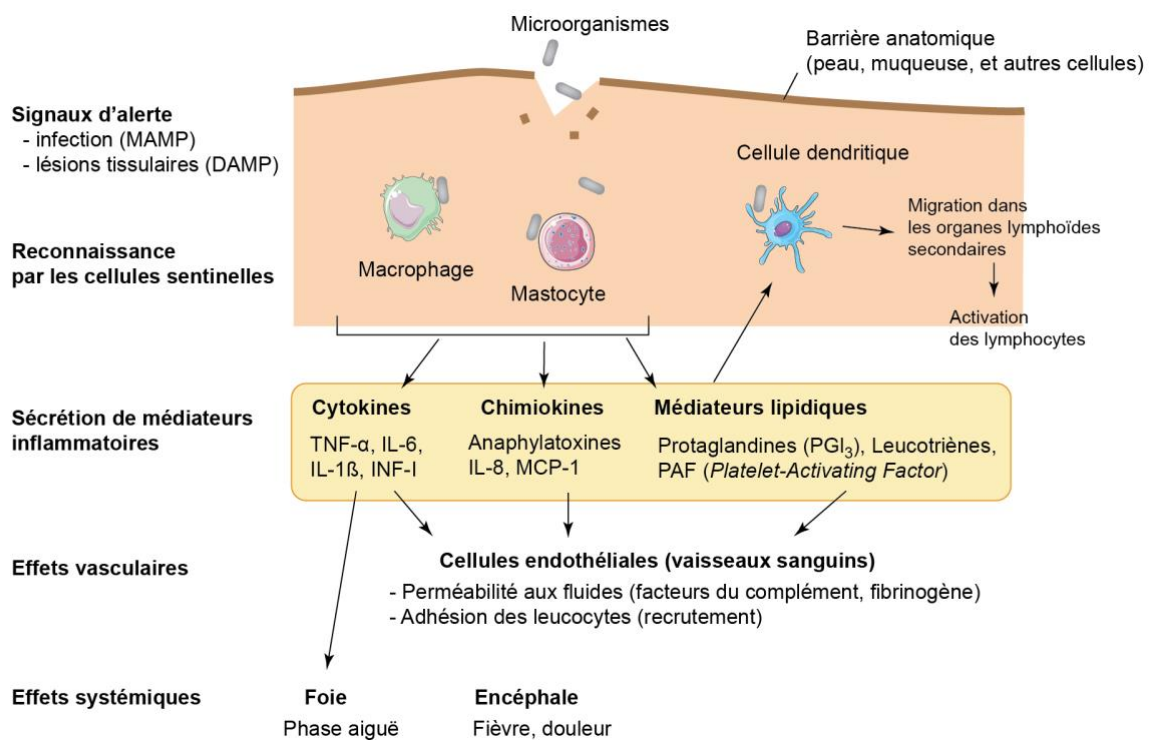


Figure 77 : Illustration de la réponse inflammatoire.

La réponse inflammatoire est ainsi un processus précieux permettant à l'organisme de réagir vis-à-vis d'une agression ou d'une lésion. Cependant, l'inflammation peut endommager des cellules et tissus sains avoisinant le lieu initial de l'agression. Cet endommagement indésirable, stimulant alors davantage la réponse inflammatoire, peut alors mener à une inflammation incontrôlée dite "chronique" pouvant elle-même conduire à des défaillances des organes.³¹¹ C'est la raison pour laquelle de nombreux traitements anti-inflammatoires innovants ont été, et sont toujours, mis au point par la communauté scientifique.

Parmi ces traitements, de nombreux biomatériaux présentant un effet anti-inflammatoire ont été développés. La plupart de ces matériaux présentent alors un effet anti-inflammatoire car ils contiennent et relarguent des substances actives³¹²⁻³¹⁶ et seuls quelques-uns présentent intrinsèquement des propriétés permettant l'atténuation de l'inflammation. Parmi ces derniers biomatériaux peuvent être cités les nanoparticules d'argent³¹⁷⁻³¹⁹ et d'oxyde de cérium^{320, 321} ainsi que quelques hydrogels à base de *N*-acryloyl glycinamide³²² ou d'acide hyaluronique.³²³ Ainsi, le développement de biomatériaux présentant des propriétés anti-inflammatoires, en particulier intrinsèques, semble de nos jours d'une grande importance et c'est dans ce contexte que les matériaux développés au cours de cette thèse ont été tout particulièrement étudiés dans le cadre de l'inflammation.

II. Évaluation *in vitro* de l'impact des CoPEC à base de chitosan et d'alginate sur l'inflammation

II. 1. Démonstration de l'effet pro-inflammatoire des CoPEC contenant du β CD-alginate lors de tests *in vitro* préliminaires

Différents tests biologiques préliminaires ont été effectués dans les premiers temps du projet concernant les CoPEC contenant de la β -cyclodextrine. Au cours de ces tests préliminaires, des macrophages (cellules RAW 264.7) non activés ont été traités pendant 24 h avec des microparticules de CoPEC. Les surnageants ont ensuite été prélevés et divers dosages ont été effectués sur ces derniers, notamment des dosages des cytokines pro-inflammatoires TNF- α et IL-6.

Ces dosages ont été effectués *via* un test ELISA (**Figure 78**). Au cours de ce test, un anticorps spécifique à la cytokine dosée, appelé anticorps de capture, est fixé au support (une plaque de 96 puits à fonds plats) puis les sites non-spécifiques sont bloqués par de la BSA. Ces anticorps sont ensuite incubés avec la cytokine d'intérêt afin que celle-ci se fixe dessus. Un anticorps de détection, également propre à la cytokine et portant de la biotine, est ensuite ajouté et il se fixe alors sur les cytokines elles-mêmes fixées sur les anticorps de capture. De l'avidine-HRP est ensuite ajoutée, l'avidine se fixant sur la biotine. Enfin, le substrat, c'est-à-dire le TMB, est ajouté. Ce-dernier, en présence d'eau oxygénée, s'oxyde *via* l'HRP, formant

un produit absorbant à 450 nm qui peut alors être quantifié par spectrophotométrie UV-Visible.

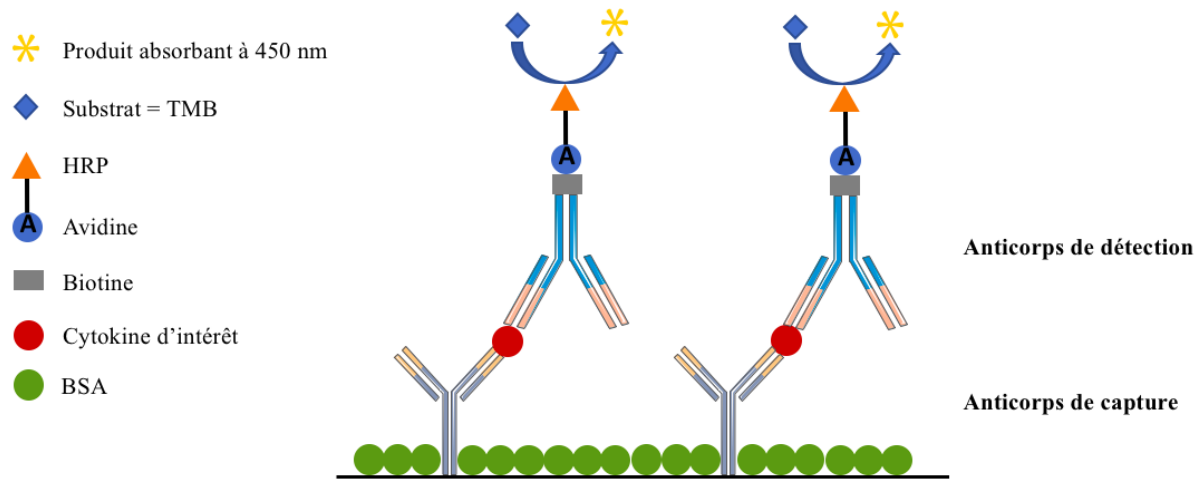


Figure 78 : Schématisation de la quantification d'une cytokine d'intérêt par test ELISA.

Au cours de ces essais préliminaires, il a rapidement été constaté que les CoPEC contenant du β CD-alginate, c'est-à-dire les CoPEC chitosan/ β CD-alginate et β CD-chitosan/ β CD-alginate, induisaient une production non négligeable de cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF- α par les macrophages non activés (**Figure 79**, **Figure 80** et **Figure 81**).

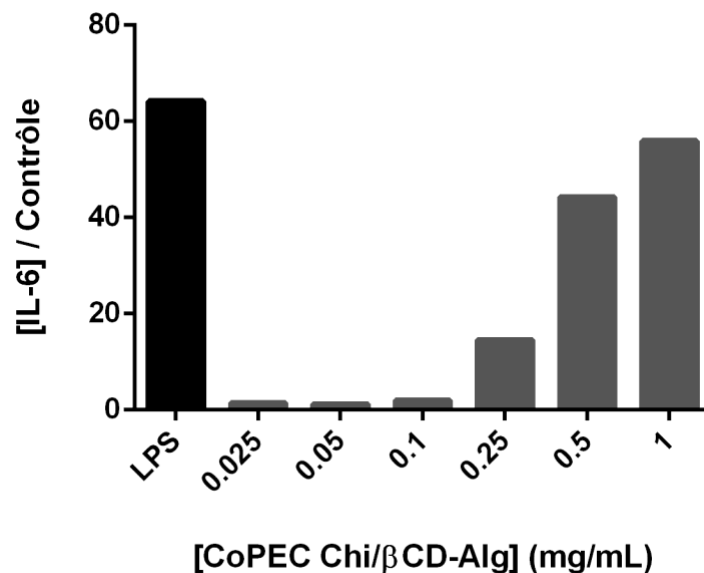


Figure 79 : Concentrations en IL-6 mesurées par test ELISA ($n = 1$) dans les surnageants de cellules RAW 264.7 traitées avec des microparticules de CoPEC chitosan/ β CD-alginate, par rapport à la concentration mesurée dans les surnageants de cellules RAW 264.7 non traitées.

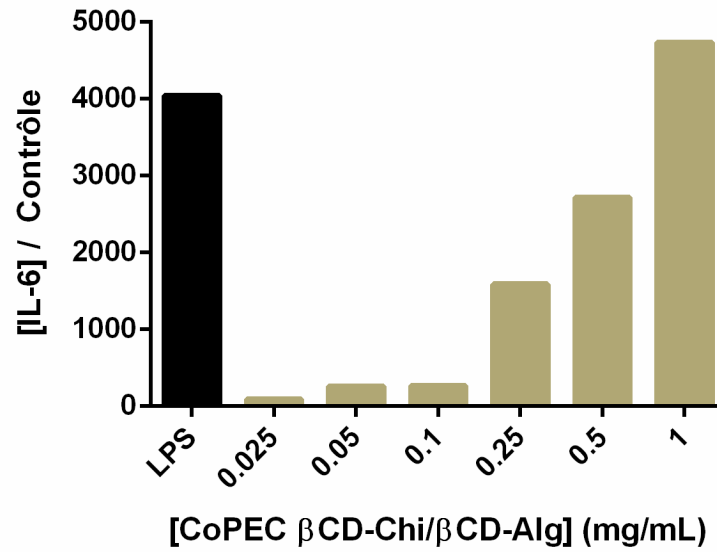


Figure 80 : Concentrations en IL-6 mesurées par test ELISA ($n = 1$) dans les surnageants de cellules RAW 264.7 traitées avec des microparticules de CoPEC β CD-chitosan/ β CD-alginate, par rapport à la concentration mesurée dans les surnageants de cellules RAW 264.7 non traitées.

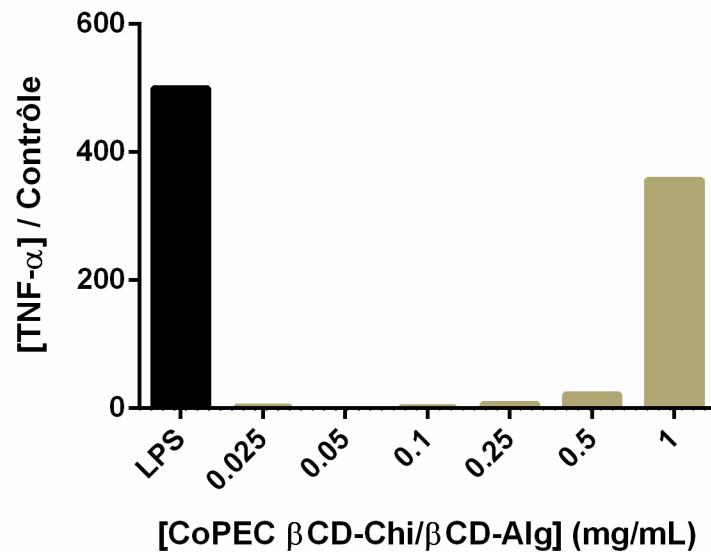


Figure 81 : Concentrations en TNF- α mesurées par test ELISA ($n = 1$) dans les surnageants de cellules RAW 264.7 traitées avec des microparticules de CoPEC β CD-chitosan/ β CD-alginate, par rapport à la concentration mesurée dans les surnageants de cellules RAW 264.7 non traitées.

Cette induction de production de cytokines pro-inflammatoires par des macrophages non activés est un indice d'un effet pro-inflammatoire de ces CoPEC. Cet effet pro-inflammatoire n'étant de manière évidente pas compatible avec une utilisation de ces CoPEC

dans le traitement de l'inflammation, les CoPEC contenant du β CD-alginate n'ont pas été pris en compte pour les différentes études approfondies réalisées au cours de cette thèse.

II. 2. Évaluation biologique des CoPEC chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate

II. 2. 1. Modèle *in vitro* d'évaluation des propriétés anti-inflammatoires des matériaux à base d'associations chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate

Au cours de cette thèse, afin d'évaluer l'effet des CoPEC chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate sur l'inflammation, les macrophages (cellules RAW 264.7) étaient placés au contact de suspensions de microparticules de CoPEC de concentrations allant de 0,0677 à 2,2 mg/mL pendant 24 h à 37 °C. Les cellules étaient ensuite activées par du lipopolysaccharide pendant 24 h à 37 °C, puis les surnageants étaient récupérés pour des dosages et éventuellement les cellules pour des études de cytométrie en flux. Le LPS est le composant moléculaire majeur de la membrane externe des bactéries Gram négatif. Il sert de barrière physiologique protectrice pour ces bactéries et est également reconnu par le système immunitaire comme un marqueur pour la détection d'invasions de pathogènes bactériens, permettant alors le développement de la réponse inflammatoire détaillée en I.³²⁴ Dans nos études, il permettait donc de simuler l'inflammation *in vitro*. La procédure *in vitro* peut alors être résumée selon la frise proposée en **Figure 82**.

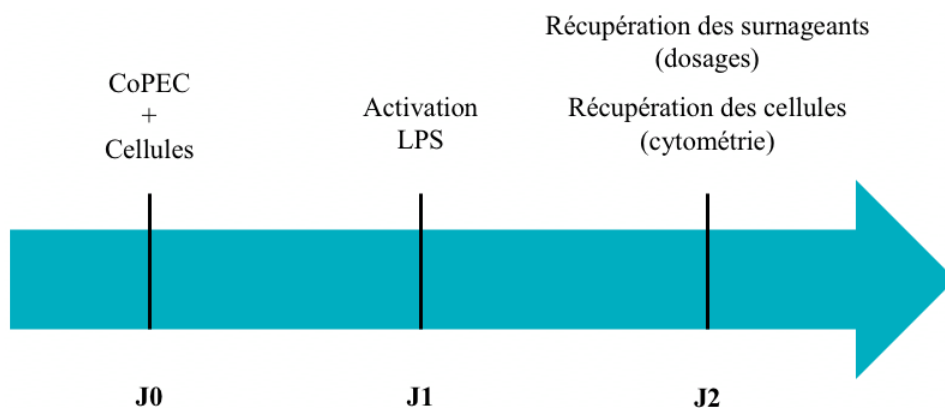


Figure 82 : Chronologie de la procédure *in vitro* d'évaluation des propriétés anti-inflammatoires des matériaux à base d'associations chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate.

II. 2. 2. Évaluation de la cytotoxicité des CoPEC chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate

Lors du développement d'un biomatériau, l'un des premiers essais biologiques à mener concerne la cytotoxicité de ce matériau. En effet, un caractère cytotoxique est, dans la plupart des cas de figure, incompatible avec l'utilisation d'un matériau à des fins médicales.

La cytotoxicité des CoPEC chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate a dans notre étude été évaluée par cytométrie en flux en utilisant un marqueur particulier de type « Fixable Viability Dye ». Ce marqueur fluorescent pénètre à travers les membranes cellulaires altérées et marque donc spécifiquement les cellules mortes. En cytométrie en flux, deux populations distinctes, l'une correspondant aux cellules mortes fluorescentes et l'autre aux cellules vivantes non fluorescentes, sont alors observées (**Figure 83**) et la viabilité peut être déterminée en comparant ces deux populations.

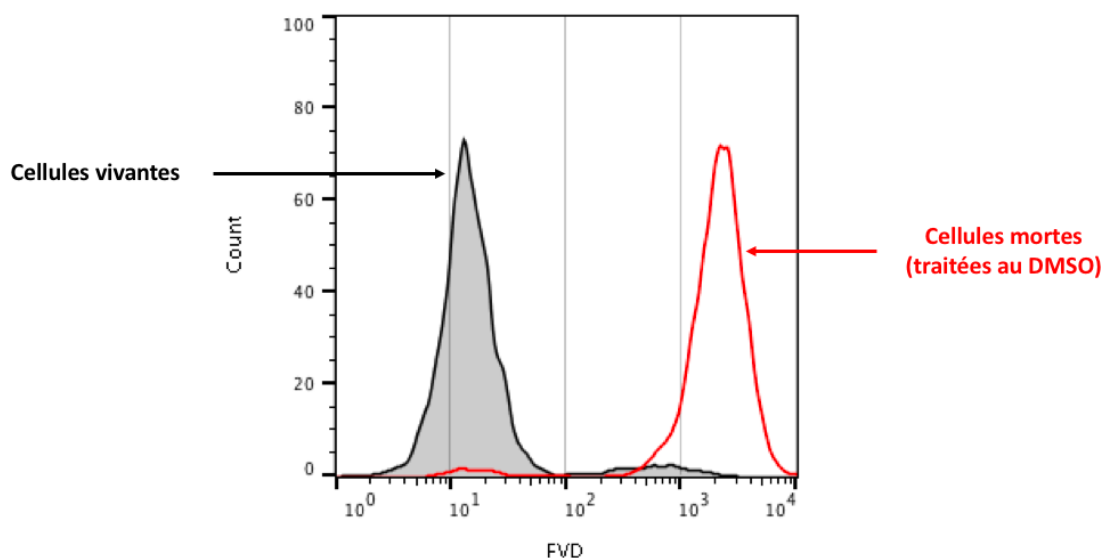


Figure 83 : Exemple d'histogramme obtenu lors d'un test de cytotoxicité mené avec un marqueur de type « Fixable Viability Dye » en cytométrie en flux.

Comme il peut être constaté sur le graphique obtenu à la suite des évaluations de la cytotoxicité en cytométrie en flux (**Figure 84**), en présence des deux CoPEC, que les macrophages soient activés ou non par du LPS, leur viabilité ne semble pas significativement affectée. Les CoPEC chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate sont donc non-cytotoxiques.

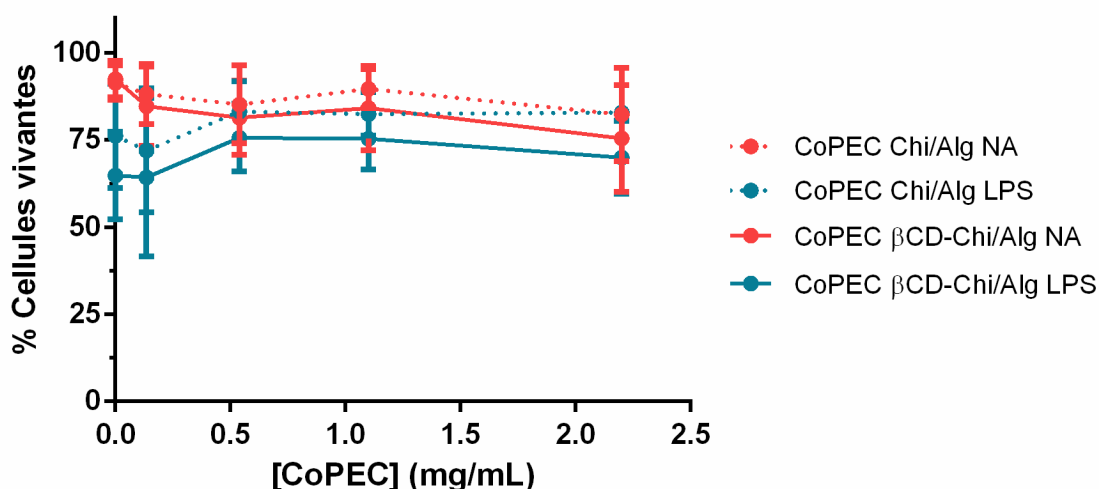
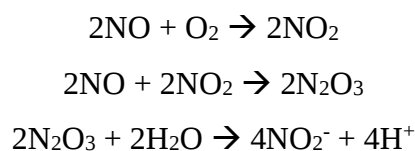


Figure 84 : Viabilité de cellules RAW 264.7 activées par du LPS (LPS) ou non (NA) et en présence de microparticules de CoPEC chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate ($n = 3$).

II. 2. 3. Évaluation de l'effet des CoPEC chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate sur la production d'oxyde nitrique par des macrophages activés

La production d'oxyde nitrique (NO) par les macrophages est une conséquence de leur activation lors d'une inflammation, qui est dans notre cas simulée par un traitement par du LPS. Cette production a alors été quantifiée dans le surnageant de macrophages activés par du LPS et traités avec des microparticules de CoPEC chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate afin d'évaluer l'effet de ces derniers sur cette production d'oxyde nitrique et donc sur l'inflammation. L'oxyde nitrique étant un radical libre très peu stable (il n'a par exemple qu'une durée de vie de moins d'une seconde dans le sang circulant),³²⁵ une fois produit il est très rapidement converti en nitrites (NO_2^-) selon la cascade de réactions suivante :³²⁶



La production de NO peut être indirectement évaluée par le test de Griess³²⁶ au cours duquel le trioxyde d'azote (N_2O_3), généré par la formation d'acide nitreux à partir des nitrites, réagit avec le sulfanilamide (ou *p*-aminobenzenesulfonamide) pour former un ion diazonium qui se couple ensuite au *N*-(1-naphtyl)ethylenediamine pour former un chromophore azoïque

absorbant à 540 nm (**Figure 85**), le sulfanilamide et le *N*-(1-naphtyl)ethylenediamine étant présents dans le réactif de Griess alors utilisé.

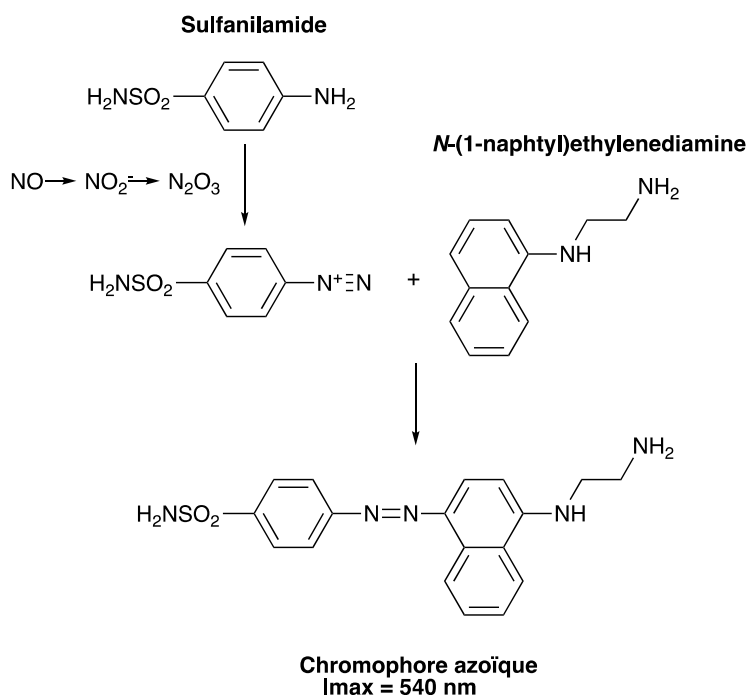


Figure 85 : Principe du test de Griess pour l'évaluation indirecte de la production d'oxyde nitrique par les macrophages activés.

Les macrophages ont alors été traités avec des concentrations de CoPEC chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate allant de 0,0677 à 2,2 mg/mL pendant 24 h puis ils ont été activés par du LPS et, 24 h après, les surnageants des cellules ont été récupérés pour y doser indirectement par un test de Griess l'oxyde nitrique produit par les cellules (**Figure 86**).

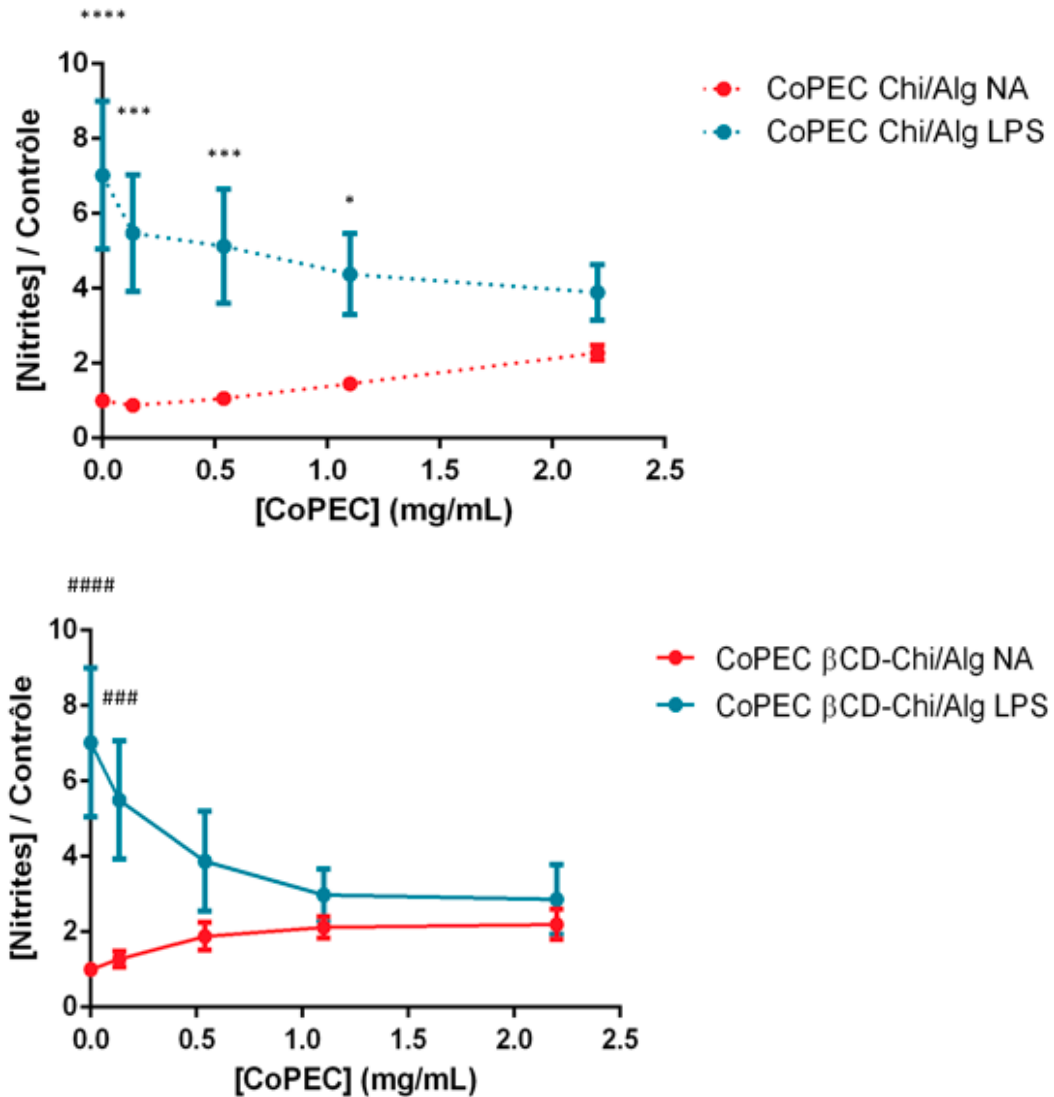


Figure 86 : Comparaison des concentrations en nitrites mesurées par test de Griess ($n = 3$) dans les surnageants de cellules RAW 264.7 traitées avec des microparticules de CoPEC chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate et activées par du LPS (LPS) ou non (NA), par rapport à la concentration mesurée dans les surnageants de cellules RAW 264.7 non traitées et non activées par du LPS. ****, *** et * = p -valeur respectivement $< 0,0001$, $< 0,001$ et $< 0,05$ entre les traitements CoPEC Chi/Alg NA et CoPEC Chi/Alg LPS. #### et ### = p -valeur respectivement $< 0,0001$ et $< 0,001$ entre les traitements CoPEC β CD-Chi/Alg NA et CoPEC β CD-Chi/Alg LPS.

L'addition de LPS sur les macrophages entraîne une forte production de NO qui se manifeste sur les graphiques par une augmentation de la concentration en nitrites par rapport au contrôle correspondant aux macrophages non traités et non activés par du LPS. Une très légère production de NO causée par la présence des CoPEC sur les macrophages non activés par du LPS (deux courbes rouges) peut être distinguée. De plus et de manière très intéressante, le traitement par les deux CoPEC entraîne une diminution de la production de NO par les macrophages activés par du LPS (deux courbes bleues). En outre, même si cet effet ne semble pas drastique, il y a une tendance selon laquelle la diminution serait plus

conséquence dans le cas du CoPEC contenant la β -cyclodextrine (courbe bleue en trait plein). Dès 0,5 mg/mL de CoPEC β CD-chitosan/alginate, la différence entre la production de NO par les macrophages activés et non activés par du LPS n'est plus significative. Cette non-significativité est retrouvée à 2,2 mg/mL dans le cas du traitement avec le CoPEC chitosan/alginate (courbe bleue en pointillés).

Ainsi, les deux CoPEC induisent une diminution de la production de NO par les macrophages activés par du LPS et cette diminution semble être plus importante dans le cas du CoPEC β CD-chitosan/alginate.

II. 2. 4. Évaluation de l'effet des CoPEC chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate sur la production de TNF- α par des macrophages activés

La production de TNF- α par les macrophages étant, de la même manière que la production de NO, une conséquence directe de l'activation de ces cellules par le LPS simulant une inflammation, cette production a également été suivie dans le cas du traitement des macrophages avec les CoPEC chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate.

Pour quantifier le TNF- α produit par les cellules et qui se retrouve dans leur surnageant en fin d'expérience *in vitro*, le test ELISA a été utilisé (**Figure 87**).

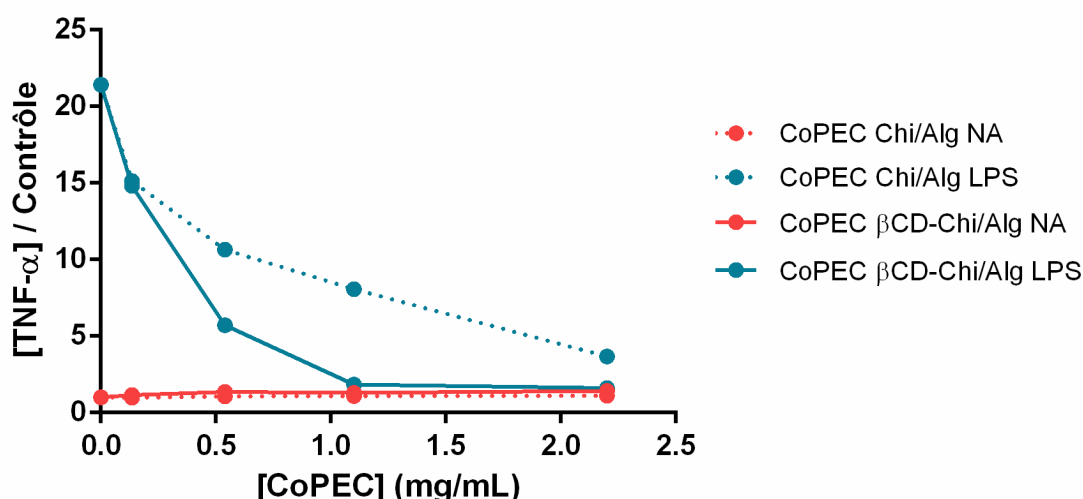


Figure 87 : Comparaison des concentrations en TNF- α mesurées par test ELISA ($n = 1$ représentatif de 3 expériences) dans les surnageants de cellules RAW 264.7 traitées avec des microparticules de CoPEC chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate et activées par du LPS (LPS) ou non (NA), par rapport à la concentration mesurée dans les surnageants de cellules RAW 264.7 non traitées et non activées par du LPS.

Comme attendu, l'activation par du LPS des macrophages (courbes bleues à 0 mg/mL de CoPEC) induit une importante production de TNF- α par ces cellules. Tout comme dans le cas de la production de NO, le traitement des macrophages activés par du LPS par les CoPEC chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate (courbes bleues) provoque une diminution de cette production de TNF- α . A nouveau, un effet plus prononcé dans le cas du CoPEC contenant la β -cyclodextrine (courbe bleue en trait plein) est constaté. Dans ce cas, on peut noter que la production de TNF- α est quasiment inhibée dès 1,1 mg/mL de CoPEC.

Ainsi, en plus de diminuer la production de NO, les CoPEC chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate permettent de diminuer la production de TNF- α par des macrophages activés par du LPS. Aussi bien dans le cas de la production de NO que dans celui de la production de TNF- α , la diminution est plus marquée dans le cas du CoPEC β CD-chitosan/alginate. Ces deux matériaux, et en particulier celui contenant les cyclodextrines, présentent donc des effets anti-inflammatoires propres.

Afin de vérifier que les différents effets anti-inflammatoires observés dans le cas du CoPEC β CD-chitosan/alginate n'étaient pas dus à un quelconque piégeage dans les cyclodextrines situées au sein du matériau, deux études complémentaires permettant d'évaluer l'éventuelle captation du LPS et du TNF- α par le CoPEC ont été menées.

II. 2. 5. Évaluation de l'éventuel piégeage du LPS et du TNF- α dans le CoPEC β CD-chitosan/alginate

II. 2. 5. 1. Évaluation de l'éventuel piégeage du LPS dans le CoPEC β CD-chitosan/alginate

Les molécules de LPS sont composées de trois régions distinctes : le lipide A, un noyau polysaccharidique et l'antigène O (**Figure 88**).³²⁷

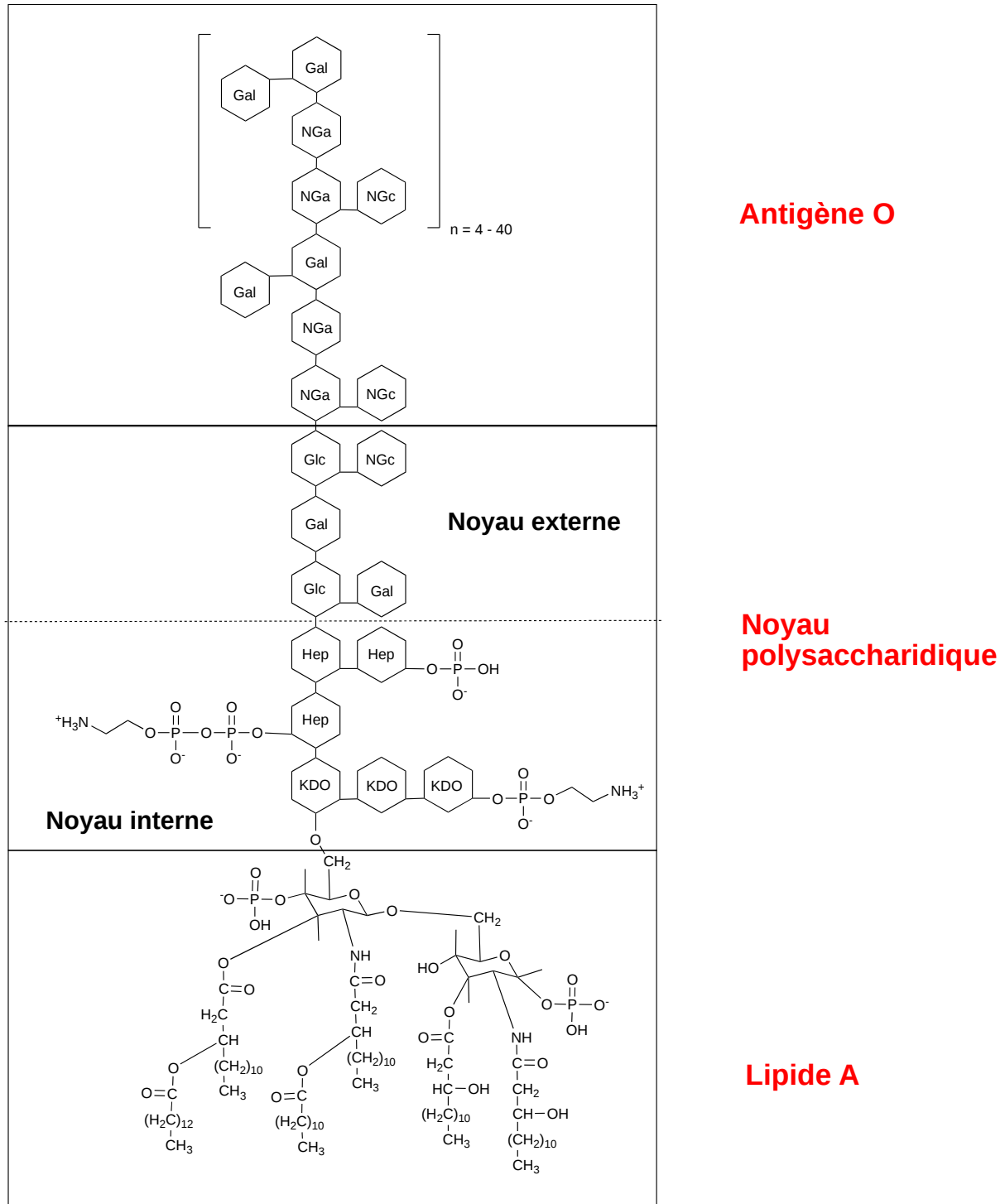


Figure 88 : Représentation schématique du LPS.

Comportant notamment des chaînes grasses, le LPS est susceptible de former des complexes d'inclusion avec les cyclodextrines présentes dans le CoPEC. Une étude a alors été menée afin de vérifier que la diminution de la production de $TNF-\alpha$ et de NO ne provenait pas tout simplement d'un piégeage du LPS dans les cyclodextrines, empêchant alors l'activation des macrophages. Lors de cette étude, dont la chronologie de la procédure est

illustrée en **Figure 89**, le LPS a été mis en contact avec le CoPEC pendant 24 h à 37 °C, permettant à l'éventuelle complexation du LPS dans le matériau d'avoir lieu. Le surnageant de l'échantillon de CoPEC, après filtration, a alors été placé sur des macrophages et une nouvelle incubation à 37 °C pendant 24 h a été opérée. Enfin, le surnageant a été récupéré et la concentration en nitrites dans ce surnageant a été déterminée par un test de Griess. Pour comparaison, des macrophages ont également été directement activés par du LPS au moment de l'ajout du surnageant de l'échantillon de CoPEC sur les cellules.

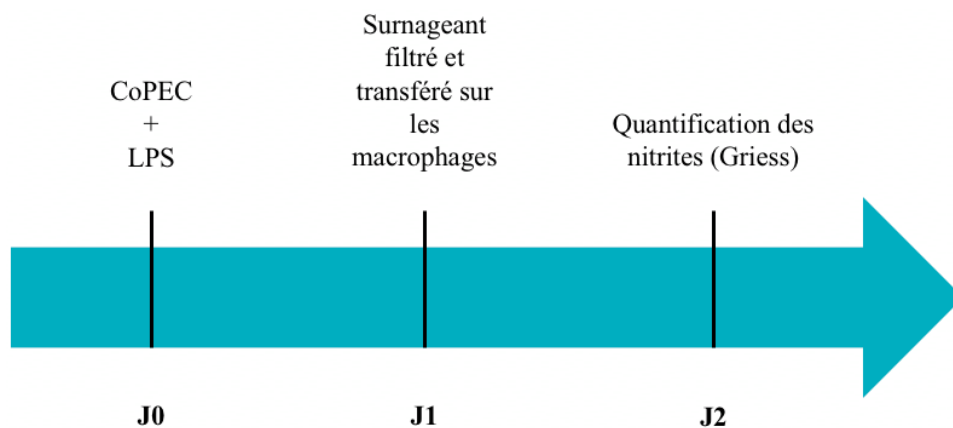


Figure 89 : Chronologie de la procédure suivie pour le test de piégeage du LPS.

Il peut être constaté que la mise en contact du CoPEC et du LPS avant de placer ce dernier sur les macrophages ne diminue pas la production de NO par ces cellules, la quantité de nitrites dosée étant similaire à celle dosée dans le surnageant de macrophages directement activés par du LPS (**Figure 90**).

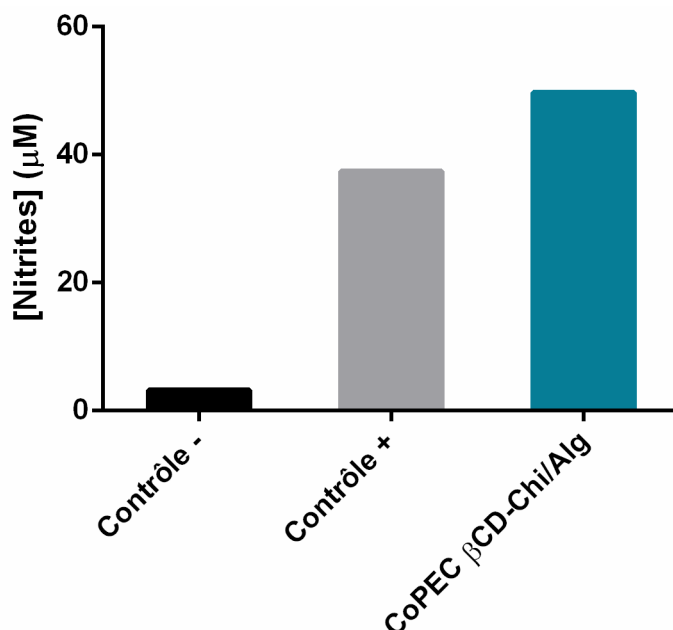


Figure 90 : Concentration en nitrites mesurée par test de Griess ($n = 1$) dans le surnageant de cellules RAW 264.7 ayant été mises en contact avec le surnageant de microparticules de CoPEC β CD-chitosan/alginate en présence de LPS. Les contrôles négatif et positif correspondent aux cellules RAW 264.7 respectivement non activées et activées par du LPS. [CoPEC] = 1 mg/mL.

Les cellules sont donc activées dans une même mesure que le LPS ait été mis au contact du CoPEC ou non, donc ce lipopolysaccharide n'est *a priori* pas piégé au sein du matériau.

II. 2. 5. 2. Évaluation de l'éventuel piégeage du TNF- α dans le CoPEC β CD-chitosan/alginate

Le LPS n'étant pas piégé dans le CoPEC lors des expériences, il permettait bien d'activer les macrophages et induisait donc la production de NO et de TNF- α par ces cellules. Cependant, le TNF- α comportant certaines zones hydrophobes³²⁸ et pouvant ainsi éventuellement lui-aussi être inclus dans les cyclodextrines, une autre étude a été menée afin d'évaluer l'éventuel piégeage de cette cytokine dans le matériau. Lors de cette étude, dont la chronologie de la procédure est illustrée en **Figure 91**, du TNF- α a été mis au contact du CoPEC β CD-chitosan/alginate pendant une journée à 37 °C pour laisser le temps à l'éventuel piégeage de la cytokine dans le matériau de se produire. La concentration en TNF- α dans le surnageant du CoPEC a ensuite été déterminée par test ELISA et a été comparée à celle obtenue dans le cas de TNF- α n'ayant pas été mis en contact avec le matériau.

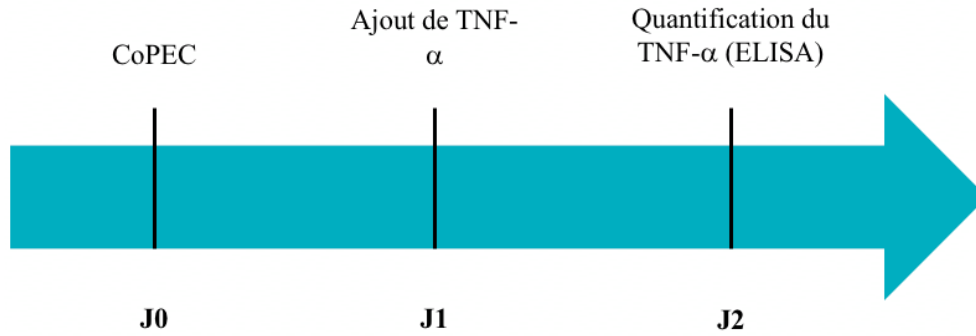


Figure 91 : Chronologie de la procédure suivie pour le test de piégeage du TNF- α .

Des quantités comparables de TNF- α dans les surnageants sont alors dosées, que la cytokine ait été en contact ou non avec la CoPEC (**Figure 92**). Le TNF- α produit par les macrophages à la suite de l'activation par du LPS n'est donc pas piégé dans le matériau.

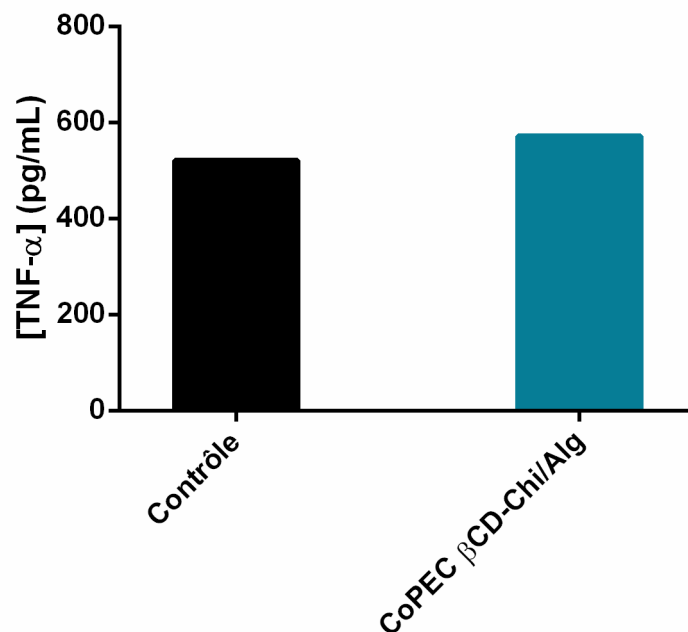


Figure 92 : Concentration en TNF- α mesurée par test ELISA ($n = 1$) dans le surnageant de microparticules de CoPEC β CD-chitosan/alginate. Le contrôle correspond à du TNF- α dans du milieu de culture et n'ayant eu aucun contact avec le CoPEC. [CoPEC] = 1 mg/mL.

Ainsi, les deux études décrites permettent d'affirmer que les diminutions des concentrations en NO et TNF- α mesurées dans les surnageants des macrophages mis au contact du CoPEC β CD-chitosan/alginate et activés par du LPS ne proviennent ni d'un piégeage du LPS, ni d'un piégeage du TNF- α dans le matériau et en particulier dans les

cyclodextrines présentes au sein de celui-ci. Il peut alors en être déduit un réel effet anti-inflammatoire intrinsèque propre au matériau.

Afin de confirmer l'effet anti-inflammatoire des CoPEC chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate, des études de cytométrie en flux permettant de s'intéresser à des marqueurs de différenciation et de prolifération des macrophages ont été conduites.

II. 2. 6. Évaluation de l'effet des CoPEC chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate sur l'expression du marqueur d'activation CD40 par des macrophages activés

Lorsque les macrophages sont activés par du LPS, ils expriment le CD40, un membre de la superfamille des récepteurs du TNF dont l'interaction avec son ligand (CD154) est cruciale pour la mise en place d'une réponse immunitaire.³²⁹ Afin de confirmer l'effet anti-inflammatoire intrinsèque des CoPEC chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate, à la fin des trois jours d'étude *in vitro*, au moment de la récupération des surnageants, les cellules ont également été collectées. La cytométrie en flux a été utilisée afin d'évaluer l'expression du CD40 par les cellules traitées avec les CoPEC et activées par du LPS. Les macrophages ont alors été préalablement marqués avec un anticorps anti-CD40 avant d'être analysés au cytomètre (**Figure 93**).

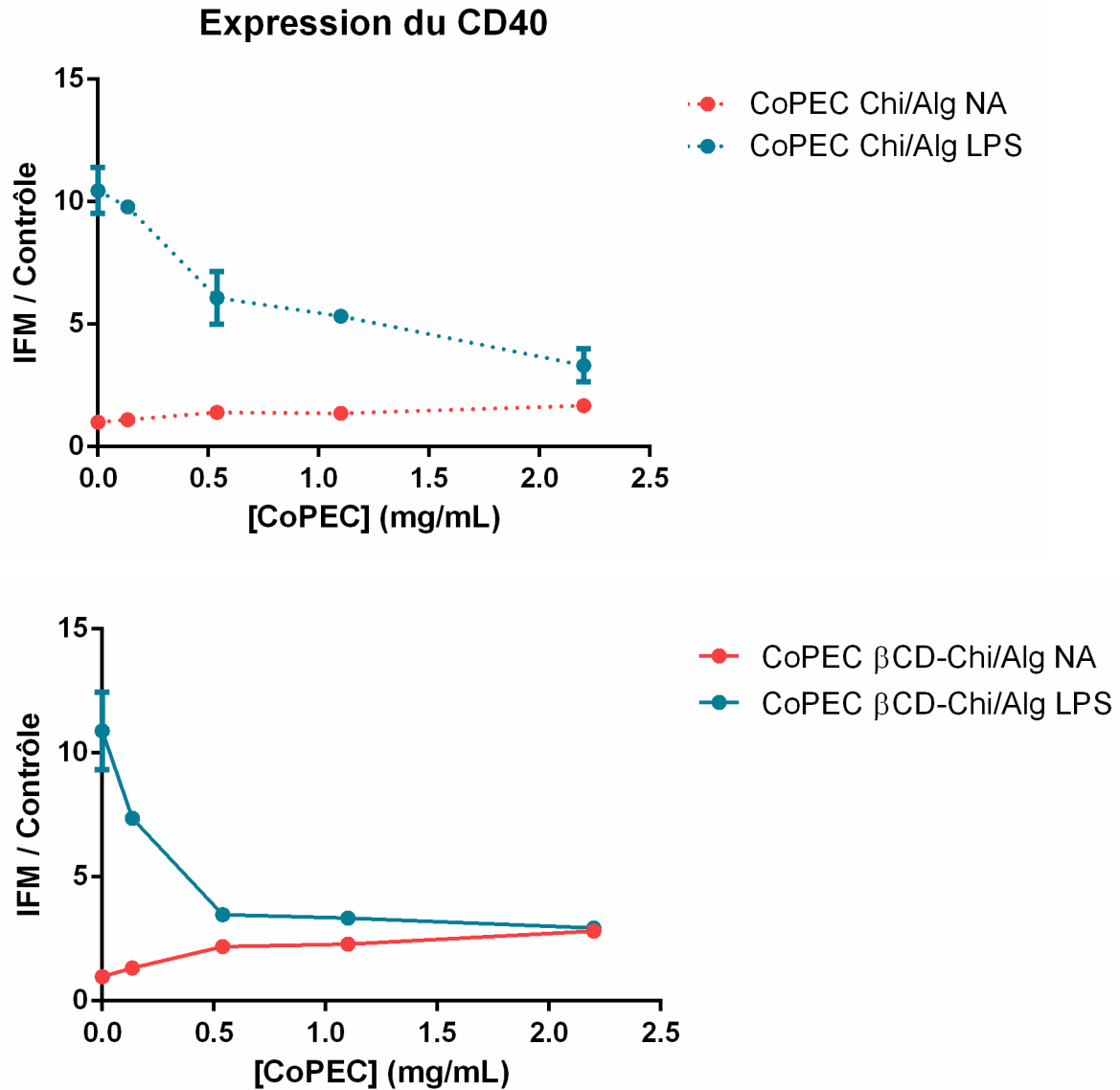


Figure 93 : Comparaison de l'expression du marqueur d'activation CD40 quantifiée par marquage au CD40 et cytométrie ($n = 2$) par des cellules RAW 264.7 traitées avec des microparticules de CoPEC chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate et activées par du LPS (LPS) ou non (NA). Les résultats sont présentés comme des ratios d'intensité de fluorescence moyenne (IFM) entre les différents échantillons et des cellules RAW 264.7 non traitées et non activées par du LPS.

D'après les graphiques obtenus, l'activation des macrophages par du LPS induit une importante expression du marqueur d'activation CD40 par ces cellules. Le traitement avec les CoPEC chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate des cellules activées (courbes bleues) permet de réduire très fortement cette expression et d'autant plus que la concentration en CoPEC augmente. Dans les deux cas, pour la plus forte concentration en CoPEC testée (2,2 mg/mL), l'expression de CD40 par les macrophages activés est du même ordre de grandeur que la légère expression induite par les CoPEC sur les macrophages non activés par

du LPS (courbes rouges). Ainsi, les deux matériaux permettent de réduire l'activation des macrophages stimulés par du LPS, ce qui est cohérent avec les diminutions des productions de NO et de TNF- α par les cellules constatées précédemment.

II. 2. 7. Évaluation de l'effet des CoPEC chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate sur l'expression du marqueur de prolifération Ki-67 par des macrophages activés

Lorsque les macrophages sont activés par du LPS, ils se différencient et il en résulte un arrêt ou un ralentissement de leur prolifération. Cette prolifération peut être évaluée par un suivi de l'expression du Ki-67. Le Ki-67 est en effet une protéine exprimée durant toutes les phases actives du cycle cellulaire.³³⁰ Lorsque des macrophages prolifèrent, ils expriment donc cette protéine.

Afin d'évaluer l'expression du Ki-67 par les macrophages traités avec les CoPEC et activés par du LPS, comme dans le cas du CD40, la cytométrie en flux a été utilisée (**Figure 94**). Les cellules récupérées après les trois jours de test *in vitro* ont alors été marquées avec un anticorps monoclonal se fixant sur le Ki-67 exprimé par les cellules en prolifération.

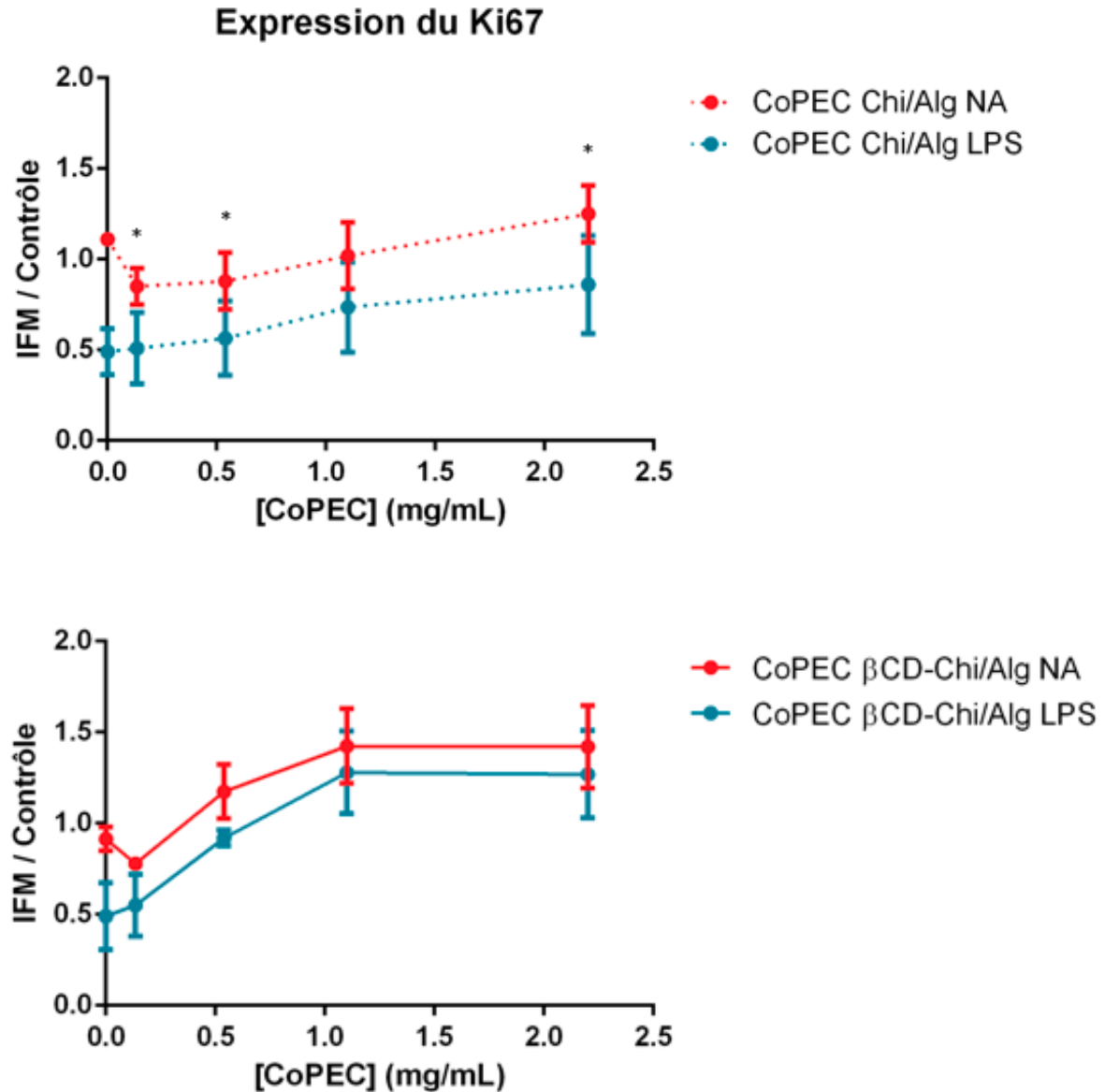


Figure 94 : Comparaison de l'expression du marqueur de prolifération cellulaire Ki-67 quantifiée par marquage au Ki-67 et cytométrie ($n = 2$) par des cellules RAW 264.7 traitées avec des microparticules de CoPEC chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate et activées par du LPS (LPS) ou non (NA). Les résultats sont présentés comme des ratios d'intensité de fluorescence moyenne (IFM) entre les différents échantillons et des cellules RAW 264.7 non traitées et non activées par du LPS. * = p-valeur < 0,05 entre les traitements CoPEC Chi/Alg NA et CoPEC Chi/Alg LPS.

D'après les graphiques obtenus, il est observé que l'activation par du LPS des macrophages a induit une diminution de leur prolifération, caractérisée par une diminution de l'expression de Ki-67 observable aux points à 0 mg/mL de CoPEC sur les courbes bleues. On peut cependant observer qu'à mesure que la concentration en CoPEC chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate augmente, l'expression du Ki-67 par les macrophages augmente également pour finalement rejoindre l'expression dans le cas des macrophages non activés par du LPS (courbes rouges). Les CoPEC induisent donc une « restauration » de la prolifération

cellulaire, ce qui est cohérent par rapport à la diminution de l'activation des cellules déduite de la diminution de l'expression du CD40 évoquée précédemment. A nouveau, on constate que cette restauration semble légèrement plus prononcée dans le cas du traitement avec le CoPEC contenant les cyclodextrines.

II. 3. Détermination du rôle des polyélectrolytes dans l'effet anti-inflammatoire des CoPEC chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate

Afin d'apporter une première explication de l'origine de l'effet anti-inflammatoire présenté par les CoPEC chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate, des essais *in vitro* ont été menés en utilisant séparément les différents polyélectrolytes composant ces CoPEC, c'est-à-dire le chitosan, le β CD-chitosan et l'alginate.

Au cours de ces essais, la procédure décrite en II. 2. 1. a été suivie mais cette fois avec des solutions de polyélectrolytes seuls, avec des concentrations allant de 0,0677 à 2,2 mg/mL. Les nitrites présents dans les surnageants des cellules, représentatifs de la production de NO par les macrophages, ont ensuite été quantifiés par test de Griess (**Figure 95**).

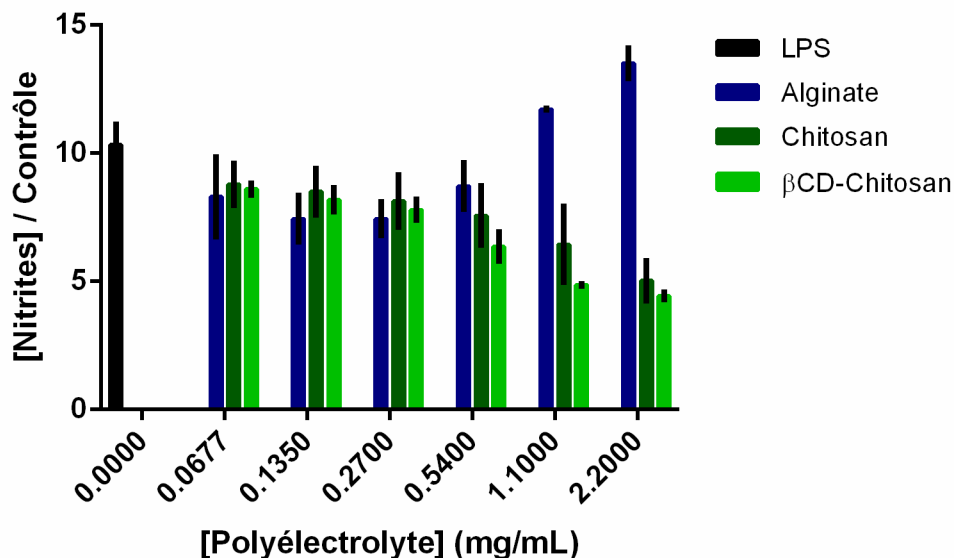


Figure 95 : Concentrations en nitrites mesurées par test de Griess ($n = 2$) dans les surnageants de cellules RAW 264.7 traitées avec de l'alginate, du chitosan ou du β CD-chitosan et activées par du LPS, par rapport à la concentration mesurée dans les surnageants de cellules RAW 264.7 non traitées et non activées par du LPS.

D'après le graphique obtenu, l'alginate seul semble avoir tendance à augmenter le taux de nitrites présent dans les surnageants par rapport au cas des macrophages activés et non traités par les polyélectrolytes (contrôle). Au contraire, le chitosan et le β CD-chitosan induisent une diminution de la quantité de nitrites dosée dans les surnageants. Il semble donc, d'une part, que la formation du CoPEC permette d'annuler l'effet pro-inflammatoire de l'alginate et que, d'autre part, l'effet anti-inflammatoire du chitosan (et du β CD-chitosan) soit conservé dans le matériau. Concernant l'effet pro-inflammatoire de l'alginate seul, il est à noter que le lot utilisé n'étant pas de grade pharmaceutique, il est possible que cet effet provienne d'une contamination qui a alors pu être simplement traitée lors du procédé de formulation.

Le chitosan et le β CD-chitosan sont donc *a priori* à l'origine des effets anti-inflammatoires des deux CoPEC. Les résultats obtenus ici concernant le chitosan semblent corroborer ceux obtenus par Yoon *et al.*³³¹ et Zhu *et al.*³³² sur des oligosaccharides de chitosan. En effet, dans ces travaux, les auteurs ont également noté une diminution de la production de NO ainsi que d'autres marqueurs de l'inflammation tels que le TNF- α , l'IL-6 ou encore l'IL-1 β par des cellules RAW 264.7 activées par du LPS et traitées avec des oligochitosans.

Ainsi, les CoPEC chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate présentent tous deux des propriétés anti-inflammatoires. En effet, dans le cas de macrophages traités avec ces matériaux et activés par du LPS, ils permettent de limiter considérablement la production de NO et de TNF- α par les cellules, de diminuer l'expression du marqueur d'activation CD40 par ces dernières et de « restaurer » la prolifération cellulaire. En outre, ces différents effets semblent légèrement plus prononcés dans le cas du CoPEC contenant les cyclodextrines. L'hypothèse d'un piégeage du LPS et du TNF- α dans les cyclodextrines pour justifier l'effet du CoPEC β CD-chitosan/alginate a été écartée *via* deux études distinctes. Une autre étude a quant à elle permis d'établir que le chitosan, fonctionnalisé ou non par la β -cyclodextrine, pourrait être à l'origine des phénomènes anti-inflammatoires observés. L'ensemble de ces résultats permet d'affirmer que les CoPEC chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate possèdent des propriétés anti-inflammatoires intrinsèques, ce qui les rend très intéressants dans l'optique d'une utilisation dans les thérapies visant les maladies chroniques inflammatoires.

III. Évaluation *in vitro* de l'impact de l'incorporation de molécules actives anti-inflammatoires sur les propriétés du CoPEC β CD-chitosan/alginate vis-à-vis de l'inflammation

Afin d'augmenter les propriétés anti-inflammatoires du CoPEC β CD-chitosan/alginate, il a été décidé d'exploiter la capacité des cyclodextrines à former des complexes d'inclusion avec des substances actives. Deux anti-inflammatoires ont été incorporés dans les matériaux sous forme de microparticules : le piroxicam et la prednisolone.

III. 1. Stratégie d'inclusion de substances actives dans les CoPEC

La stratégie générale d'inclusion des deux substances actives organiques utilisées au cours de ces études dans les cyclodextrines, puis de leur extraction pour leur dosage, a été développée selon un principe simple évoqué notamment dans la revue de Tejashri *et al.*³³³ portant sur les nano-éponges à base de cyclodextrine. Ce principe est le suivant : dans le cas de l'incorporation de molécules organiques dans un matériau présentant des parties hydrophobes (comme dans le cas présent les cavités internes des cyclodextrines) un solvant hydrophile aura tendance à pousser les molécules organiques vers ces parties hydrophobes, tandis qu'un solvant plutôt hydrophobe permettra de libérer les molécules organiques piégées. Les différentes inclusions et extractions ont alors été menées en utilisant les caractères hydrophile ou hydrophobe des solvants utilisés.

III. 2. Évaluation de l'impact de l'incorporation de piroxicam sur les propriétés anti-inflammatoires du CoPEC β CD-chitosan/alginate

III. 2. 1. Le piroxicam

Le piroxicam, ou 4-hydroxy-2-méthyl-*N*-(pyridin-2-yl)-2*H*-benzo[*e*][1,2]thiazine-3-carboxamide 1,1-dioxide (**Figure 96**), est un anti-inflammatoire non stéroïdien faisant partie de la famille des oxicams.

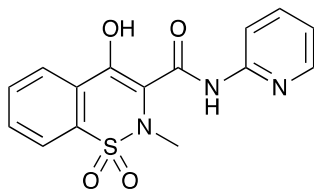


Figure 96 : Structure du piroxicam.

En plus d'une activité anti-inflammatoire, il présente des propriétés antalgique (réduction de la douleur) et antipyrétique (réduction de la fièvre) et il inhibe les fonctions plaquettaires. Faisant partie des anti-inflammatoires non stéroïdiens non sélectifs, le piroxicam exerce son activité anti-inflammatoire en inhibant les cyclooxygénases COX-1 et COX-2 et donc en inhibant indirectement la synthèse de prostaglandines à effet inflammatoire évoquées en I. 2. 3.³³⁴

Le piroxicam est disponible commercialement (Brexin®, Cycladol®, Feldene®...), seul ou sous forme de complexe d'inclusion avec la cyclodextrine permettant alors une meilleure solubilité de la substance active, et sous diverses formes pharmaceutiques telles que des gélules, des comprimés ou encore des gels.

D'après plusieurs travaux, le piroxicam a la capacité de former des complexes d'inclusion avec la β -cyclodextrine selon différents ratios molaires piroxicam : β -cyclodextrine comme par exemple des ratios de 1 : 1^{335, 336} et 1 : 2,5.^{337, 338}

III. 2. 2. Incorporation de piroxicam dans les CoPEC

L'incorporation du piroxicam dans les CoPEC chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate a été effectuée en suivant la stratégie décrite en III. 1.

300 mg de microparticules des deux CoPEC ont ainsi été immergés dans 90 mL de solution de piroxicam dans du méthanol, à 1 mg/mL, pendant 72 h à 30 °C et 90 tr/min. D'après l'étude décrite dans le chapitre 3 concernant la détermination de la composition du CoPEC β CD-chitosan/alginate, dans 300 mg de CoPEC il y a 135 mg de β CD-chitosan, soit 0,08 mmol de β -cyclodextrine. Avec 90 mg de piroxicam en solution, soit 0,27 mmol, nous étions en présence d'un excès de piroxicam par rapport aux cyclodextrines et ainsi dans des conditions favorables à l'inclusion de la substance active. De plus, le méthanol étant un solvant « hydrophile », il permettait de forcer les molécules hydrophobes de piroxicam à se rendre dans les cavités hydrophobes des cyclodextrines. L'incorporation a été menée sur une

durée de 72 h permettant de s'assurer que l'équilibre d'inclusion était atteint. En effet, la formation de complexes d'inclusion β -cyclodextrine/piroxicam réalisée en moins de 72 h en utilisant le méthanol comme solvant a déjà été rapportée.³³⁹ Les particules ont ensuite été isolées par filtration et lavées avec un minimum d'eau ultrapure, ce qui permettait d'éliminer le piroxicam se trouvant en surface tout en préservant les complexes d'inclusion formés entre les cyclodextrines et la substance active. Les particules ont été récupérées sous forme sèche par passage à l'étuve et, afin d'homogénéiser leur taille, elles ont été broyées et tamisées à 300 μm .

III. 2. 3. Extraction et dosage du piroxicam inclus dans les CoPEC

L'extraction du piroxicam inclus dans les CoPEC a également été menée selon la stratégie décrite en III. 1.

9,9 mg de microparticules de chaque CoPEC contenant du piroxicam ont ainsi été incubées dans du dichlorométhane pendant 24 h à 30 °C et 130 tr/min. Le dichlorométhane étant fortement « hydrophobe », il convenait parfaitement pour libérer les molécules de piroxicam piégées dans les cyclodextrines présentes au sein du CoPEC. Le piroxicam extrait se retrouvait ainsi dans le solvant qui a été collecté en filtrant les particules. Ces dernières ont été lavées au CH_2Cl_2 afin de récupérer également l'éventuel piroxicam extrait et déposé en surface des particules. Le piroxicam extrait a été isolé sous forme solide par évaporation du solvant sous pression réduite.

Afin de quantifier le piroxicam extrait des CoPEC, un dosage en spectrophotométrie UV-Visible de celui-ci a été effectué en s'inspirant du travail de Nagabhushanam.³⁴⁰ Une gamme de solutions de piroxicam dans de l'HCl 0,1 M a été préparée, avec des concentrations allant de 5 à 20 mg/L. Le piroxicam extrait a été dissous dans 20 mL de MeOH puis la solution résultante a été diluée au 1/5 dans de l'HCl aqueux à 0,1 M. La teneur en piroxicam a été déterminée en mesurant l'absorbance des échantillons et de la gamme à 333 nm. Cette détermination a été rendue possible grâce au caractère linéaire de la courbe étalon (**Figure 97**) qui permettait d'appliquer la loi de Beer-Lambert.

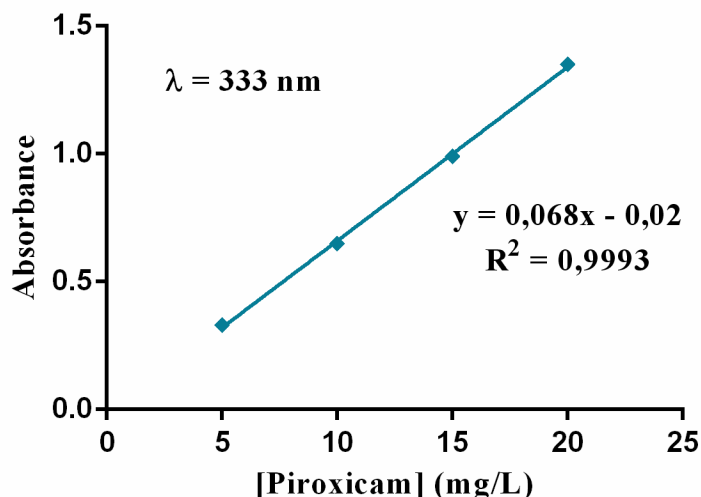


Figure 97 : Courbe étalon pour le dosage du piroxicam.

D'après ce dosage, les concentrations en piroxicam des solutions diluées préparées à partir du piroxicam extrait des CoPEC chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate étaient respectivement de 4,12 et 9,26 mg/L. Les solutions étant diluées au 1/5, il en résulte que les extraits méthanoliques de piroxicam étaient respectivement concentrés à 20,60 et 46,30 mg/L en piroxicam. Ces extraits méthanoliques étant d'un volume de 20 mL, ils contenaient donc 0,41 mg et 0,93 mg de piroxicam, respectivement. Ces extractions provenant de 9,9 mg de chaque CoPEC, on en déduit alors des teneurs en piroxicam de 41 μ g/mg de CoPEC chitosan/alginate et 94 μ g/mg de CoPEC β CD-chitosan/alginate.

Ainsi, la présence de cyclodextrines dans le CoPEC permet d'augmenter considérablement sa teneur en piroxicam après inclusion. Néanmoins, ces résultats témoignent également d'une inclusion non spécifique dans le CoPEC. En effet, le piroxicam étant d'après ces résultats également capable de s'inclure dans le CoPEC dépourvu de cyclodextrine, il peut être conclu que dans le cas du CoPEC β CD-chitosan/alginate une partie du piroxicam inclus ne se trouve pas dans les cyclodextrines mais ailleurs dans le CoPEC, par exemple dans certaines zones hydrophobes dans lesquelles il pourrait être piégé de manière permanente, et que cette partie ne sera alors pas forcément disponible lors des études *in vitro*.

III. 2. 4. Évaluation de l'impact de l'inclusion de piroxicam dans le CoPEC β CD-chitosan/alginate sur la production d'oxyde nitrique par des macrophages activés

Afin d'évaluer l'impact de la présence de piroxicam dans le CoPEC β CD-chitosan/alginate sur la production de NO par les macrophages activés par du LPS, des tests *in vitro* avec ce CoPEC contenant ou pas le piroxicam ont été menés en suivant la procédure *in vitro* générale sur trois jours décrite en II. 2. 1. Les concentrations en CoPEC étaient alors de 0,25, 0,5, 1 et 2 mg/mL, correspondant respectivement à des concentrations en piroxicam de l'ordre de 25, 50, 100 et 200 μ g/mL. Les nitrites dans les surnageants des cellules ont alors été dosés par test de Griess (**Figure 98**).

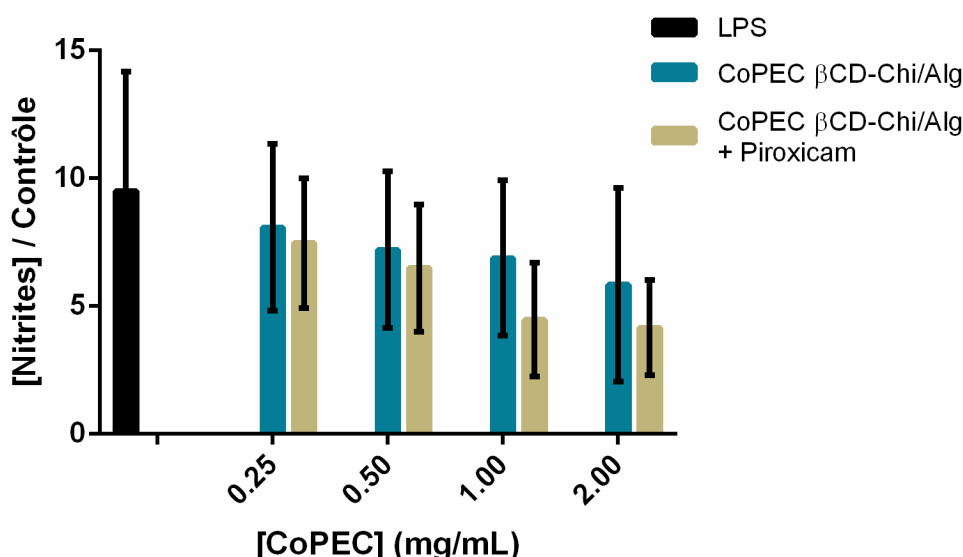


Figure 98 : Concentrations en nitrites mesurées par test de Griess ($n = 2$) dans les surnageants de cellules RAW 264.7 traitées avec des microparticules de CoPEC β CD-chitosan/alginate contenant ou pas du piroxicam et activées par du LPS, par rapport à la concentration mesurée dans les surnageants de cellules RAW 264.7 non traitées et non activées par du LPS.

Il peut alors être constaté que, bien qu'il y ait une légère tendance à avoir un meilleur effet dans le cas de la présence de piroxicam dans le CoPEC, en particulier aux plus fortes concentrations, la diminution de la production de NO n'est pas significativement plus importante grâce à l'incorporation de la substance active dans le matériau.

III. 2. 5. Évaluation de l'impact de l'inclusion de piroxicam dans le CoPEC β CD-chitosan/alginate sur la production de TNF- α par des macrophages activés

L'impact de la présence de piroxicam dans le CoPEC β CD-chitosan/alginate sur la production de TNF- α par les macrophages activés par du LPS a également été évalué par test ELISA sur les surnageants des macrophages traités avec les CoPEC (**Figure 99**).

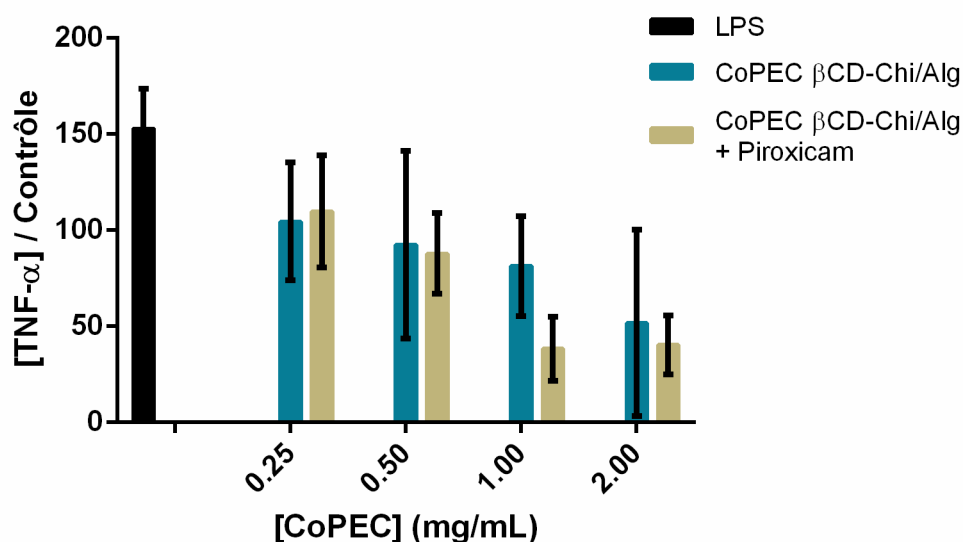


Figure 99 : Concentrations en TNF- α mesurées par test ELISA ($n = 2$) dans les surnageants de cellules RAW 264.7 traitées avec des microparticules de CoPEC β CD-chitosan/alginate contenant ou pas du piroxicam et activées par du LPS, par rapport à la concentration mesurée dans les surnageants de cellules RAW 264.7 non traitées et non activées par du LPS.

Comme pour la production de NO, il semble qu'il y ait une tendance à avoir une réduction de la production de TNF- α plus importante dans le cas du CoPEC contenant le piroxicam, surtout visible aux plus fortes concentrations, mais cet effet n'est toujours pas significativement meilleur que dans le cas du CoPEC sans substance active.

Ainsi, il semble que l'inclusion de piroxicam dans le CoPEC β CD-chitosan/alginate n'améliore pas significativement l'effet anti-inflammatoire du CoPEC. Une hypothèse pour justifier ce phénomène est la faible quantité de piroxicam disponible au sein du CoPEC. En effet, d'après l'étude de Chiong *et al.*³⁴¹ effectuée dans des conditions *in vitro* comparables à celles des tests menés durant ces travaux, pour avoir un effet détectable (de l'ordre de 40 % de réduction de la production de NO et de 25 % de réduction de la production de TNF- α) du

piroxicam seul sur des macrophages RAW 264.7 activés par du LPS, il faut se trouver en présence d'une concentration en piroxicam de l'ordre de 600 nmol/mL. Notre hypothèse est que le piroxicam qui est disponible aux cellules est celui qui est retenu par des interactions faibles au sein des cyclodextrines dans le CoPEC. Dans le cas de la plus forte concentration en CoPEC β CD-chitosan/alginate + piroxicam testée, c'est-à-dire avec une concentration en CoPEC de 2 mg/mL, on a une concentration en β CD-chitosan de 0,9 mg/mL, soit une concentration en β -cyclodextrine de l'ordre de 500 nmol/mL. Selon notre hypothèse, la concentration maximale en piroxicam dans le puits est donc de l'ordre de 500 nmol/mL, ce qui semble insuffisant pour voir un effet supplémentaire significatif dû à la présence de piroxicam. Pour les concentrations en CoPEC moins élevées testées, la concentration en piroxicam disponible dans les puits est encore plus faible et l'effet du piroxicam est encore moins visible. Ainsi, le CoPEC β CD-chitosan/alginate développé présente un effet anti-inflammatoire si important qu'il masque complètement l'effet additionnel provenant de la présence de piroxicam sur la production de NO et de TNF- α par des macrophages activés par du LPS.

III. 3. Évaluation de l'impact de l'incorporation de prednisolone sur les propriétés anti-inflammatoires du CoPEC β CD-chitosan/alginate

III. 3. 1. La prednisolone

La prednisolone, ou (8S,9S,10R,11S,13S,14S,17R)-11, 17-dihydroxy-17-(2-hydroxyacétyl)-10, 13-diméthyl-6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-dodecahydro-3H-cyclopenta[a]phenanthren-3-one (**Figure 100**), est un corticoïde de synthèse utilisé pour ses propriétés anti-inflammatoires dans le cadre du traitement de nombreuses maladies telles que la polyarthrite, l'asthme ou encore les formes graves de la tuberculose.

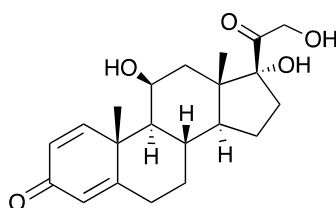


Figure 100 : Structure de la prednisolone.

En tant que glucocorticoïde, la prednisolone a un effet anti-inflammatoire en inhibant la synthèse de la phospholipase A2 et de la cyclo-oxygénase inductible (COX-2) en bloquant la libération de l'acide arachidonique ainsi que la formation de prostaglandines et de leucotriènes à activité pro-inflammatoire.³⁴²

La prednisolone est commercialement disponible (Cortisol®, Derinox®, Hydrocortancyl®...) sous plusieurs formes pharmaceutiques telles que des suspensions injectables, des crèmes ou encore des solutions pour pulvérisation nasale par exemple.

Tout comme pour le piroxicam, plusieurs travaux ont rapporté la formation de complexes d'inclusion entre la prednisolone et la β -cyclodextrine. Différents ratios molaires prednisolone : β -cyclodextrine, de 1 : 1³⁴³ ou 1 : 2^{344, 345} par exemple, peuvent alors être obtenus.

III. 3. 2. Incorporation de prednisolone dans les CoPEC

Tout comme dans le cas du piroxicam, l'incorporation puis l'extraction de la prednisolone dans les CoPEC chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate ont été menées suivant la stratégie détaillée en III. 1.

50 mg de microparticules des CoPEC chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate ont été immergés dans 90 mL de solutions à 1 mg/mL de prednisolone dans du méthanol, pendant 72 h à 30 °C et 90 tr/min puis les particules ont été récupérées par filtration et lavées avec un minimum d'eau ultrapure, avant d'être séchées à l'étuve (37 °C). Elles ont ensuite été broyées et tamisées entre 63 et 300 μ m. D'après l'étude sur la composition du CoPEC β CD-chitosan/alginate du chapitre 3, dans les 50 mg de CoPEC, il y avait 23 mg de β CD-chitosan, soit 0,013 mmol de β -cyclodextrine. Avec 90 mg de prednisolone en solution, soit 0,25 mmol, nous étions donc à nouveau en présence d'un excès de prednisolone favorable à son inclusion dans les cyclodextrines du CoPEC.

III. 3. 3. Extraction et dosage de la prednisolone incluse dans les CoPEC

Un protocole similaire à celui d'extraction du piroxicam a été employé pour l'extraction de la prednisolone.

5,3 mg de CoPEC chitosan/alginate et 5,4 mg de CoPEC β CD-chitosan/alginate contenant de la prednisolone ont été incubés dans 45 mL de dichlorométhane à 30 °C et

130 tr/min pendant 24 h. Le solvant contenant la prednisolone extraite a été récupéré par filtration et les particules ont été lavées avec du dichlorométhane pour s'assurer de récupérer toute la prednisolone extraite. La prednisolone extraite a été isolée sous forme solide par évaporation du solvant sous pression réduite.

Afin de quantifier cette prednisolone extraite, un dosage par spectrophotométrie UV-Visible, inspiré du travail de Ashok *et al.*,³⁴⁶ a été mis en œuvre. La prednisolone extraite a ainsi été dissoute dans 40 mL de méthanol. Une gamme de solutions de prednisolone dans du méthanol, avec des concentrations allant de 1,25 à 10 mg/L, a également été préparée. Les absorbances à 244 nm des différentes solutions ont alors été mesurées. La courbe étalon construite (**Figure 101**) étant linéaire, la loi de Beer-Lambert a de nouveau pu être utilisée et a permis de quantifier la prednisolone extraite des deux types de CoPEC.

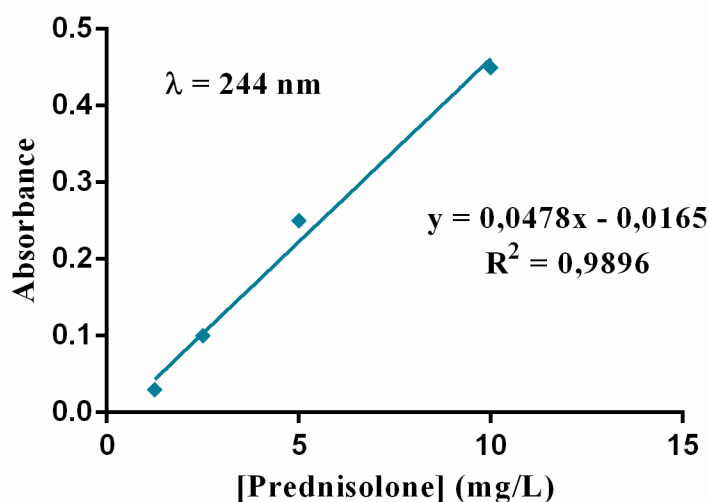


Figure 101 : Courbe étalon pour le dosage de la prednisolone.

D'après cette courbe étalon, les concentrations des solutions de prednisolone extraite des microparticules de CoPEC chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate étaient respectivement de 3,27 mg/L et 6,41 mg/L. Ces solutions étant chacune d'un volume de 40 mL, on peut en conclure que 0,13 mg et 0,26 mg de prednisolone ont respectivement été extraits des microparticules de CoPEC chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate. Les masses de microparticules de CoPEC desquelles ont été extraites ces quantités de prednisolone étant de 5,3 mg et 5,4 mg respectivement pour les CoPEC chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate, on peut en conclure des teneurs de 25 μ g de prednisolone/mg de CoPEC chitosan/alginate et 48 μ g de prednisolone/mg de CoPEC β CD-chitosan/alginate.

Tout comme avec le piroxicam, la cyclodextrine permet une inclusion plus importante de prednisolone dans le matériau. De plus, une certaine inclusion non spécifique, avec de la prednisolone probablement piégée dans le CoPEC mais en dehors des cyclodextrines, est à nouveau observée.

III. 3. 4. Évaluation de l'impact de l'inclusion de prednisolone dans le CoPEC β CD-chitosan/alginate sur la production d'oxyde nitrique par des macrophages activés

Afin d'évaluer l'impact de la présence de prednisolone sur l'effet anti-inflammatoire du CoPEC β CD-chitosan/alginate, des tests *in vitro* comparables à ceux menés avec le CoPEC contenant le piroxicam ont été conduits. Cette fois, étant donnée la concentration en prednisolone dans le CoPEC (48 μ g/mg), afin de conserver la gamme de concentrations en substance active utilisée (de l'ordre de 25, 50, 100 et 200 μ g/mL), des concentrations en CoPEC de 0,5, 1,1, 2,2 et 4,3 mg/mL ont été engagées. En fin de manipulation, les quantités de nitrites dans les surnageants des macrophages traités et activés par du LPS ont été dosées par test de Griess (**Figure 102**).

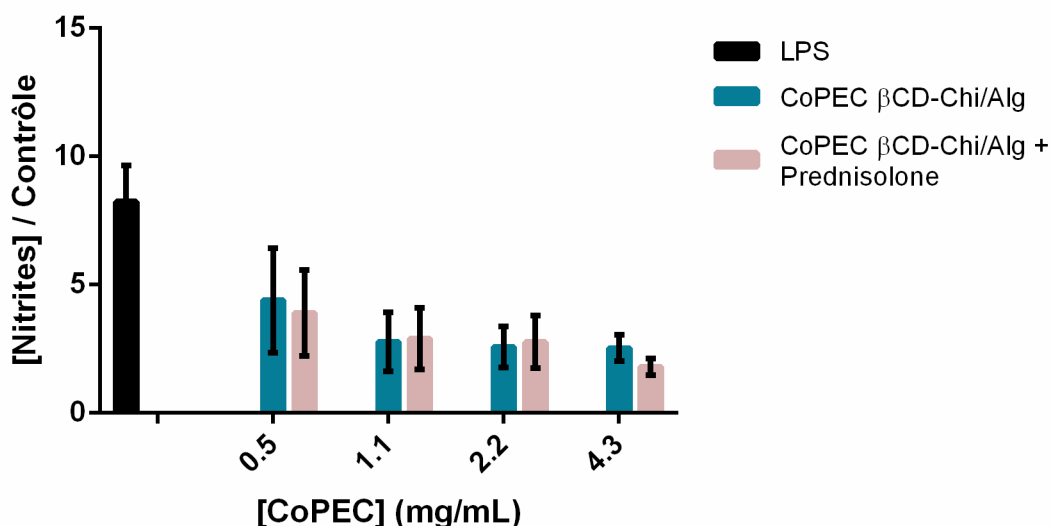


Figure 102 : Concentrations en nitrites mesurées par test de Griess ($n = 2$) dans les surnageants de cellules RAW 264.7 traitées avec des microparticules de CoPEC β CD-chitosan/alginate contenant ou pas de la prednisolone et activées par du LPS, par rapport à la concentration mesurée dans les surnageants de cellules RAW 264.7 non traitées et non activées par du LPS.

De manière similaire au cas du CoPEC contenant le piroxicam, il peut être constaté que la présence de prednisolone ne permet pas d'avoir un effet significativement plus important du CoPEC β CD-chitosan/alginate sur la production de NO par les macrophages activés par du LPS.

III. 3. 5. Évaluation de l'impact de l'inclusion de prednisolone dans le CoPEC β CD-chitosan/alginate sur la production de TNF- α par des macrophages activés

Afin de compléter l'étude, la production de TNF- α par les macrophages traités avec le CoPEC β CD-chitosan/alginate avec et sans prednisolone et activés par du LPS a été évaluée par test ELISA dans les surnageants des macrophages en fin d'expérience (**Figure 103**).

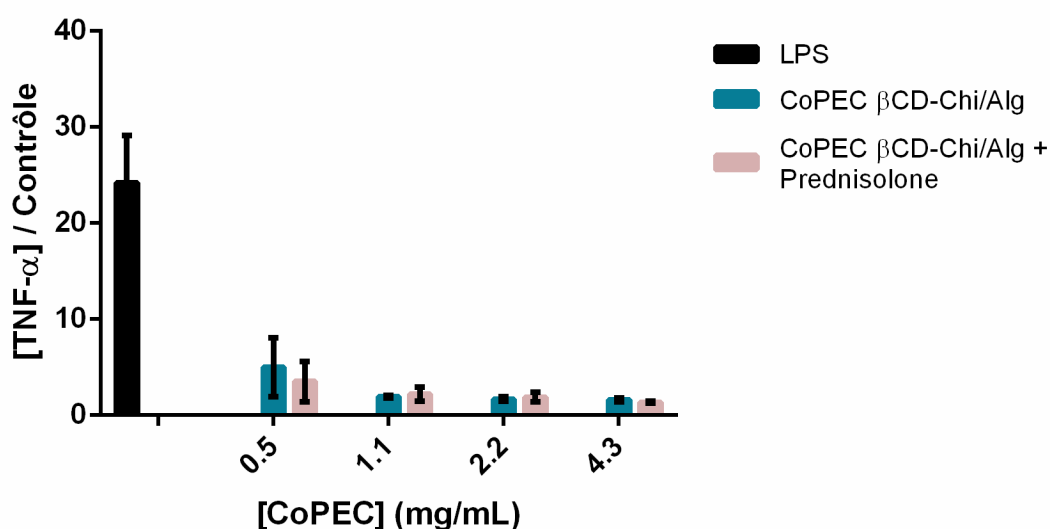


Figure 103 : Concentrations en TNF- α mesurées par test ELISA ($n = 2$) dans les surnageants de cellules RAW 264.7 traitées avec des microparticules de CoPEC β CD-chitosan/alginate contenant ou pas de la prednisolone et activées par du LPS, par rapport à la concentration mesurée dans les surnageants de cellules RAW 264.7 non traitées et non activées par du LPS.

De manière cohérente avec les résultats du test de Griess, la présence de prednisolone ne permet pas d'accentuer la diminution de production de TNF- α par les macrophages activés par du LPS et traités avec le CoPEC β CD-chitosan/alginate.

Ainsi, il semble que, tout comme dans le cas du piroxicam, la présence de prednisolone dans le CoPEC β CD-chitosan/alginate n'améliore pas significativement l'effet du matériau sur la production d'oxyde nitrique et de TNF- α par des macrophages activés par

du LPS. Afin d'évaluer l'effet de concentrations similaires en prednisolone sur le même modèle *in vitro* d'inflammation mais en s'affranchissant du matériau, un complexe β -cyclodextrine/prednisolone a été préparé.

III. 3. 6. Évaluation de l'effet d'un complexe d'inclusion β -cyclodextrine/prednisolone dans le cadre du modèle *in vitro* d'inflammation

III. 3. 6. 1. Préparation d'un complexe d'inclusion β -cyclodextrine/prednisolone

Un complexe d'inclusion β -cyclodextrine/prednisolone de référence a été préparé en s'inspirant du travail d'Ali *et al.*³⁴⁷ Un mélange physique de quantités équimolaires de β -cyclodextrine et de prednisolone a ainsi été humidifié avec un minimum d'un mélange éthanol/eau 15/85 v/v puis a été trituré jusqu'à l'obtention d'une pâte. Cette pâte a ensuite été séchée sous vide pendant 24 h puis à l'étuve pendant 6 jours afin d'obtenir une poudre de complexes d'inclusion β -cyclodextrine/prednisolone sèche qui a été utilisée sans autre forme de purification.

III. 3. 6. 2. Évaluation de l'effet du complexe d'inclusion β -cyclodextrine/prednisolone sur la production d'oxyde nitrique par des macrophages activés

La procédure *in vitro* utilisée pour l'évaluation biologique du CoPEC β CD-chitosan/alginate contenant la prednisolone a également été employée pour évaluer biologiquement le complexe d'inclusion β -cyclodextrine/prednisolone. Des solutions de complexes β -cyclodextrine/prednisolone contenant des quantités de prednisolone comparables à celles utilisées dans le cas des suspensions de CoPEC β CD-chitosan/alginate contenant la substance active, c'est-à-dire de l'ordre de 25, 50, 100 et 200 $\mu\text{g/mL}$, ont alors été préparées et testées. En fin de manipulation, les quantités de nitrites présentes dans les surnageants des macrophages traités avec les complexes et activés par du LPS ont été déterminées par un test de Griess (**Figure 104**). Les résultats sont alors ici comparés à ceux obtenus avec le CoPEC β CD-chitosan/alginate dont les suspensions étaient de concentrations massiques correspondantes à celles des suspensions de CoPEC β CD-chitosan/alginate + prednisolone, elles-mêmes présentant des concentrations en prednisolone

de l'ordre de 25, 50, 100 et 200 $\mu\text{g/mL}$ donc comparables à celles présentées dans le cas du complexe d'inclusion β -cyclodextrine/prednisolone.

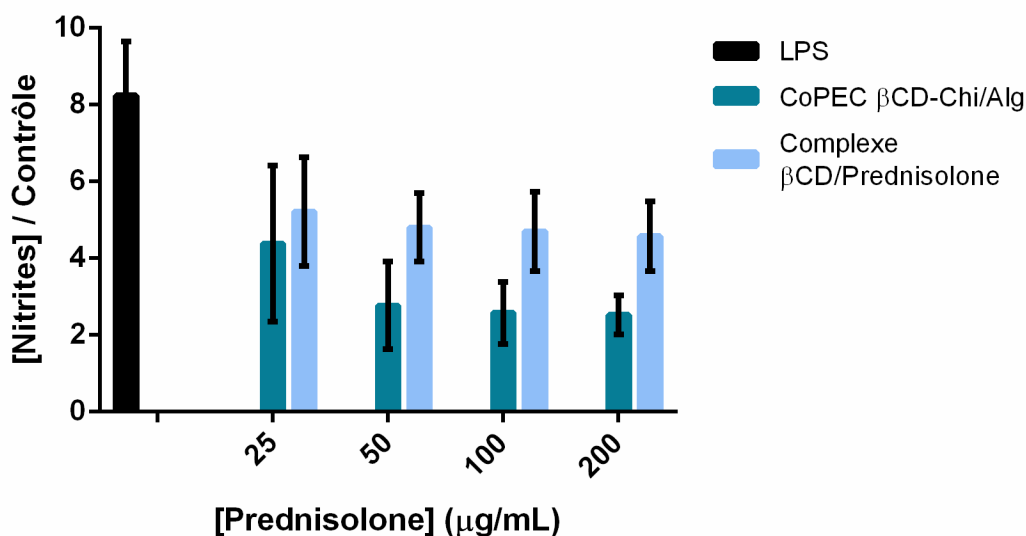


Figure 104 : Concentrations en nitrites mesurées par test de Griess ($n = 2$) dans les surnageants de cellules RAW 264.7 traitées avec des microparticules de CoPEC β CD-chitosan/alginate ou avec un complexe d'inclusion β -cyclodextrine/prednisolone et activées par du LPS, par rapport à la concentration mesurée dans les surnageants de cellules RAW 264.7 non traitées et non activées par du LPS.

Il peut alors être constaté que le complexe d'inclusion β -cyclodextrine/prednisolone engendre une légère diminution de la production d'oxyde nitrique par les macrophages activés. Néanmoins, cet effet paraît très limité et semble bien moins important que l'effet produit par le CoPEC β CD-chitosan/alginate. Il peut alors être supposé que, tout comme dans le cas du piroxicam, la quantité de prednisolone qui peut être incluse dans le CoPEC β CD-chitosan/alginate n'est pas suffisante pour que l'effet additif de cette substance active soit perçu, le CoPEC ayant lui-même un effet anti-inflammatoire très important.

Ainsi, ces dernières études ont permis de confirmer que deux substances actives différentes, le piroxicam et la prednisolone, peuvent être incluses dans les CoPEC chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate et que le potentiel d'inclusion est logiquement plus important dans le cas où le CoPEC contient des cyclodextrines. Des tests *in vitro* avec le CoPEC β CD-chitosan/alginate contenant le piroxicam ou la prednisolone ont mis en exergue que l'effet intrinsèque du matériau démontré dans la partie II est tellement important que les quantités de substance active pouvant être incluses dans celui-ci ne permettent pas d'apporter

un effet supplémentaire au CoPEC vis-à-vis de l'inflammation. Cependant, ces résultats ouvrent des perspectives très intéressantes pour ce matériau car il pourrait être envisagé d'y incorporer des molécules ayant un effet autre qu'anti-inflammatoire afin d'obtenir un biomatériau à double-effet thérapeutique.

IV. Développement d'une stratégie d'inclusion de molécules hydrophiles dans le CoPEC β CD-chitosan/alginate

La cavité interne des β -cyclodextrines étant hydrophobe, la présence de ces dernières au sein des CoPEC ne permet de former des complexes d'inclusion qu'avec des molécules hydrophobes par des interactions spécifiques. Afin de donner aux CoPEC la capacité de délivrer également des molécules hydrophiles, une nouvelle stratégie a alors été imaginée.

IV. 1. Principe de la stratégie d'inclusion de molécules hydrophiles dans le CoPEC β CD-chitosan/alginate

La stratégie imaginée consiste à utiliser un lien chimique entre les cyclodextrines et la molécule hydrophile qu'il est envisagé d'incorporer dans le matériau. Ce lien est alors composé de deux parties : une partie hydrophobe et une partie présentant une fonction maléimide. La partie hydrophobe permet de former un complexe d'inclusion avec la β -cyclodextrine présente dans le CoPEC tandis que la fonction maléimide permet de coupler n'importe quelle molécule possédant une fonction réactive par rapport à cette fonction, telle qu'une fonction thiol (-SH) par exemple. De cette manière, toute molécule, en particulier hydrophile, possédant une fonction thiol par exemple pourra être indirectement incorporée dans les β -cyclodextrines présentes dans le matériau.

Dans le cadre de cette stratégie, deux groupements hydrophobes connus pour former un complexe d'inclusion avec la β -cyclodextrine ont été envisagés : l'adamantane²⁴⁰ et le cholestérol.²⁴⁵ Deux molécules (**Figure 105**) ont alors été synthétisées (voir le détail des synthèses dans le chapitre 2).

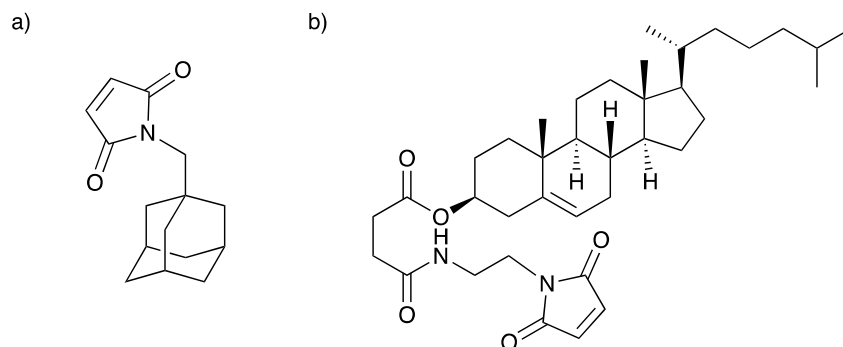


Figure 105 : Molécules à base a) d'adamantane et b) de cholestérol synthétisées et impliquées dans la stratégie d'inclusion de molécules hydrophiles dans le CoPEC β CD-chitosan/alginate.

La **Figure 106** illustre alors la stratégie développée dans le cas de la molécule à base d'adamantane. Les cyclodextrines liées au CoPEC et accueillant les molécules d'adamantane comportant une fonction maléimide peuvent y être distinguées. Les fonctions maléimide, ressortant des cavités hydrophobes des cyclodextrines, sont alors disponibles pour réagir avec la fonction thiol d'une molécule extérieure.

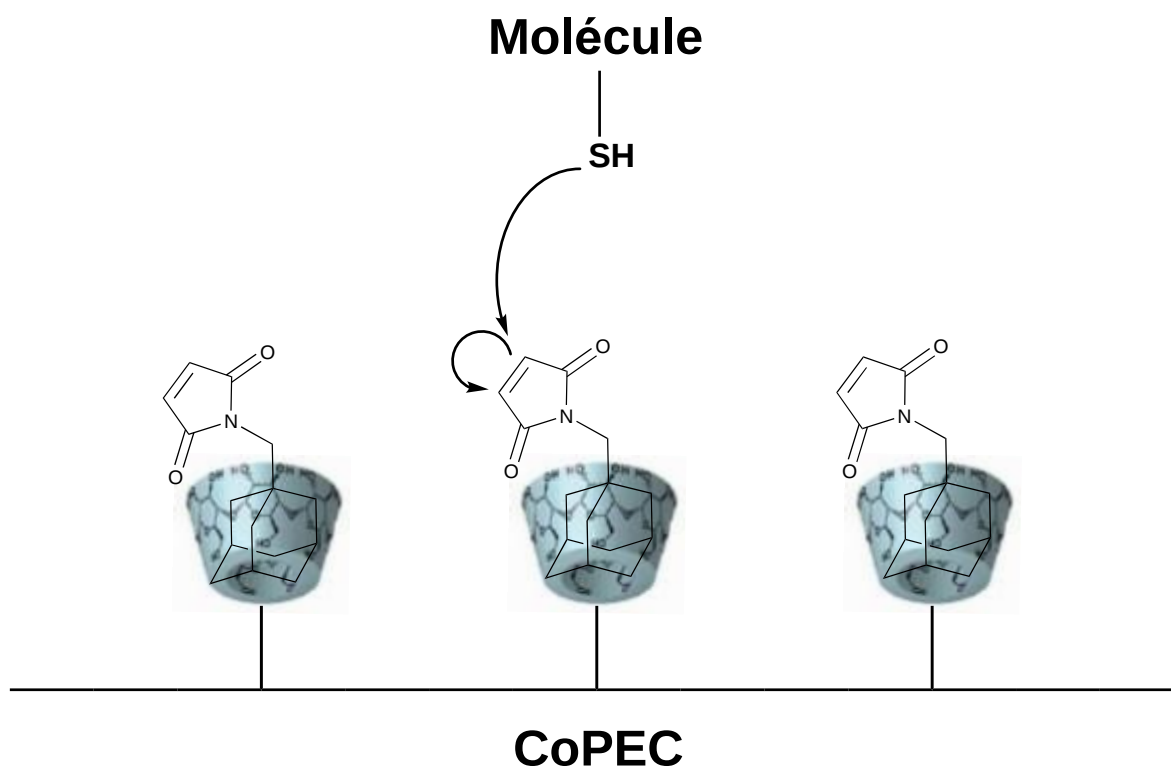


Figure 106 : Illustration de la stratégie d'inclusion de molécules hydrophiles dans le CoPEC β CD-chitosan/alginate dans le cas de la molécule à base d'adamantane.

IV. 2. Validation expérimentale de la stratégie d'inclusion de molécules hydrophiles dans le CoPEC β CD-chitosan/alginate dans le cas de la molécule d'adamantane contenant une fonction maléimide

IV. 2. 1. Synthèse de la rhodamine-SH comme sonde modèle

Afin de vérifier la faisabilité de la stratégie d'inclusion détaillée en IV. 1., une molécule de rhodamine-SH, pouvant se fixer sur une fonction maléimide et pouvant en même temps être suivie en spectrophotométrie, a été synthétisée.

Lors de cette synthèse, inspirée du travail de Gasparini *et al.*,³⁴⁸ un lien amide est formé entre la fonction acide carboxylique de la 5(6)-carboxytétraméthyl-rhodamine et la fonction amine du chlorhydrate de L-cystéine éthyl ester (**Schéma 12**). Ce couplage a été effectué dans du DMF pendant 24 h à température ambiante, sous atmosphère d'argon, à l'abri de la lumière et en présence de PyBOP en tant qu'agent de couplage. L'avancement de la réaction et la disparition de la cystéine ont été attestés par CCM. Le solvant a alors été éliminé par évaporation sous pression réduite, le résidu a été repris dans du MeOH puis le produit brut a été précipité par ajout d'Et₂O. Le produit brut a été repris dans du CHCl₃ avant d'être purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice. La rhodamine-SH a finalement été obtenue avec un rendement de 11 %.

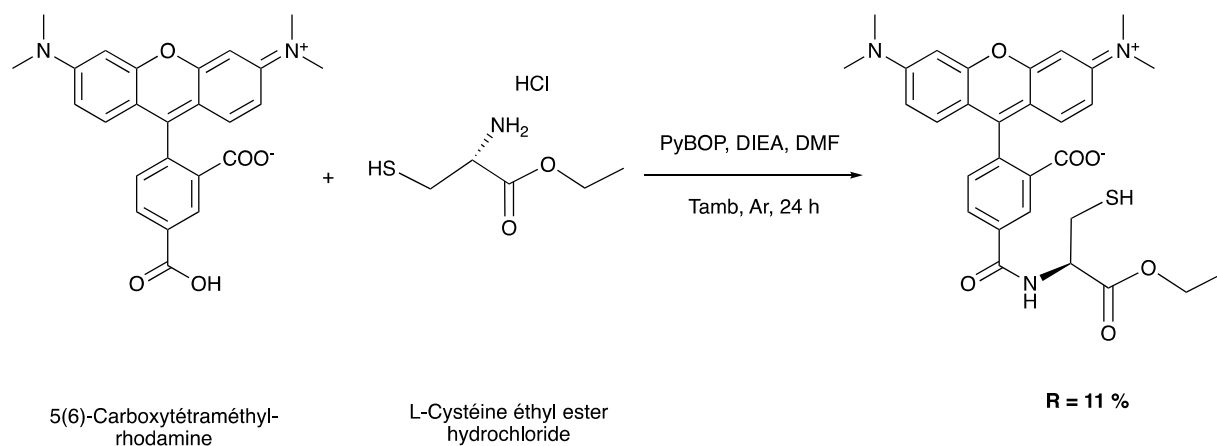


Schéma 12 : Synthèse de la rhodamine-SH.

La ¹H RMN du produit a permis de confirmer la réussite de la synthèse (**Figure 107**). Des signaux correspondant à la partie 5(6)-carboxytétraméthylrhodamine entre 6,9 et 8,6 ppm

et à 1,29 ppm, ainsi qu'à la partie cystéine éthyl ester à 4,27 et 1,33 ppm ont en effet pu être obtenus et le rapport des intégrations des signaux propres à chacune des deux parties a bien suggéré la présence d'une molécule de chaque partie dans le produit final.

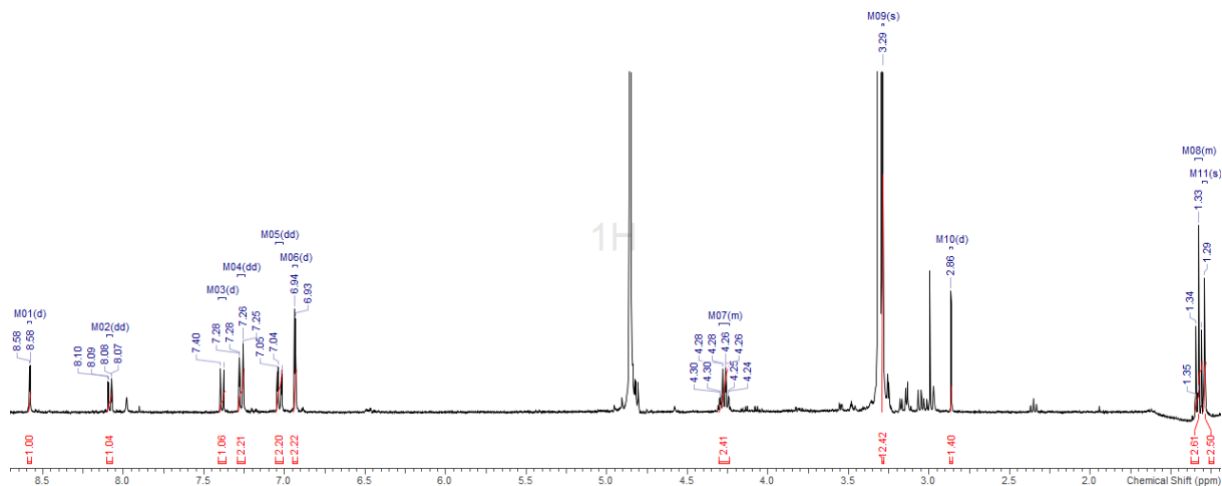


Figure 107 : Spectre ^1H RMN de la rhodamine-SH.

De plus, l'acquisition d'un spectre d'absorbance UV-Visible d'une solution de la rhodamine-SH synthétisée dans du chloroforme (**Figure 108**) a permis de déterminer la longueur d'onde d'absorption maximale du composé, de 544 nm (soit un léger décalage par rapport à la longueur d'onde d'absorption maximale de la 5(6)-carboxytétraméthylrhodamine de départ, de 555 nm).

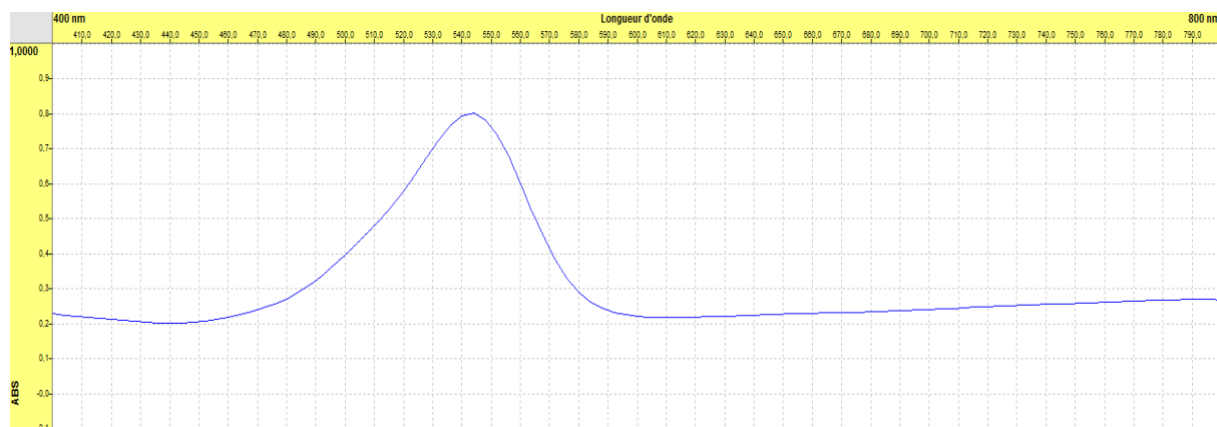


Figure 108 : Spectre d'absorption d'une solution de rhodamine-SH dans du chloroforme.

IV. 2. 2. Inclusion du *N*-adamantylméthyl maléimide dans des membranes chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate

Le *N*-adamantylméthyl maléimide **9** dont la synthèse a été décrite dans le chapitre 2 a été inclus dans des membranes chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate (toutes deux présentant une masse de 30 mg), préparées dans une plaque de 24 puits, selon une stratégie similaire à celle employée pour l'inclusion des deux substances actives dans les CoPEC.

D'après les résultats précédents, lors de la préparation de CoPEC β CD-chitosan/alginate, tout l'alginate se retrouve dans le CoPEC final. D'après la méthode de formulation employée dans le cas des membranes utilisées lors de cette étude, cela signifie que la membrane β CD-chitosan/alginate contenait ici 20 mg d'alginate et donc 10 mg de β CD-chitosan. En suivant les mêmes raisonnements que dans le chapitre 3, le β CD-chitosan utilisé pour la formulation de cette membrane ayant un degré de substitution de 19 %, cela implique que 5,1 μ mol de β -cyclodextrine se trouvaient dans la membrane. Lors de l'inclusion du *N*-adamantylméthyl maléimide, un léger excès de cette molécule (6,1 μ mol soit 1,2 équivalent) par rapport aux cyclodextrines a alors été utilisé.

Les membranes ont été immergées dans des solutions de méthanol contenant le *N*-adamantylméthyl maléimide **9** pendant 48 h à 30 °C et 80 tr/min. De la même manière que lors de l'inclusion des substances actives, le méthanol étant plutôt hydrophile, ce solvant poussait alors les molécules d'adamantane à former des complexes d'inclusion avec les cyclodextrines contenues dans la membrane. Après l'inclusion, un lavage d'une heure à l'eau ultrapure des membranes a permis d'éliminer le *N*-adamantylméthyl maléimide se trouvant en surface des matériaux.

IV. 2. 3. Réaction de la rhodamine-SH avec le *N*-adamantylméthyl maléimide inclus dans les membranes chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate

Afin de vérifier la pertinence de la stratégie développée, un essai de réaction entre la rhodamine-SH synthétisée (voir en IV. 2. 1.) et le *N*-adamantylméthyl maléimide se trouvant dans les membranes (tout particulièrement dans celle contenant les cyclodextrines) a été réalisé.

Au cours de cet essai, un léger excès de rhodamine-SH (7,5 μ mol soit 1,5 équivalent) par rapport aux cyclodextrines présentes dans la membrane β CD-chitosan/alginate (et donc *a*

priori par rapport aux molécules de *N*-adamantylméthyl maléimide incluses) a été engagé. Les membranes chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate après inclusion du *N*-adamantylméthyl maléimide ont ainsi été immergées dans des solutions de rhodamine-SH dans du chloroforme, ce solvant étant d'après des essais un des seuls permettant de dissoudre la rhodamine-SH. Cette immersion a été réalisée à température ambiante et sur une durée de seulement 30 minutes. En effet, le chloroforme étant un solvant hydrophobe, cette courte durée permettait d'éviter une sortie du *N*-adamantylméthyl maléimide des cyclodextrines. De plus, les cinétiques associées aux réactions thiol-maléimide étant rapides,³⁴⁹ cette durée était dans un même temps suffisante pour que les réactions thiol-maléimide se produisent. Après les 30 minutes de réaction, les membranes ont été lavées rapidement et avec un faible volume de chloroforme afin d'éliminer la rhodamine-SH se trouvant en surface des matériaux (**Figure 109**). Les surnageants, contenant alors la rhodamine-SH ne s'étant pas incluse dans les membranes, ont été récupérés et la rhodamine-SH non incluse a finalement été collectée sous forme solide par évaporation du solvant sous pression réduite afin de pouvoir être ultérieurement quantifiée par spectrophotométrie.

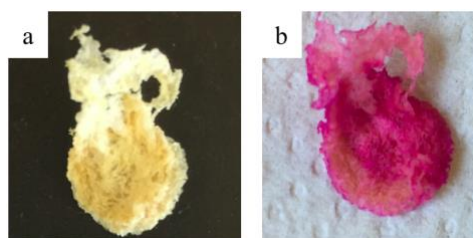


Figure 109 : Membrane β CD-chitosan/alginate a) avant et b) après inclusion du *N*-adamantylméthyl maléimide et réaction avec la rhodamine-SH.

IV. 2. 4. Quantification de la rhodamine-SH incluse dans les membranes chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate

La rhodamine-SH non incluse dans les deux membranes a été quantifiée par spectrophotométrie UV-Visible, à 544 nm (la longueur d'onde d'absorption maximale du fluorophore).

Une gamme de solutions de rhodamine-SH dans du chloroforme avec des concentrations allant de 10,5 à 84 mg/L a alors été préparée. La rhodamine-SH non incluse dans les deux membranes a été dissoute dans 20 mL de CHCl_3 puis les deux solutions obtenues ont été diluées au 1/5 dans du CHCl_3 . Les absorbances à 544 nm des échantillons et

des solutions constituant la gamme ont été mesurées au spectrophotomètre UV-Visible et la courbe étalon obtenue (**Figure 110**) étant linéaire, elle a permis de quantifier la rhodamine-SH non incluse dans les matériaux.

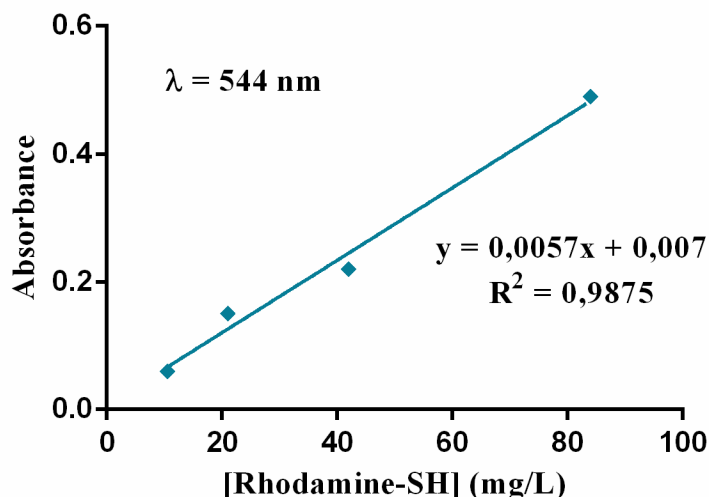


Figure 110 : Courbe étalon pour le dosage de la rhodamine-SH.

Les solutions obtenues à partir de la rhodamine-SH non incluse dans les membranes chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate avaient respectivement des absorbances de 0,24 et 0,18. D'après la courbe étalon et en tenant compte de la dilution des solutions, il peut alors être déduit que respectivement 4,09 et 3,04 mg de rhodamine-SH sur les 4,2 mg de départ ne se sont pas inclus dans les membranes chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate. Il en est déduit que seulement 0,11 mg (0,2 μ mol soit moins de 3 % de la quantité de rhodamine-SH ajoutée initialement) de rhodamine-SH s'est inclus dans la membrane chitosan/alginate, tandis que 1,16 mg (2,1 μ mol soit 28 % de la quantité de rhodamine-SH ajoutée initialement) de rhodamine-SH s'est inclus dans la membrane β CD-chitosan/alginate.

De cette expérience, il peut alors être considéré que la stratégie mise en œuvre est efficace dans le cadre de l'inclusion de molécules, en particulier hydrophiles, dans le CoPEC β CD-chitosan/alginate. En effet, les molécules d'adamantane contenant une fonction maléimide qui ont été incluses dans les cyclodextrines du matériau ont permis de former une sorte d'ancre qui est alors disponible pour y coupler une molécule contenant une fonction thiol. Le contrôle constitué par la membrane chitosan/alginate ne contenant pas de cyclodextrines, qui n'a quasiment pas donné lieu à une fixation de rhodamine-SH (moins de 3 % de la quantité ajoutée initialement) au sein du matériau, permet en outre de conclure que ce sont bien les cyclodextrines qui permettent d'accueillir les molécules d'adamantane et par

conséquent qui permettent d'inclure des molécules contenant un groupement thiol dans les matériaux. Ces molécules étant alors *a priori* incluses *via* des interactions faibles avec les cyclodextrines, elles devraient donc pouvoir être libérées lors d'une utilisation du matériau à des fins thérapeutiques. Afin de confirmer la validité de cette stratégie, des tests similaires impliquant les molécules de cholestérol contenant une fonction maléimide dont la synthèse est détaillée dans le chapitre 2 devront être effectués dans un avenir proche.

Ainsi, une stratégie permettant d'incorporer des molécules hydrophiles, présentant un groupement réactif vis-à-vis de fonctions maléimides, au sein des matériaux à base d'alginate et de β CD-chitosan a été mise en place avec succès. Cette stratégie permet alors de compléter la capacité d'accueil de molécules dans les matériaux, initialement exclusivement réservés à l'accueil de molécules hydrophobes dans les cyclodextrines. Cela laisse prédire un futur prometteur pour ces matériaux, qui ont désormais, en plus de leur effet anti-inflammatoire intrinsèque, la capacité d'accueillir un nombre incalculable de molécules actives et dont les capacités thérapeutiques peuvent alors être ajustées en fonction de l'application envisagée.

V. Conclusion partielle

Ainsi, les différents CoPEC à base d'alginate, de chitosan, de β CD-alginate et de β CD-chitosan préparés par ultracentrifugation ont été évalués, sous forme de microparticules, dans le cadre d'un modèle *in vitro* d'inflammation impliquant des macrophages activés par du lipopolysaccharide. Les CoPEC chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate, non cytotoxiques, ont montré des propriétés anti-inflammatoires très intéressantes en réduisant la production d'oxyde nitrique et de cytokine pro-inflammatoire TNF- α ainsi que l'expression du marqueur d'activation CD40 par les macrophages activés et en « restaurant » la prolifération cellulaire. Un effet légèrement plus marqué a pu être noté dans le cas du CoPEC β CD-chitosan/alginate et il a été montré que l'effet anti-inflammatoire de ce CoPEC n'est pas dû à un piégeage du LPS ou des cytokines dans les cyclodextrines présentes au sein du matériau. Ces deux CoPEC possèdent donc des propriétés anti-inflammatoires intrinsèques et une étude permet de présumer que ces propriétés proviennent du chitosan et du β CD-chitosan. Ce caractère anti-inflammatoire intrinsèque, rarement observé dans des biomatériaux, constitue alors un avantage certain pour l'utilisation biomédicale de ces CoPEC, en particulier dans le cadre de la prise en charge de maladies inflammatoires chroniques telles que l'arthrose ou même le cancer.

Deux études, impliquant deux substances actives anti-inflammatoires hydrophobes modèles, le piroxicam et la prednisolone, ont permis de confirmer que ces molécules actives peuvent s'inclure dans les CoPEC chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate et que l'inclusion est, de manière logique, plus importante en présence des cyclodextrines. Des études selon le modèle *in vitro* d'inflammation ont cependant révélé que la présence de ces anti-inflammatoires dans le CoPEC β CD-chitosan/alginate n'améliore pas de manière significative l'effet anti-inflammatoire de ce matériau, cet effet étant déjà très important dans le cas du CoPEC seul. Ces études ouvrent alors des perspectives prometteuses pour le CoPEC β CD-chitosan/alginate car il peut maintenant être envisagé d'inclure d'autres types de substances actives apportant des propriétés que le CoPEC ne possède pas intrinsèquement, afin de développer des matériaux ayant simultanément plusieurs effets thérapeutiques.

Finalement, afin de ne pas restreindre la capacité de vectorisation du nouveau CoPEC β CD-chitosan/alginate aux seules molécules actives hydrophobes, une stratégie d'inclusion de molécules hydrophiles a été imaginée et mise en œuvre dans un premier temps sur des membranes préparées par sédimentation et évaporation. Cette stratégie est alors basée sur

l'utilisation d'un lien constitué d'une partie formant un complexe d'inclusion avec les β -cyclodextrines présentes dans les matériaux, comme l'adamantane, et d'une fonction maléimide qui peut alors servir d'ancre pour coupler diverses molécules hydrophiles contenant une fonction réactive avec la fonction maléimide, comme un thiol par exemple. Cette stratégie a alors été validée par l'utilisation d'une molécule de 5(6)-carboxytétraméthylrhodamine modifiée contenant une fonction thiol et permet alors d'élargir la gamme de molécules actives pouvant être incluses dans le CoPEC β CD-chitosan/alginate développé.

VI. Partie expérimentale

VI. 1. Généralités

VI. 1. 1. Chimie

Les solvants étaient obtenus commercialement et utilisés sans purification préalable.

L'eau ultrapure (18 m Ω) était obtenue à partir d'un appareil Elga de chez Veolia.

Le chitosan (poids moléculaire moyen de 250 000 g/mol, viscosité de 30-100 cP, degré de désacétylation > 90 %) était de chez Glentham Life Sciences et l'alginate de sodium (poids moléculaire moyen de 155 000 g/mol, viscosité de 15-20 cP, taux M/G de 1,56) de chez Sigma-Aldrich. Le piroxicam, la β -cyclodextrine et la DIEA provenaient de chez Alfa Aesar, la prednisolone de chez Sigma-Aldrich. La 5(6)-carboxytétraméthyl-rhodamine et le PyBOP étaient de chez Novabiochem et le chlorhydrate de L-cystéine éthyl ester de chez Acros Organics.

Les CCM ont été réalisées sur des plaques de gel de silice 60 F₂₅₄ de chez Merck.

Les analyses de spectrophotométrie UV-Visible ont été effectuées sur un spectrofluorimètre FLX-Xenius *via* le logiciel SP 2000 de chez SAFAS Monaco.

Le spectre RMN a été acquis sur un spectromètre Bruker Advance DPX 400. Le méthanol deutéré était de chez Sigma-Aldrich.

Le rotateur 3D était un modèle PS-M3D de chez Grant Instruments (Cambridge, Royaume-Uni).

VI. 1. 2. Biologie

Les macrophages murins RAW 264.7 (ATCC® TIB-71TM) étaient cultivés dans du DMEM contenant de la glutamine stabilisée, complété avec 5 % (v/v) de SVF et éventuellement 1000 U/mL de pénicilline et 100 μ g/mL de streptomycine, à 37 °C, 5 % de CO₂ et 95 % d'humidité. Tous les milieux et compléments provenaient de chez Sigma-Aldrich.

Le LPS d'*Escherichia coli* (K12) était de chez Invivogen (San Diego, CA)

Pour les tests ELISA, les anticorps murins anti-TNF- α purifiés (clone 1F3F3D4) et biotinylés (clone XT3/XT22) étaient de chez eBioscience/ThermoFischer Scientific. Les anticorps murins anti-IL-6 purifiés (clone MPS-20F3) et biotinylés (clone MPS-32C11) provenaient de chez BioLegend. L'avidine-HRP provenait de chez Jackson (West Grove, PA).

Pour la cytométrie, le cytomètre était un FACSCalibur de chez BD (Franklin Lake, NJ). Le logiciel CellQuest a été utilisé pour l'acquisition des données. L'analyse des données a été faite *via* le logiciel FlowJo (FlowJo Inc). La « Fixable Viability Dye » (FVD) eFLUOR™ 660 et l'anticorps monoclonal clone SolA15 Ki-67 étaient de chez eBioscience. Le CD40 APC clone 3/23 provenait de chez BD Biosciences (San Jose, CA).

Les analyses statistiques ont été menées avec le logiciel GraphPad Pism 5.0 en effectuant une ANOVA à comparaisons multiples à deux facteurs sur mesures répétées avec une correction de Sidak.

VI. 2. Quantification des différents marqueurs utilisés pour évaluer l'effet des matériaux sur les cellules

VI. 2. 1. Évaluation de la viabilité des cellules

L'évaluation de la viabilité des macrophages a été réalisée par cytométrie en flux à partir des cellules récupérées en fin d'expérience.

Les cellules sont récupérées à environ 90 % de confluence en utilisant une solution de trypsine (0,5 g/L) - EDTA (0,2 g/L) pendant 5 minutes à 37 °C puis sont diluées dans du milieu de culture. Du PBS complété avec 2 % de SVF est utilisé pour laver et diluer le FVD et les cellules. Les cellules (10^5) sont marquées avec du Fixable Viability Dye eFLUORTM 660 dilué au 1/2000 pendant 10-15 minutes à 37 °C. Les cellules sont ensuite analysées au cytomètre.

VI. 2. 2. Quantification de la production d'oxyde nitrique par les macrophages

Les concentrations en nitrites, eux-mêmes représentatifs de la production d'oxyde nitrique par les macrophages, dans les surnageants cellulaires, étaient déterminées par un test de Griess. 60 μ L de réactif de Griess (mélange v/v de solutions de p-aminobenzene

sulfonamide 58,1 mM dans du CH_3COOH 30 % aqueux et de *N*-(1-naphtyl)ethylenediamine dihydrochloride 3,9 mM dans du CH_3COOH 60 % aqueux) sont ajoutés à 40 μL de surnageant cellulaire puis l'absorbance à 543 nm de la solution ainsi obtenue est acquise et comparée à une courbe d'étalonnage préparée à partir de solutions de nitrite de sodium.

VI. 2. 3. Quantification de la production de $\text{TNF-}\alpha$ par les macrophages

La quantification de la production de $\text{TNF-}\alpha$ par les macrophages est effectuée par test ELISA sur les surnageants cellulaires. L'anticorps de capture (anticorps murin anti- $\text{TNF-}\alpha$ purifié), dilué à 1 $\mu\text{g/mL}$ dans un tampon carbonate/bicarbonate 0,05 M à pH 9,6, est fixé pendant une nuit à 4 °C avant d'être bloqué par ajout de PBS Tween 20 0,05 % BSA 1 % (1 h, 37 °C). Les échantillons (surnageants cellulaires) sont ensuite dilués dans du PBS et incubés avec l'anticorps de capture (2 h, 37 °C) avant que l'anticorps de détection (anticorps murin anti- $\text{TNF-}\alpha$ biotinylé), dilué à 0,5 $\mu\text{g/mL}$ dans du PBS Tween 20 0,05 % BSA 1 %, ne soit ajouté (1 h, 37 °C). L'avidine-HRP est ensuite ajoutée (45 minutes, 37 °C) et la révélation est conduite par ajout d'une solution de tétraméthylbenzidine 1,25 mM et de H_2O_2 13,05 mM dans un tampon citrate 0,1 M à pH 5. La révélation est arrêtée par ajout de HCl 1 M aqueux et l'absorbance des solutions à 450 nm est acquise et comparée à une courbe d'étalonnage construite à partir de solutions standard de $\text{TNF-}\alpha$.

VI. 2. 4. Quantification de la production d'IL-6 par les macrophages

La quantification de la production d'IL-6 par les macrophages est réalisée par un test ELISA selon le même protocole que pour la quantification du $\text{TNF-}\alpha$ à l'exception de la dilution de l'anticorps de capture qui dans le cas de l'IL-6 est faite à 0,5 $\mu\text{g/mL}$.

VI. 2. 5. Quantification de l'expression de CD40 par les macrophages

La quantification de l'expression de CD40 par les macrophages a été réalisée par cytométrie en flux à partir des cellules récupérées en fin d'expérience.

Les cellules sont récupérées à environ 90 % de confluence en utilisant une solution de trypsine (0,5 g/L) - EDTA (0,2 g/L) pendant 5 minutes à 37 °C puis sont diluées dans du milieu de culture. Du PBS complété avec 2 % de SVF est utilisé pour laver et diluer

l'anticorps et les cellules. Les cellules (10^5) sont marquées avec du CD40 APC à 1 $\mu\text{g/mL}$ pendant 15 minutes à 4 °C. Les cellules sont ensuite analysées au cytomètre.

VI. 2. 6. Quantification de l'expression de Ki-67 par les macrophages

La quantification de l'expression de Ki-67 par les macrophages a été réalisée par cytométrie en flux à partir des cellules récupérées en fin des expériences.

Les cellules sont récupérées à environ 90 % de confluence en utilisant une solution de trypsine (0,5 g/L) - EDTA (0,2 g/L) pendant 5 minutes à 37 °C puis sont diluées dans du milieu de culture. Du PBS complété avec 2 % de SVF est utilisé pour laver et diluer l'anticorps et les cellules. Les cellules (10^5) sont fixées avec du PFA 1 % puis elles sont perméabilisées avec de l'acétone pure froide avant d'ajouter du Ki-67 monoclonal à 0,25 $\mu\text{g/mL}$ pendant 1 h à température ambiante. Les cellules sont ensuite analysées au cytomètre.

VI. 3. Déroulement des tests biologiques *in vitro*

VI. 3. 1. Tests biologiques préliminaires sur les CoPEC contenant du β CD-alginate

Ces tests ont été conduits sur trois jours. Le premier jour, 100 000 cellules/puits avec un volume final de milieu de culture (RPMI-1640 AQmedia™ complété avec 10 % (v/v) de SVF, 1000 U/mL de pénicilline et 100 $\mu\text{g/mL}$ de streptomycine) sont incubées dans une plaque de 96 puits à fonds plats pendant 24 h à 37 °C. Le deuxième jour, les cellules sont traitées avec les CoPEC sous forme de microparticules avec des concentrations allant de 0,025 à 1 mg/mL et la plaque est remplacée à 37 °C pendant 24 h. Le troisième jour, les surnageants sont collectés pour des dosages ultérieurs.

VI. 3. 2. Déroulement global des tests *in vitro* pour l'évaluation de l'impact des CoPEC chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate sur l'inflammation

Les études *in vitro* menées sur les CoPEC étaient conduites sur 3 jours. Le premier jour, 50 000 cellules/puits sont incubées avec des suspensions de microparticules de CoPEC

de concentrations allant de 0,0677 à 2,2 mg/mL dans une plaque de 96 puits à fonds plats (volume final de 100 μ L) pour une durée de 24 h à 37 °C. Le deuxième jour, les cellules sont activées avec 50 ng/mL de LPS. Le troisième jour, les surnageants sont récupérés pour les dosages ultérieurs. Lors des études de cytométrie, les cellules sont également collectées le troisième jour.

VI. 3. 3. Évaluation de l'éventuel piégeage du LPS dans le CoPEC β CD-chitosan/alginate

Le premier jour, 100 μ L d'une suspension à 1 mg/mL de CoPEC β CD-chitosan/alginate sous forme de microparticules $\leq 300 \mu\text{m}$ dans du milieu de culture sont incubés avec 10 μ L de LPS à 500 ng/mL pendant 24 h à 37 °C dans une plaque de 96 puits à fonds plats. En parallèle, 50 000 cellules/puits sontensemencées et incubées pendant 24 h à 37 °C dans une autre plaque. Le deuxième jour, le surnageant des cellules est éliminé, le surnageant de l'échantillon de CoPEC est placé sur les cellules après filtration à travers un filtre Flowmi Cell Strainers, 70 μm (Clenceware) et la plaque est à nouveau placée pendant 24 h à 37 °C. Le troisième jour, le surnageant des cellules est récupéré et un dosage de Griess est mené sur celui-ci.

VI. 3. 4. Évaluation de l'éventuel piégeage du TNF- α dans le CoPEC β CD-chitosan/alginate

Le premier jour, 100 μ L d'une suspension à 1 mg/mL de CoPEC β CD-chitosan/alginate sous forme de microparticules $\leq 300 \mu\text{m}$ dans du milieu de culture sont incubés pendant 24 h à 37 °C dans une plaque de 96 puits à fonds plats. Le deuxième jour, 10 μ L d'une solution à 20 ng/mL de TNF- α dans du milieu de culture sont ajoutés dans l'échantillon et la plaque est de nouveau placée 24 h à 37 °C. Le troisième jour, le surnageant de l'échantillon est récupéré et la concentration en TNF- α dans le surnageant est par la suite déterminée par ELISA.

VI. 3. 5. Évaluation de l'impact de l'alginate, du chitosan et du β CD-chitosan sur l'activation des macrophages

Cette étude a été conduite sur 3 jours. Le premier jour, 50 000 cellules/puits sont incubées avec des suspensions ou solutions de polyélectrolytes de concentrations allant de 0,0677 à 2,2 mg/mL dans une plaque de 96 puits à fonds plats (volume final de 100 μ L) pour une durée de 24 h à 37 °C. Le deuxième jour, les cellules sont activées avec 50 ng/mL de LPS. Le troisième jour, les surnageants sont récupérés pour les dosages ultérieurs.

VI. 4. Inclusion de substances actives dans les CoPEC chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate

VI. 4. 1. Inclusion de piroxicam dans les CoPEC chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate

300 mg de microparticules de CoPEC sont incubés dans 90 mL d'une solution à 1 mg/mL de piroxicam dans du MeOH pendant 72 h à 30 °C et 90 tr/min. Les particules sont récupérées par filtration et sont lavées avec un minimum d'eau ultrapure. Elles sont séchées à 37 °C pendant 24 h avant d'être broyées et tamisées à 300 μ m.

Afin de quantifier le piroxicam inclus dans les particules, ce piroxicam est dans un premier temps extrait des particules sèches. Pour cela, 9,9 mg de chaque poudre de CoPEC contenant du piroxicam sont incubés dans 20 mL de CH_2Cl_2 pendant 24 h à 130 tr/min et 30 °C. Le solvant est récupéré par filtration, les particules sont lavées au CH_2Cl_2 et le solvant contenant le piroxicam extrait est évaporé sous pression réduite afin de récupérer l'extraction sous forme solide. Le piroxicam extrait est alors dissous dans 20 mL de MeOH puis dilué au 1/5 dans du HCl 0,1 M aqueux avant d'être quantifié par spectrophotométrie UV-Visible à 333 nm en construisant une courbe d'étalonnage à partir de solutions de piroxicam dans du HCl 0,1 M aqueux, avec une gamme de concentrations allant de 5 à 20 mg/L.

VI. 4. 2. Inclusion de prednisolone dans les CoPEC chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate

50 mg de microparticules de CoPEC sont incubés dans 90 mL d'une solution à 1 mg/mL de prednisolone dans du MeOH pendant 72 h à 30 °C et 90 tr/min. Les particules sont récupérées par filtration et sont lavées avec un minimum d'eau ultrapure. Elles sont séchées à 37 °C pendant 4 jours avant d'être broyées et tamisées entre 63 et 300 μ m.

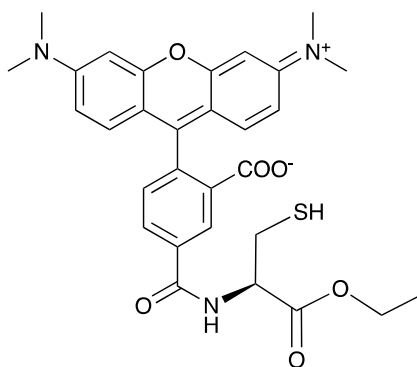
Pour quantifier la prednisolone incluse dans les particules, cette prednisolone est extraite en incubant 5 mg de chaque poudre de CoPEC contenant de la prednisolone dans 45 mL de CH_2Cl_2 pendant 24 h à 130 tr/min et 30 °C. Le solvant est récupéré par filtration, les particules sont lavées au CH_2Cl_2 et le solvant contenant la prednisolone extraite est évaporé sous pression réduite. La prednisolone extraite est alors dissoute dans 40 mL de MeOH puis quantifiée par spectrophotométrie UV-Visible à 244 nm en construisant une courbe d'étalonnage à partir de solutions de prednisolone dans du MeOH, avec une gamme de concentrations allant de 1,25 à 10 mg/L.

VI. 5. Préparation d'un complexe d'inclusion β -cyclodextrine/prednisolone

200 mg (0,18 mmol, 1 éq) de β -cyclodextrine et 63 mg (0,18 mmol, 1 éq) de prednisolone sont mélangés physiquement. Un volume minimal d'un mélange EtOH/ H_2O 15/85 v/v est alors ajouté à la poudre obtenue et le mélange est trituré dans un mortier jusqu'à obtention d'une pâte. La pâte est alors séchée, d'abord sous vide pendant 24 h puis à l'étuve (37 °C) pendant 6 jours. 130 mg de poudre de complexes d'inclusion β -cyclodextrine/prednisolone sont alors obtenus sous forme sèche et la poudre est utilisée dans les tests sans autre forme de purification.

VI. 6. Mise en place de la stratégie d'inclusion de molécules hydrophiles dans les CoPEC

VI. 6. 1. Synthèse de rhodamine-SH



PM = 561,6 g/mol

103 mg (0,24 mmol, 1 éq) de 5(6)-carboxytétraméthyl-rhodamine et 125 mg (0,24 mmol, 1 éq) de PyBOP sont dissous dans 15 mL de DMF anhydre sous atmosphère d'argon. 108 μ L (0,62 mmol, 2,6 éq) de DIEA sont ajoutés et le mélange est agité 5 minutes à température ambiante. 45 mg (0,24 mmol, 1 éq) de chlorhydrate de L-cystéine éthyl ester, préalablement dissous dans 3 mL de DMF anhydre, sont ensuite introduits et le mélange est agité à température ambiante, sous atmosphère d'argon et à l'abri de la lumière pendant 24 h. La disparition de la L-cystéine est suivie par CCM (éluant = $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 5/1 v/v, R_f = 0,76). Le solvant est évaporé sous pression réduite, le résidu est repris dans 1 mL de MeOH puis le produit est précipité par ajout de 20 mL d' Et_2O . Le produit est lavé à l' Et_2O puis il est repris dans du CHCl_3 afin d'être purifié par chromatographie sur colonne (phase stationnaire : silice, éluant : CHCl_3 puis $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 5/1 v/v) pour conduire à 15 mg (0,03 mmol) de rhodamine-SH.

Rendement : 11 %.

^1H RMN, MeOD : δ (ppm) = 8,58 (d, 1H, J = 1,5 Hz), 8,08 (dd, 1H, J = 7,8 ; 1,8 Hz), 7,39 (d, 1H, J = 7,9 Hz), 7,27 (dd, 2H, J = 9,5 ; 1,6 Hz), 7,03 (dd, 2H, J = 9,4 ; 2,1 Hz), 6,93 (d, 2H, J = 2,4 Hz), 4,27 (m, 2H), 3,29 (s, 12H), 2,86 (d, 1H, J = 0,6 Hz), 1,33 (t, 3H, J = 7,1 Hz), 1,29 (s, 3H).

VI. 6. 2. Inclusion de *N*-adamantylméthyl maléimide dans des membranes chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate

Une membrane chitosan/alginate et une membrane β CD-chitosan/alginate (ayant chacune une masse de 30 mg) préparées dans une plaque de 24 puits sont immergées dans des solutions de 1,5 mg (6,1 μ mol) de *N*-adamantylméthyl maléimide dans 10 mL de MeOH et sont placées à 30 °C et 80 tr/min pendant 48 h. Les membranes sont ensuite récupérées et lavées dans 5 mL d'eau ultrapure pendant 1 h.

VI. 6. 3. Réaction entre la rhodamine-SH et le maléimide contenu dans les membranes chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate

Les membranes chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate après inclusion de *N*-adamantylméthyl maléimide sont immergées dans des solutions de 4,2 mg (7,5 μ mol) de rhodamine-SH dans 4,2 mL de CHCl_3 et sont placées sur un rotateur 3D à température ambiante et avec un mouvement orbital à 50 tr/min pendant 30 minutes. Les membranes sont ensuite lavées avec 1 mL de CHCl_3 et les surnageants sont récupérés pour doser la rhodamine-SH non incluse qui est alors récupérée sous forme solide par évaporation du solvant sous pression réduite.

VI. 6. 4. Dosage de la rhodamine-SH non incluse dans les membranes chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate

La rhodamine-SH non incluse dans les membranes chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate est dissoute dans 20 mL de CHCl_3 puis les deux solutions obtenues sont diluées au 1/5 dans du CHCl_3 . La rhodamine-SH est alors quantifiée par spectrophotométrie UV-Visible à 544 nm en construisant une courbe d'étalonnage à partir de solutions de rhodamine-SH dans du CHCl_3 , avec une gamme de concentrations allant de 10,5 à 84 mg/L.

Conclusion générale et perspectives

L'objectif de ces travaux de thèse était la fonctionnalisation de Complexes de Polyélectrolytes Compacts (CoPEC) à base de chitosan et d'alginate, dans l'optique d'obtenir des biomatériaux biosourcés capables de contenir et relarguer des substances actives.

Au cours de ces travaux, les deux polyélectrolytes de départ, le chitosan et l'alginate de sodium, ont été fonctionnalisés par la β -cyclodextrine (β CD), une molécule-cage formant des complexes d'inclusion réversibles avec de nombreuses molécules hydrophobes. Pour cela, la β -cyclodextrine a au préalable été chimiquement modifiée afin d'être réactive vis-à-vis des groupements fonctionnels des polymères.

Des CoPEC à base du chitosan et de l'alginate fonctionnalisés avec la β -cyclodextrine ont ensuite été formulés. A la suite d'évaluations biologiques *in vitro* précoces, l'intérêt s'est rapidement porté sur le couple β CD-chitosan/alginate. Deux méthodes distinctes ont été mises en œuvre pour formuler les matériaux à base de ces deux polyélectrolytes : l'ultracentrifugation et la sédimentation/évaporation. Cela a permis d'obtenir des matériaux sous différentes formes. Tout d'abord, par ultracentrifugation, des CoPEC bruts de type implant ainsi que des microparticules ont été obtenus. Des méthodes, basées sur l'incorporation de microparticules de carbonate de calcium au cours du procédé de formulation et sur leur dissolution ultérieure en milieu acide, ont été développées afin d'obtenir des versions poreuses de ces deux formes. Il a notamment été démontré que la porosité des matériaux de type implant pouvait facilement être contrôlée en modulant les conditions de formulation. Ensuite, par sédimentation/évaporation, des membranes spontanément poreuses ont été mises en forme et il a été démontré que les dimensions des membranes obtenues pouvaient également être simplement contrôlées en diversifiant les paramètres de formulation. La composition exacte du CoPEC β CD-chitosan/alginate a été déterminée en marquant l'alginate avec un fluorophore.

Les propriétés biologiques intrinsèques des CoPEC chitosan/alginate et β CD-chitosan/alginate ont été évaluées selon un modèle *in vitro* d'inflammation, impliquant des macrophages activés au lipopolysaccharide. Les évaluations biologiques ont alors tout d'abord démontré un caractère non cytotoxique des CoPEC à base d'alginate et de chitosan, fonctionnalisés ou non par la β -cyclodextrine. De plus, ces deux matériaux ont montré des propriétés anti-inflammatoires intrinsèques. Ils ont en effet d'une part réduit la production d'oxyde nitrique et de cytokine pro-inflammatoire TNF- α par les macrophages activés. D'autre part, ils ont permis de diminuer l'expression du marqueur d'activation CD40 par les macrophages activés, tout en « restaurant » la prolifération de ces cellules. Des évaluations

contrôles ont de plus permis de confirmer que ces effets ne provenaient pas simplement d'un piégeage du lipopolysaccharide ou du TNF- α dans les matériaux et en particulier dans les cyclodextrines, validant le caractère intrinsèque de ces effets anti-inflammatoires. Une hypothèse selon laquelle ces effets proviendraient principalement du chitosan et du β CD-chitosan a également pu émerger à la suite d'une autre évaluation contrôle.

Deux substances actives anti-inflammatoires modèles, le piroxicam et la prednisolone, ont été incorporées avec succès dans les CoPEC, fonctionnalisés ou non par la β -cyclodextrine. Les essais ont alors permis d'affirmer que la présence des cyclodextrines permet une augmentation considérable de la quantité de substance active pouvant être contenue. En revanche, les effets anti-inflammatoires intrinsèques du CoPEC β CD-chitosan/alginat étaient si prononcés que l'incorporation de molécules anti-inflammatoires n'a pas permis d'intensifier notablement ces effets.

Enfin, une stratégie d'inclusion de substances actives ne présentant pas un caractère hydrophobe a été imaginée. Cette stratégie consiste en l'utilisation de molécules comportant une partie formant un complexe d'inclusion avec la β -cyclodextrine et une fonction maléimide réactive vis-à-vis de fonctions chimiques telles que des thiols. Un premier essai, conduit avec une molécule d'adamantane contenant une fonction maléimide et un fluorophore modifié contenant une fonction thiol, a permis de valider cette stratégie, permettant d'élargir le champ d'application du CoPEC β CD-chitosan/alginat à un nombre incalculable de substances actives.

Ces travaux de recherche constituent une preuve de concept permettant d'affirmer que le nouveau CoPEC développé, à base de β CD-chitosan et d'alginat, possède des propriétés anti-inflammatoires intrinsèques ainsi que la capacité de contenir et relarguer diverses substances actives. Il s'agirait maintenant de caractériser de manière approfondie ce nouveau matériau, tout particulièrement d'un point de vue mécanique. En effet, la présence de cyclodextrines sur les chaînes de chitosan réduit le nombre d'interactions entre les chaînes de polyélectrolytes, ce qui devrait avoir un léger effet sur les propriétés mécaniques (module de Young, élasticité...) du matériau par rapport au CoPEC chitosan/alginat de référence. De plus, une étude de la biodégradabilité en milieu physiologique de ce nouveau CoPEC serait à mener afin de déterminer si ce matériau serait capable d'être naturellement éliminé au cours du temps après une éventuelle implantation dans le corps humain. En outre, la suite logique de ces travaux serait d'inclure une substance active différente d'un anti-inflammatoire,

comme une molécule anti-tumorale par exemple, dans ce CoPEC afin d'obtenir un matériau présentant plusieurs effets thérapeutiques combinés, celui-ci étant déjà intrinsèquement anti-inflammatoire. Dans ce cas, des études cinétiques seraient également à mener afin d'évaluer le profil de libération de substances actives à partir des CoPEC fonctionnalisés pour mieux cibler les applications biomédicales envisageables. Il serait de plus intéressant d'évaluer les capacités thérapeutiques des versions poreuses de CoPEC formulées au cours de cette thèse. En effet, la surface de contact plus importante dans le cas de ces matériaux poreux devrait engendrer des effets accrus de ces CoPEC. Il serait aussi avantageux de confirmer la stratégie d'inclusion de molécules non hydrophobes dans les matériaux, notamment en utilisant la molécule de cholestérol contenant une fonction maléimide synthétisée lors de ces travaux. De nouveaux CoPEC biosourcés, par exemple à base d'associations de protéines ou d'autres polymères d'origine naturelle, pourraient également élargir encore le champ d'application de ces matériaux avec éventuellement d'autres effets thérapeutiques propres. Enfin et à plus longue échéance, des évaluations *in vivo* des diverses formes de CoPEC fonctionnel développées permettraient de valider définitivement le potentiel d'application de ces biomatériaux.

A terme, ce type de CoPEC pourrait trouver de nombreuses applications en tant que biomatériau, dans le cadre du traitement de maladies pour lesquelles plusieurs effets thérapeutiques simultanés seraient bénéfiques, comme dans le cas du cancer par exemple. La diversité de formes pouvant être présentées par le biomatériau final (implant, microparticules, membrane) constituerait alors un avantage permettant d'adapter le CoPEC à chaque application thérapeutique envisagée. D'autres types d'application pourraient également émaner de ce matériau, notamment dans le domaine du support cellulaire 3D. En effet, la porosité pouvant être présentée par ces CoPEC ainsi que sa capacité à contenir divers éléments, comme par exemple un peptide d'adhésion de type RGD cyclique contenant une fonction thiol pouvant réagir avec les fonctions maléimides contenues dans les matériaux, sont des propriétés particulièrement propices à la colonisation cellulaire de ces édifices.

Références

1. Patel, N. R.; Gohil, P., A Review on Biomaterials: Scope, Applications & Human Anatomy Significance. *International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering* **2012**, 2 (4), 91-101.
2. Chen, Q.; Thouas, G. A., Metallic Implant Biomaterials. *Materials Science and Engineering: R: Reports* **2015**, 87, 1-57.
3. Schijve, J., Fatigue of Structures and Materials in the 20th Century and the State of the Art. *International Journal of Fatigue* **2003**, 25 (8), 679-702.
4. Singh Raman, R. K.; Jafari, S.; Harandi, S. E., Corrosion Fatigue Fracture of Magnesium Alloys in Bioimplant Applications: A Review. *Engineering Fracture Mechanics* **2015**, 137, 97-108.
5. Dehurtevent, M.; Robberecht, L.; Hornez, J. C.; Thuault, A.; Deveaux, E.; Béhin, P., Stereolithography: A New Method for Processing Dental Ceramics by Additive Computer-Aided Manufacturing. *Dental Materials* **2017**, 33 (5), 477-485.
6. Teo, A. J. T.; Mishra, A.; Park, I.; Kim, Y.-J.; Park, W.-T.; Yoon, Y.-J., Polymeric Biomaterials for Medical Implants and Devices. *ACS Biomaterials Science & Engineering* **2016**, 2 (4), 454-472.
7. Yin, J.; Luan, S., Opportunities and Challenges for the Development of Polymer-Based Biomaterials and Medical Devices. *Regenerative Biomaterials* **2016**, 3 (2), 129-135.
8. Mark, J. E., *Physical Properties of Polymers Handbook Second Edition*. 2007.
9. Li, S.; Burstein, A. H., Ultra-High Molecular Weight Polyethylene. The Material and its Use in Total Joint Implants. *The Journal of Bone and Joint Surgery American Volume* **1994**, 76 (7), 1080-1090.
10. Zhou, J.; Huang, X.; Zheng, D.; Li, H.; Herrler, T.; Li, Q., Oriental Nose Elongation using an L-Shaped Polyethylene Sheet Implant for Combined Septal Spreading and Extension. *Aesthetic Plastic Surgery* **2014**, 38 (2), 295-302.
11. Terrada, C.; Julian, K.; Cassoux, N.; Prieur, A. M.; Debre, M.; Quartier, P.; LeHoang, P.; Bodaghi, B., Cataract Surgery with Primary Intraocular Lens Implantation in Children with Uveitis: Long-Term Outcomes. *Journal of Cataract and Refractive Surgery* **2011**, 37 (11), 1977-1983.
12. Rivkin, A., A Prospective Study of Non-Surgical Primary Rhinoplasty using a Polymethylmethacrylate Injectable Implant. *Dermatological Surgery* **2014**, 40 (3), 305-313.
13. Kim, B. J.; Hong, K. S.; Park, K. J.; Park, D. H.; Chung, Y. G.; Kang, S. H., Customized Cranioplasty Implants using Three-Dimensional Printers and Polymethyl-Methacrylate Casting. *Journal of Korean Neurosurgical Society* **2012**, 52 (6), 541-546.
14. Scheidbach, H.; Tamme, C.; Tannapfel, A.; Lippert, H.; Köckerling, F., In Vivo Studies Comparing the Biocompatibility of Various Polypropylene Meshes and their Handling Properties during Endoscopic Total Extraperitoneal (TEP) Patchplasty: An Experimental Study in Pigs. *Surgical Endoscopy* **2004**, 18 (2), 211-220.
15. Zheng, F.; Xu, L.; Verbiest, L.; Verbeken, E.; De Ridder, D.; Deprest, J., Cytokine Production Following Experimental Implantation of Xenogenic Dermal Collagen and Polypropylene Grafts in Mice. *Neurourology and Urodynamics* **2007**, 26 (2), 280-289.
16. Na, H. K.; Song, H. Y.; Kim, J. H.; Park, J. H.; Kang, M. K.; Lee, J.; Oh, S. J., How to Design the Optimal Self-Expandable Oesophageal Metallic Stents: 22 Years of Experience in 645 Patients with Malignant Strictures. *European Radiology* **2013**, 23 (3), 786-796.
17. Na, H. K.; Song, H. Y.; Yeo, H. J.; Park, J. H.; Kim, J. H.; Park, H.; Kim, C. S., Retrospective Comparison of Internally and Externally Covered Retrievable Stent Placement for Patients with Benign Urethral Strictures caused by Traumatic Injury. *American Journal of Roentgenology* **2012**, 198 (1), 55-61.

18. Howard, G. T., Biodegradation of Polyurethane: A Review. *International Biodeterioration and Biodegradation* **2002**, 49 (4), 245-252.
19. De la Peña-Salcedo, J. A.; Soto-Miranda, M. A.; Lopez-Salguero, J. F., Back to the Future: A 15-Year Experience with Polyurethane Foam-Covered Breast Implants using the Partial-Subfascial Technique. *Aesthetic Plastic Surgery* **2012**, 36 (2), 331-338.
20. Georgeu, G. A.; Frame, J. D., Conical Polyurethane Implants: An Uplifting Augmentation. *Aesthetic Surgery Journal* **2013**, 33 (8), 1116-1128.
21. Hachem, R. A.; Perez, E.; Bueno, I.; Van De Water, T. R.; Angeli, S. I., Comparison of Packing Material in Middle Ear Mucosal Trauma. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery* **2012**, 147 (2_suppl), 83-84.
22. Guo, H. F.; Li, Z. S.; Dong, S. W.; Chen, W. J.; Deng, L.; Wang, Y. F.; Ying, D. J., Piezoelectric PU/PVDF Electrospun Scaffolds for Wound Healing Applications. *Colloids and Surfaces B Biointerfaces* **2012**, 96, 29-36.
23. Yousef, N. E.; Shaman, A. A., Reduction of Microbial Contamination along Medical Polymeric Implants. *Journal of American Science* **2013**, 9 (12), 92-99.
24. Hasegawa, M.; Horie, K., Photophysics, Photochemistry, and Optical Properties of Polyimides. *Progress in Polymer Science* **2001**, 26 (2), 259-335.
25. Hakan, G. C.; Jiansheng, P., *Handbook of Thermal Process Modeling of Steels*. 2008.
26. Georgiev, A.; Dimov, D.; Spassova, E.; Assa, J.; Dineff, P.; Danev, G., Chemical and Physical Properties of Polyimides: Biomedical and Engineering Applications. In *High Performance Polymers - Polyimides Based - From Chemistry to Applications*, Abadie, M., Ed. IntechOpen: 2012.
27. Hasenkamp, W.; Thevenaz, N.; Villard, J.; Bertsch, A.; Arami, A.; Aminian, K.; Terrier, A.; Renaud, P., Design and Test of a MEMS Strain-Sensing Device for Monitoring Artificial Knee Implants. *Biomedical Microdevices* **2013**, 15 (5), 831-839.
28. Thota, A. K.; Kuntaegowdanahalli, S.; Starosciak, A. K.; Abbas, J. J.; Orbay, J.; Horch, K. W.; Jung, R., A System and Method to Interface with Multiple Groups of Axons in Several Fascicles of Peripheral Nerves. *Journal of Neuroscience Methods* **2015**, 244, 78-84.
29. Kwon, K. Y.; Sirowatka, B.; Weber, A.; Li, W., Opto- μ ECoG Array: A Hybrid Neural Interface with Transparent μ ECoG Electrode Array and Integrated LEDs for Optogenetics. *IEEE Transactions on Biomedical Circuits and Systems* **2013**, 7 (5), 593-600.
30. Yong, K. K.; Brenton, S.; Wen, L.; Arthur, W., Opto- μ ECoG Array: Transparent μ ECoG Electrode Array and Integrated LEDs for Optogenetics. *2012 IEEE Biomedical Circuits and Systems Conference* **2012**, 164-167.
31. Yilgör, E.; Yilgör, I., Silicone Containing Copolymers: Synthesis, Properties and Applications. *Progress in Polymer Science* **2014**, 39 (6), 1165-1195.
32. Willis, R. F., Thermal Decomposition of Silicone Fluids at Metal Surfaces. *Nature* **1969**, 221, 1134-1135.
33. Van Ardenne, N.; Vanderwegen, J.; Van Nuffelen, G.; De Bodt, M.; Van de Heyning, P., Medialization Thyroplasty: Vocal Outcome of Silicone and Titanium Implant. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology* **2011**, 268 (1), 101-107.
34. Borah, D. S. R.; Pal, S. S.; Aakanksha, R., Case Report: Silicone Implant in Augmentation of Saddle Nose. *International Journal of Recent Scientific Research* **2013**, 4 (10), 1661-1662.
35. Unkovskiy, A.; Spintzyk, S.; Brom, J.; Huettig, F.; Keutel, C., Direct 3D Printing of Silicone Facial Prostheses: A Preliminary Experience in Digital Workflow. *The Journal of Prosthetic Dentistry* **2018**.
36. Dandekar, C. R.; Shin, Y. C., Modeling of Machining of Composite Materials: A Review. *International Journal of Machine Tools and Manufacture* **2012**, 57, 102-121.

37. Salernitano, E.; Migliaresi, C., Composite Materials for Biomedical Applications: A Review. *Journal of Applied Biomaterials and Biomechanics* **2003**, *1* (1), 3-18.
38. Gourav, G.; Ankur, K.; Rahul, T.; Sachin, K., Application and Future of Composite Materials: A Review. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology* **2016**, *5* (5), 6907-6911.
39. Björk, N.; Ekstrand, K.; Ruyter, I. E., Implant-Fixed, Dental Bridges from Carbon/Graphite Fibre Reinforced Poly (Methyl Methacrylate). *Biomaterials* **1986**, *7* (1), 73-75.
40. Jancar, J.; Dibenedetto, A. T.; Goldberg, A. J., Thermoplastic Fibre-Reinforced Composites for Dentistry. Part II Effect of Moisture on Flexural Properties of Unidirectional Composites. *Journal of Materials Science Materials in Medicine* **1993**, *4* (6), 562-568.
41. Chen, T.-M.; Yao, C.-H.; Wang, H.-J.; Chou, G.-H.; Lee, T.-W.; Lin, F.-H., Evaluation of a Novel Malleable, Biodegradable Osteoconductive Composite in a Rabbit Cranial Defect Model. *Materials Chemistry and Physics* **1998**, *55* (1), 44-50.
42. Shikinami, Y.; Okuno, M., Bioresorbable Devices made of Forged Composites of Hydroxyapatite (HA) Particles and Poly L-Lactide (PLLA). Part II: Practical Properties of Miniscrews and Miniplates. *Biomaterials* **2001**, *22* (23), 3197-3211.
43. Kim, S.-S.; Sun Park, M.; Jeon, O.; Yong Choi, C.; Kim, B.-S., Poly(Lactide-co-Glycolide)/Hydroxyapatite Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Biomaterials* **2006**, *27* (8), 1399-1409.
44. Liu, X.; Smith, L. A.; Hu, J.; Ma, P. X., Biomimetic Nanofibrous Gelatin/Apatite Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Biomaterials* **2009**, *30* (12), 2252-2258.
45. Dai, N. T.; Williamson, M. R.; Khammo, N.; Adams, E. F.; Coombes, A. G., Composite Cell Support Membranes based on Collagen and Polycaprolactone for Tissue Engineering of Skin. *Biomaterials* **2004**, *25* (18), 4263-4271.
46. Wang, A.; Lin, R.; Polineni, V. K.; Essner, A.; Stark, C.; Dumbleton, J. H., Carbon Fiber Reinforced Polyether Ether Ketone Composite as a Bearing Surface for Total Hip Replacement. *Tribology International* **1998**, *31* (11), 661-667.
47. Früh, H. J.; Willmann, G., Tribological Investigations of the Wear Couple Alumina-CFRP for Total Hip Replacement. *Biomaterials* **1998**, *19* (13), 1145-1150.
48. Kolarík, J.; Migliaresi, C.; Stol, M.; Nicolais, L., Mechanical Properties of Model Synthetic Tendons. *Journal of Biomedical Materials Research* **1981**, *15* (2), 147-157.
49. Davis, P. A.; Huang, S. J.; Ambrosio, L.; Ronca, D.; Nicolais, L., A Biodegradable Composite Artificial Tendon. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **1992**, *3* (5), 359-364.
50. Huguet, D.; Delecrin, J.; Passuti, N.; Daculsi, G., Ovine Anterior Cruciate Ligament Reconstruction using a Synthetic Prosthesis and a Collagen Inductor. *Journal of Materials Science Materials in Medicine* **1997**, *8* (2), 67-73.
51. Mollica, F.; Ventre, M.; Sarracino, F.; Ambrosio, L.; Nicolais, L., Mechanical Properties and Modelling of a Hydrophilic Composite used as a Biomaterial. *Composites Science and Technology* **2006**, *66* (1), 92-101.
52. Hasegawa, M.; Sudo, A.; Shikinami, Y.; Uchida, A., Biological Performance of a Three-Dimensional Fabric as Artificial Cartilage in the Repair of Large Osteochondral Defects in Rabbit. *Biomaterials* **1999**, *20* (20), 1969-1975.
53. Wu, G.; Su, B.; Zhang, W.; Wang, C., In Vitro Behaviors of Hydroxyapatite Reinforced Polyvinyl Alcohol Hydrogel Composite. *Materials Chemistry and Physics* **2008**, *107* (2), 364-369.
54. Hess, M.; Jones, R. G.; Kahovec, J.; Kitayama, T.; Kratochvil, P.; Kubisa, P.; Mormann, W.; Stepto, R. F. T.; Tabak, D.; Vohlidal, J.; Wilks, E. S., Terminology of

- Polymers Containing Ionizable or Ionic Groups and of Polymers Containing Ions. *Pure and Applied Chemistry* **2006**, 78 (11), 2067-2074.
55. Lankalapalli, S.; Kolapalli, V. R., Polyelectrolyte Complexes: A Review of their Applicability in Drug Delivery Technology. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* **2009**, 71 (5), 481-487.
 56. Schaaf, P.; Schlenoff, J. B., Saloplastics: Processing Compact Polyelectrolyte Complexes. *Advanced Materials* **2015**, 27 (15), 2420-2432.
 57. Bungenberg de Jong, H. G.; Kruyt, H. R., Coacervation (Partial Miscibility in Colloid Systems). *Proceedings of the Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen* **1929**, 32, 849-856.
 58. Michaels, A. S.; Miekka, R. G., Polycation-Polyanion Complexes: Preparation and Properties of Poly-(Vinylbenzyltrimethylammonium) Poly-(Styrenesulfonate). *The Journal of Physical Chemistry* **1961**, 65 (10), 1765-1773.
 59. Michaels, A. S., Polyelectrolyte Complexes. *Industrial and Engineering Chemistry* **1965**, 57 (10), 32-40.
 60. Schlenoff, J. B.; Ly, H.; Li, M., Charge and Mass Balance in Polyelectrolyte Multilayers. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, 120 (30), 7626-7634.
 61. Bucur, C. B.; Sui, Z.; Schlenoff, J. B., Ideal Mixing in Polyelectrolyte Complexes and Multilayers: Entropy Driven Assembly. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, 128 (42), 13690-13691.
 62. Schlenoff, J. B.; Rmaile, A. H.; Bucur, C. B., Hydration Contributions to Association in Polyelectrolyte Multilayers and Complexes: Visualizing Hydrophobicity. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, 130 (41), 13589-13597.
 63. Kabanov, V. A.; Zezin, A. B., Soluble Interpolymeric Complexes as a New Class of Synthetic Polyelectrolytes. *Pure and Applied Chemistry* **1984**, 56 (3), 343-354.
 64. Zintchenko, A.; Rother, G.; Dautzenberg, H., Transition Highly Aggregated Complexes-Soluble Complexes via Polyelectrolyte Exchange Reactions: Kinetics, Structural Changes, and Mechanism. *Langmuir* **2003**, 19 (6), 2507-2513.
 65. Mintzer, M. A.; Simanek, E. E., Nonviral Vectors for Gene Delivery. *Chemical Reviews* **2009**, 109 (2), 259-302.
 66. Decher, G.; Hong, J. D.; Schmitt, J., Buildup of Ultrathin Multilayer Films by a Self-Assembly Process: III. Consecutively Alternating Adsorption of Anionic and Cationic Polyelectrolytes on Charged Surfaces. *Thin Solid Films* **1992**, 210-211, 831-835.
 67. Decher, G., Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites. *Science* **1997**, 277 (5330), 1232-1237.
 68. Sato, K.; Imoto, Y.; Sugama, J.; Seki, S.; Inoue, H.; Odagiri, T.; Hoshi, T.; Anzai, J., Sugar-Induced Disintegration of Layer-by-Layer Assemblies Composed of Concanavalin A and Glycogen. *Langmuir* **2005**, 21 (2), 797-799.
 69. Jaber, J. A.; Schlenoff, J. B., Recent Developments in the Properties and Applications of Polyelectrolyte Multilayers. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* **2006**, 11 (6), 324-329.
 70. Boudou, T.; Crouzier, T.; Ren, K.; Blin, G.; Picart, C., Multiple Functionalities of Polyelectrolyte Multilayer Films: New Biomedical Applications. *Advanced Materials* **2010**, 22 (4), 441-467.
 71. Schlenoff, J. B.; Dubas, S. T.; Farhat, T., Sprayed Polyelectrolyte Multilayers. *Langmuir* **2000**, 16 (26), 9968-9969.
 72. Lee, S.-S.; Hong, J.-D.; Kim, C. H.; Kim, K.; Koo, J. P.; Lee, K.-B., Layer-by-Layer Deposited Multilayer Assemblies of Ionene-Type Polyelectrolytes Based on the Spin-Coating Method. *Macromolecules* **2001**, 34 (16), 5358-5360.

73. Mermut, O.; Lefebvre, J.; Gray, D. G.; Barrett, C. J., Structural and Mechanical Properties of Polyelectrolyte Multilayer Films Studied by AFM. *Macromolecules* **2003**, 36 (23), 8819-8824.
74. Mendelsohn, J. D.; Yang, S. Y.; Hiller, J.; Hochbaum, A. I.; Rubner, M. F., Rational Design of Cytophilic and Cytophobic Polyelectrolyte Multilayer Thin Films. *Biomacromolecules* **2003**, 4 (1), 96-106.
75. Jaber, J. A.; Schlenoff, J. B., Mechanical Properties of Reversibly Cross-Linked Ultrathin Polyelectrolyte Complexes. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, 128 (9), 2940-2947.
76. Richert, L.; Boulmedais, F.; Laval, P.; Mutterer, J.; Ferreux, E.; Decher, G.; Schaaf, P.; Voegel, J. C.; Picart, C., Improvement of Stability and Cell Adhesion Properties of Polyelectrolyte Multilayer Films by Chemical Cross-Linking. *Biomacromolecules* **2004**, 5 (2), 284-294.
77. Richert, L.; Engler, A. J.; Discher, D. E.; Picart, C., Elasticity of Native and Cross-Linked Polyelectrolyte Multilayer Films. *Biomacromolecules* **2004**, 5 (5), 1908-1916.
78. Francius, G.; Hemmerlé, J.; Ohayon, J.; Schaaf, P.; Voegel, J. C.; Picart, C.; Senger, B., Effect of Crosslinking on the Elasticity of Polyelectrolyte Multilayer Films Measured by Colloidal Probe AFM. *Microscopy Research and Technique* **2006**, 69 (2), 84-92.
79. Li, B.; Haynie, D. T., Multilayer Biomimetics: Reversible Covalent Stabilization of a Nanostructured Biofilm. *Biomacromolecules* **2004**, 5 (5), 1667-1670.
80. Yang, S. Y.; Rubner, M. F., Micropatterning of Polymer Thin Films with pH-Sensitive and Cross-Linkable Hydrogen-Bonded Polyelectrolyte Multilayers. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, 124 (10), 2100-2101.
81. Olugebefola, S. C.; Kuhlman, W. A.; Rubner, M. F.; Mayes, A. M., Photopatterned Nanoporosity in Polyelectrolyte Multilayer Films. *Langmuir* **2008**, 24 (9), 5172-5178.
82. Park, M. K.; Deng, S.; Advincula, R. C., pH-Sensitive Bipolar Ion-Permeable Ultrathin Films. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126 (42), 13723-13731.
83. Vázquez, C. P.; Boudou, T.; Dulong, V.; Nicolas, C.; Picart, C.; Glinel, K., Variation of Polyelectrolyte Film Stiffness by Photo-Cross-Linking: A New Way to Control Cell Adhesion. *Langmuir* **2009**, 25 (6), 3556-3563.
84. Woltmann, B.; Torger, B.; Müller, M.; Hempel, U., Interaction Between Immobilized Polyelectrolyte Complex Nanoparticles and Human Mesenchymal Stromal Cells. *International Journal of Nanomedicine* **2014**, 9, 2205-2215.
85. Thompson, M. T.; Berg, M. C.; Tobias, I. S.; Rubner, M. F.; Van Vliet, K. J., Tuning Compliance of Nanoscale Polyelectrolyte Multilayers to Modulate Cell Adhesion. *Biomaterials* **2005**, 26 (34), 6836-6845.
86. Salloum, D. S.; Olenych, S. G.; Keller, T. C.; Schlenoff, J. B., Vascular Smooth Muscle Cells on Polyelectrolyte Multilayers: Hydrophobicity-Directed Adhesion and Growth. *Biomacromolecules* **2005**, 6 (1), 161-167.
87. Etienne, O.; Gasnier, C.; Taddei, C.; Voegel, J. C.; Aunis, D.; Schaaf, P.; Metz-Boutigue, M. H.; Bolcato-Bellemin, A. L.; Egles, C., Antifungal Coating by Biofunctionalized Polyelectrolyte Multilayered Films. *Biomaterials* **2005**, 26 (33), 6704-6712.
88. Lichter, J. A.; Rubner, M. F., Polyelectrolyte Multilayers with Intrinsic Antimicrobial Functionality: The Importance of Mobile Polycations. *Langmuir* **2009**, 25 (13), 7686-7694.
89. Schultz, P.; Vautier, D.; Richert, L.; Jessel, N.; Haikel, Y.; Schaaf, P.; Voegel, J. C.; Ogier, J.; Debry, C., Polyelectrolyte Multilayers Functionalized by a Synthetic Analogue of an Anti-Inflammatory Peptide, Alpha-MSH, for Coating a Tracheal Prosthesis. *Biomaterials* **2005**, 26 (15), 2621-2630.

90. Picart, C.; Schneider, A.; Etienne, O.; Mutterer, J.; Schaaf, P.; Egles, C.; Jessel, N.; Voegel, J. C., Controlled Degradability of Polysaccharide Multilayer Films In Vitro and In Vivo. *Advanced Functional Materials* **2005**, *15* (11), 1771-1780.
91. Zhang, J.; Fredin, N. J.; Janz, J. F.; Sun, B.; Lynn, D. M., Structure/Property Relationships in Erodible Multilayered Films: Influence of Polycation Structure on Erosion Profiles and the Release of Anionic Polyelectrolytes. *Langmuir* **2006**, *22* (1), 239-245.
92. Etienne, O.; Schneider, A.; Taddei, C.; Richert, L.; Schaaf, P.; Voegel, J.-C.; Egles, C.; Picart, C., Degradability of Polysaccharides Multilayer Films in the Oral Environment: an In Vitro and In Vivo Study. *Biomacromolecules* **2005**, *6* (2), 726-733.
93. Porcel, C. H.; Schlenoff, J. B., Compact Polyelectrolyte Complexes: "Saloplastic" Candidates for Biomaterials. *Biomacromolecules* **2009**, *10* (11), 2968-2975.
94. Shamoun Rabih, F.; Reisch, A.; Schlenoff Joseph, B., Extruded Saloplastic Polyelectrolyte Complexes. *Advanced Functional Materials* **2012**, *22* (9), 1923-1931.
95. Ghostine, R. A.; Schlenoff, J. B., Ion Diffusion Coefficients through Polyelectrolyte Multilayers: Temperature and Charge Dependence. *Langmuir* **2011**, *27* (13), 8241-8247.
96. Fu, J.; Wang, Q.; Schlenoff, J. B., Extruded Superparamagnetic Saloplastic Polyelectrolyte Nanocomposites. *ACS Applied Materials and Interfaces* **2015**, *7* (1), 895-901.
97. Costa, R. R.; Costa, A. M. S.; Caridade, S. G.; Mano, J. F., Compact Saloplastic Membranes of Natural Polysaccharides for Soft Tissue Engineering. *Chemistry of Materials* **2015**, *27* (21), 7490-7502.
98. Rodrigues, M. N.; Oliveira, M. B.; Costa, R. R.; Mano, J. F., Chitosan/Chondroitin Sulfate Membranes Produced by Polyelectrolyte Complexation for Cartilage Engineering. *Biomacromolecules* **2016**, *17* (6), 2178-2188.
99. Tirado, P.; Reisch, A.; Roger, E.; Boulmedais, F.; Jerry, L.; Laval, P.; Voegel, J.-C.; Schaaf, P.; Schlenoff Joseph, B.; Frisch, B., Catalytic Saloplastics: Alkaline Phosphatase Immobilized and Stabilized in Compacted Polyelectrolyte Complexes. *Advanced Functional Materials* **2013**, *23* (38), 4785-4792.
100. Hariri, H. H.; Schlenoff, J. B., Saloplastic Macroporous Polyelectrolyte Complexes: Cartilage Mimics. *Macromolecules* **2010**, *43* (20), 8656-8663.
101. Hariri, H. H.; Leahaf, A. M.; Schlenoff, J. B., Mechanical Properties of Osmotically Stressed Polyelectrolyte Complexes and Multilayers: Water as a Plasticizer. *Macromolecules* **2012**, *45* (23), 9364-9372.
102. Reisch, A.; Tirado, P.; Roger, E.; Boulmedais, F.; Collin, D.; Voegel, J.-C.; Frisch, B.; Schaaf, P.; Schlenoff Joseph, B., Compact Saloplastic Poly(Acrylic Acid)/Poly(Allylamine) Complexes: Kinetic Control Over Composition, Microstructure, and Mechanical Properties. *Advanced Functional Materials* **2012**, *23* (6), 673-682.
103. Reisch, A.; Roger, E.; Phoeung, T.; Anthaume, C.; Orthlieb, C.; Boulmedais, F.; Laval, P.; Schlenoff, J. B.; Frisch, B.; Schaaf, P., On the Benefits of Rubbing Salt in the Cut: Self-Healing of Saloplastic PAA/PAH Compact Polyelectrolyte Complexes. *Advanced Materials* **2014**, *26* (16), 2547-2551.
104. Agache, P. G.; Monneur, C.; Leveque, J. L.; De Rigal, J., Mechanical Properties and Young's Modulus of Human Skin In Vivo. *Archives of Dermatological Research* **1980**, *269* (3), 221-232.
105. Phoeung, T.; Spanedda, M. V.; Roger, E.; Heurtault, B.; Fournel, S.; Reisch, A.; Mutschler, A.; Perrin-Schmitt, F.; Hemmerlé, J.; Collin, D.; Rawiso, M.; Boulmedais, F.; Schaaf, P.; Laval, P.; Frisch, B., Alginate/Chitosan Compact Polyelectrolyte Complexes: A Cell and Bacterial Repellent Material. *Chemistry of Materials* **2017**, *29* (24), 10418-10425.
106. Rinaudo, M., Main Properties and Current Applications of Some Polysaccharides as Biomaterials. *Polymer International* **2007**, *57* (3), 397-430.

107. Lee, K. Y.; Mooney, D. J., Alginate: Properties and Biomedical Applications. *Progress in Polymer Science* **2012**, 37 (1), 106-126.
108. Pawar, S. N.; Edgar, K. J., Alginate Derivatization: A Review of Chemistry, Properties and Applications. *Biomaterials* **2012**, 33 (11), 3279-3305.
109. Chamberlain, N. H.; Cunningham, G. E.; Speakman, J. B., Alginic Acid Diacetate. *Nature* **1946**, 158 (4016), 553-553.
110. Wassermann, A., Alginic Acid Acetate. *Journal of the Chemical Society* **1948**, (0), 197-198.
111. Schweiger, R. G., Acetylation of Alginic Acid. I. Preparation and Viscosities of Algin Acetates. *The Journal of Organic Chemistry* **1962**, 27 (5), 1786-1789.
112. Schweiger, R. G., Acetylation of Alginic Acid. II. Reaction of Algin Acetates with Calcium and Other Divalent Ions. *The Journal of Organic Chemistry* **1962**, 27 (5), 1789-1791.
113. Skjåk-Bræk, G.; Paoletti, S.; Gianferrara, T., Selective Acetylation of Mannuronic Acid Residues in Calcium Alginate Gels. *Carbohydrate Research* **1989**, 185 (1), 119-129.
114. Pawar, S. N.; Edgar, K. J., Chemical Modification of Alginates in Organic Solvent Systems. *Biomacromolecules* **2011**, 12 (11), 4095-4103.
115. Coleman, R. J.; Lawrie, G.; Lambert, L. K.; Whittaker, M.; Jack, K. S.; Grøndahl, L., Phosphorylation of Alginate: Synthesis, Characterization, and Evaluation of In Vitro Mineralization Capacity. *Biomacromolecules* **2011**, 12 (4), 889-897.
116. Ronghua, H.; Yumin, D.; Jianhong, Y., Preparation and In Vitro Anticoagulant Activities of Alginate Sulfate and its Quaterized Derivatives. *Carbohydrate Polymers* **2003**, 52 (1), 19-24.
117. Freeman, I.; Kedem, A.; Cohen, S., The Effect of Sulfation of Alginate Hydrogels on the Specific Binding and Controlled Release of Heparin-Binding Proteins. *Biomaterials* **2008**, 29 (22), 3260-3268.
118. Fan, L.; Jiang, L.; Xu, Y.; Zhou, Y.; Shen, Y.; Xie, W.; Long, Z.; Zhou, J., Synthesis and Anticoagulant Activity of Sodium Alginate Sulfates. *Carbohydrate Polymers* **2011**, 83 (4), 1797-1803.
119. Carré, M.-C.; Delestre, C.; Hubert, P.; Dellacherie, E., Covalent Coupling of a Short Polyether on Sodium Alginate: Synthesis and Characterization of the Resulting Amphiphilic Derivative. *Carbohydrate Polymers* **1991**, 16 (4), 367-379.
120. Siquin, A.; Hubert, P.; Dellacherie, E., Amphiphilic Derivatives of Alginate: Evidence for Intra- and Intermolecular Hydrophobic Associations in Aqueous Solution. *Langmuir* **1993**, 9 (12), 3334-3337.
121. Siquin, A.; Hubert, P.; Dellacherie, E., Intermolecular Associations in Hydrophobically Modified Derivatives of Propyleneglycol Alginate. *Polymer* **1994**, 35 (16), 3557-3560.
122. Siquin, A.; Houzelle, M. C.; Hubert, P.; Choplin, L.; Viriot, M. L.; Dellacherie, E., Amphiphilic Derivatives of Propylene Glycol Alginate: A Revisit of Their Physicochemical Behavior in Dilute Aqueous Solution. *Langmuir* **1996**, 12 (16), 3779-3782.
123. Babak, V. G.; Skotnikova, E. A.; Lukina, I. G.; Pelletier, S.; Hubert, P.; Dellacherie, E., Hydrophobically Associating Alginate Derivatives: Surface Tension Properties of their Mixed Aqueous Solutions with Oppositely Charged Surfactants. *Journal of Colloid and Interface Science* **2000**, 225 (2), 505-510.
124. Galant, C.; Kjøniksen, A. L.; Nguyen, G. T.; Knudsen, K. D.; Nyström, B., Altering Associations in Aqueous Solutions of a Hydrophobically Modified Alginate in the Presence of Beta-Cyclodextrin Monomers. *The Journal of Physical Chemistry B* **2006**, 110 (1), 190-195.

125. Donati, I.; Vetere, A.; Gamini, A.; Skjåk-Braek, G.; Coslovi, A.; Campa, C.; Paoletti, S., Galactose-Substituted Alginate: Preliminary Characterization and Study of Gelling Properties. *Biomacromolecules* **2003**, *4* (3), 624-631.
126. Donati, I.; Draget, K. I.; Borgogna, M.; Paoletti, S.; Skjåk-Braek, G., Tailor-Made Alginate Bearing Galactose Moieties on Mannuronic Residues: Selective Modification Achieved by a Chemoenzymatic Strategy. *Biomacromolecules* **2005**, *6* (1), 88-98.
127. Yang, J.; Goto, M.; Ise, H.; Cho, C. S.; Akaike, T., Galactosylated Alginate as a Scaffold for Hepatocytes Entrapment. *Biomaterials* **2002**, *23* (2), 471-479.
128. Rowley, J. A.; Madlambayan, G.; Mooney, D. J., Alginate Hydrogels as Synthetic Extracellular Matrix Materials. *Biomaterials* **1999**, *20* (1), 45-53.
129. Shah, S. B.; Patel, C. P.; Trivedi, H. C., Ceric-Induced Grafting of Acrylate Monomers onto Sodium Alginate. *Carbohydrate Polymers* **1995**, *26* (1), 61-67.
130. Shah, S. B.; Patel, C. P.; Trivedi, H. C., Fenton's Reagent-Initiated Graft Copolymerization of Acrylonitrile onto Sodium Alginate. *Journal of Applied Polymer Science* **1994**, *51* (8), 1421-1426.
131. Tripathy, T.; Pandey, S. R.; Karmakar, N. C.; Bhagat, R. P.; Singh, R. P., Novel Flocculating Agent based on Sodium Alginate and Acrylamide. *European Polymer Journal* **1999**, *35* (11), 2057-2072.
132. Yang, S.; Liu, G.; Cheng, Y.; Zheng, Y., Electroresponsive Behavior of Sodium Alginate-g-Poly (acrylic acid) Hydrogel under DC Electric Field. *Journal of Macromolecular Science, Part A* **2009**, *46* (11), 1078-1082.
133. Ma, P.; Xiao, C.; Li, L.; Shi, H.; Zhu, M., Facile Preparation of Ferromagnetic Alginate-g-Poly(vinyl alcohol) Microparticles. *European Polymer Journal* **2008**, *44* (11), 3886-3889.
134. Omagari, Y.; Kaneko, Y.; Kadokawa, J.-I., Chemoenzymatic Synthesis of Amylose-Grafted Alginate and its Formation of Enzymatic Disintegratable Beads. *Carbohydrate Polymers* **2010**, *82* (2), 394-400.
135. Kim, J. H.; Lee, S. B.; Kim, S. J.; Lee, Y. M., Rapid Temperature/pH Response of Porous Alginate-g-Poly(N-isopropylacrylamide) Hydrogels. *Polymer* **2002**, *43* (26), 7549-7558.
136. Gao, C.; Liu, M.; Chen, S.; Jin, S.; Chen, J., Preparation of Oxidized Sodium Alginate-graft-Poly((2-dimethylamino) ethyl methacrylate) Gel Beads and In Vitro Controlled Release Behavior of BSA. *International Journal of Pharmaceutics* **2009**, *371* (1-2), 16-24.
137. Sun, J. C.; Tan, H. P., Alginate-Based Biomaterials for Regenerative Medicine Applications. *Materials* **2013**, *6* (4), 1285-1309.
138. Suzuki, Y.; Tanihara, M.; Suzuki, K.; Saitou, A.; Sufan, W.; Nishimura, Y., Alginate Hydrogel Linked with Synthetic Oligopeptide Derived from BMP-2 Allows Ectopic Osteoinduction In Vivo. *Journal of Biomedical Materials Research* **2000**, *50* (3), 405-409.
139. Leor, J.; Tuvia, S.; Guetta, V.; Manczur, F.; Castel, D.; Willenz, U.; Petneházy, O.; Landa, N.; Feinberg, M. S.; Konen, E.; Goitein, O.; Tsur-Gang, O.; Shaul, M.; Klapper, L.; Cohen, S., Intracoronary Injection of In Situ Forming Alginate Hydrogel Reverses Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction in Swine. *Journal of the American College of Cardiology* **2009**, *54* (11), 1014-1023.
140. Campbell, K. T.; Hadley, D. J.; Kukis, D. L.; Silva, E. A., Alginate Hydrogels Allow for Bioactive and Sustained Release of VEGF-C and VEGF-D for Lymphangiogenic Therapeutic Applications. *PLoS One* **2017**, *12* (7), e0181484.
141. Hao, X.; Silva, E. A.; Månsson-Broberg, A.; Grinnemo, K. H.; Siddiqui, A. J.; Dellgren, G.; Wårdell, E.; Brodin, L. A.; Mooney, D. J.; Sylvén, C., Angiogenic Effects of Sequential Release of VEGF-A165 and PDGF-BB with Alginate Hydrogels after Myocardial Infarction. *Cardiovascular Research* **2007**, *75* (1), 178-185.

142. Bidarra, S. J.; Barrias, C. C.; Granja, P. L., Injectable Alginate Hydrogels for Cell Delivery in Tissue Engineering. *Acta Biomaterialia* **2014**, *10* (4), 1646-1662.
143. Rastogi, R.; Sultana, Y.; Aqil, M.; Ali, A.; Kumar, S.; Chuttani, K.; Mishra, A. K., Alginate Microspheres of Isoniazid for Oral Sustained Drug Delivery. *International Journal of Pharmaceutics* **2007**, *334* (1-2), 71-77.
144. Soni, M. L.; Kumar, M.; Namdeo, K. P., Sodium Alginate Microspheres for Extending Drug Release: Formulation and In Vitro Evaluation. *International Journal of Drug Delivery* **2010**, *2* (1), 64-68.
145. Rajinikanth, P. S.; Sankar, C.; Mishra, B., Sodium Alginate Microspheres of Metoprolol Tartrate for Intranasal Systemic Delivery: Development and Evaluation. *Drug Delivery* **2003**, *10* (1), 21-28.
146. Das, M. K.; Senapati, P. C., Furosemide-Loaded Alginate Microspheres Prepared by Ionic Cross-Linking Technique: Morphology and Release Characteristics. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* **2008**, *70* (1), 77-84.
147. Patil, J. S.; Devi, K.; Devi, K.; Suresh, S., Formulation and Evaluation of Novel Spray-Dried Alginate Microspheres as Pulmonary Delivery Systems of Rifampicin in Rats. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research* **2015**, *49* (4), 320-328.
148. Nagasree, K.; Chowdary, G. V.; Mahendra Kumar, C. B.; Rama Mohan Reddy, T.; Bhikshapathi, D. V. R. N., Design and Evaluation of Sodium Alginate Microspheres Loaded with Gatifloxacin. *Der Pharmacia Lettre* **2016**, *8* (4), 361-370.
149. Bulut, E.; Dilek, M., Development and Characterization of pH-Sensitive Locust Bean Gum-Alginate Microspheres for Controlled Release of Ibuprofen. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* **2014**, *24* (6), 613-619.
150. Maestrelli, F.; Mura, P.; González-Rodríguez, M. L.; Cózar-Bernal, M. J.; Rabasco, A. M.; Di Cesare Mannelli, L.; Ghelardini, C., Calcium Alginate Microspheres Containing Metformin Hydrochloride Niosomes and Chitosomes Aimed for Oral Therapy of Type 2 Diabetes Mellitus. *International Journal of Pharmaceutics* **2017**, *530* (1-2), 430-439.
151. Martins, S.; Sarmiento, B.; Souto, E. B.; Ferreira, D. C., Insulin-Loaded Alginate Microspheres for Oral Delivery – Effect of Polysaccharide Reinforcement on Physicochemical Properties and Release Profile. *Carbohydrate Polymers* **2007**, *69* (4), 725-731.
152. Ciofani, G.; Raffa, V.; Menciassi, A.; Micera, S.; Dario, P., A Drug Delivery System Based on Alginate Microspheres: Mass-Transport Test and In Vitro Validation. *Biomedical Microdevices* **2007**, *9* (3), 395-403.
153. Yu, J.; Du, K. T.; Fang, Q.; Gu, Y.; Mihardja, S. S.; Sievers, R. E.; Wu, J. C.; Lee, R. J., The Use of Human Mesenchymal Stem Cells Encapsulated in RGD Modified Alginate Microspheres in the Repair of Myocardial Infarction in the Rat. *Biomaterials* **2010**, *31* (27), 7012-7020.
154. Bidarra, S. J.; Barrias, C. C.; Barbosa, M. A.; Soares, R.; Granja, P. L., Immobilization of Human Mesenchymal Stem Cells within RGD-Grafted Alginate Microspheres and Assessment of their Angiogenic Potential. *Biomacromolecules* **2010**, *11* (8), 1956-1964.
155. Moshaverinia, A.; Ansari, S.; Chen, C.; Xu, X.; Akiyama, K.; Snead, M. L.; Zadeh, H. H.; Shi, S., Co-Encapsulation of Anti-BMP2 Monoclonal Antibody and Mesenchymal Stem Cells in Alginate Microspheres for Bone Tissue Engineering. *Biomaterials* **2013**, *34* (28), 6572-6579.
156. Thomas, R. G.; Unnithan, A. R.; Moon, M. J.; Surendran, S. P.; Batgerel, T.; Park, C. H.; Kim, C. S.; Jeong, Y. Y., Electromagnetic Manipulation Enabled Calcium Alginate Janus Microsphere for Targeted Delivery of Mesenchymal Stem Cells. *International Journal of Biological Macromolecules* **2018**, *110*, 465-471.

157. Aggarwal, N.; HogenEsch, H.; Guo, P.; North, A.; Suckow, M.; Mittal, S. K., Biodegradable Alginate Microspheres as a Delivery System for Naked DNA. *Canadian Journal of Veterinary Research* **1999**, 63 (2), 148-152.
158. Tian, J. Y.; Sun, X. Q.; Chen, X. G., Formation and Oral Administration of Alginate Microspheres Loaded with pDNA Coding for Lymphocystis Disease Virus (LCDV) to Japanese Flounder. *Fish and Shellfish Immunology* **2008**, 24 (5), 592-599.
159. Ribeiro, C. C.; Barrias, C. C.; Barbosa, M. A., Calcium Phosphate-Alginate Microspheres as Enzyme Delivery Matrices. *Biomaterials* **2004**, 25 (18), 4363-4373.
160. Qi, X.; Ye, J.; Wang, Y., Alginate/Poly (Lactic-co-Glycolic Acid)/Calcium Phosphate Cement Scaffold with Oriented Pore Structure for Bone Tissue Engineering. *Journal of Biomedical Materials Research A* **2009**, 89 (4), 980-987.
161. Singh, D.; Tripathi, A.; Zo, S.; Han, S. S., Synthesis of Composite Gelatin-Hyaluronic Acid-Alginate Porous Scaffold and Evaluation for In Vitro Stem Cell Growth and In Vivo Tissue Integration. *Colloids and Surfaces B Biointerfaces* **2014**, 116, 502-509.
162. Wang, C. C.; Yang, K. C.; Lin, K. H.; Liu, H. C.; Lin, F. H., A Highly Organized Three-Dimensional Alginate Scaffold for Cartilage Tissue Engineering Prepared by Microfluidic Technology. *Biomaterials* **2011**, 32 (29), 7118-7126.
163. Rinaudo, M., Chitin and Chitosan: Properties and Applications. *Progress in Polymer Science* **2006**, 31 (7), 603-632.
164. Croisier, F.; Jérôme, C., Chitosan-Based Biomaterials for Tissue Engineering. *European Polymer Journal* **2013**, 49 (4), 780-792.
165. Kumar, M. N.; Muzzarelli, R. A.; Muzzarelli, C.; Sashiwa, H.; Domb, A. J., Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives. *Chemical Reviews* **2004**, 104 (12), 6017-6084.
166. Park, I. K.; Yang, J.; Jeong, H. J.; Bom, H. S.; Harada, I.; Akaike, T.; Kim, S. I.; Cho, C. S., Galactosylated Chitosan as a Synthetic Extracellular Matrix for Hepatocytes Attachment. *Biomaterials* **2003**, 24 (13), 2331-2337.
167. Welsh, E. R.; Price, R. R., Chitosan Cross-Linking with a Water-Soluble, Blocked Diisocyanate. 2. Solvates and Hydrogels. *Biomacromolecules* **2003**, 4 (5), 1357-1361.
168. Chenite, A.; Chaput, C.; Wang, D.; Combes, C.; Buschmann, M. D.; Hoemann, C. D.; Leroux, J. C.; Atkinson, B. L.; Binette, F.; Selmani, A., Novel Injectable Neutral Solutions of Chitosan Form Biodegradable Gels In Situ. *Biomaterials* **2000**, 21 (21), 2155-2161.
169. Moattari, M.; Kouchesfehiani, H. M.; Kaka, G.; Sadraie, S. H.; Naghdi, M.; Mansouri, K., Chitosan-Film Associated with Mesenchymal Stem Cells Enhanced Regeneration of Peripheral Nerves: A Rat Sciatic Nerve Model. *Journal of Chemical Neuroanatomy* **2018**, 88, 46-54.
170. Mohd, S. N. J.; Mat, A. K. A., Composite Film of Chitosan Loaded Norfloxacin with Improved Flexibility and Antibacterial Activity for Wound Dressing Application. *Oriental Journal of Chemistry* **2017**, 33 (2), 628-636.
171. Khajuria, D. K.; Patil, O. N.; Karasik, D.; Razdan, R., Development and Evaluation of Novel Biodegradable Chitosan Based Metformin Intrapocket Dental Film for the Management of Periodontitis and Alveolar Bone Loss in a Rat Model. *Archives of Oral Biology* **2018**, 85, 120-129.
172. Ghosh, P.; Rameshbabu, A. P.; Das, D.; Francis, N. K.; Pawar, H. S.; Subramanian, B.; Pal, S.; Dhara, S., Covalent Cross-Links in Polyampholytic Chitosan Fibers Enhances Bone Regeneration in a Rabbit Model. *Colloids and Surfaces B Biointerfaces* **2015**, 125, 160-169.

173. Yilgor, P.; Tuzlakoglu, K.; Reis, R. L.; Hasirci, N.; Hasirci, V., Incorporation of a Sequential BMP-2/BMP-7 Delivery System into Chitosan-Based Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Biomaterials* **2009**, *30* (21), 3551-3559.
174. Jia, S.; Yang, X.; Song, W.; Wang, L.; Fang, K.; Hu, Z.; Yang, Z.; Shan, C.; Lei, D.; Lu, B., Incorporation of Osteogenic and Angiogenic Small Interfering RNAs into Chitosan Sponge for Bone Tissue Engineering. *International Journal of Nanomedicine* **2014**, *9*, 5307-5316.
175. Alvarez Echazú, M. I.; Olivetti, C. E.; Anesini, C.; Perez, C. J.; Alvarez, G. S.; Desimone, M. F., Development and Evaluation of Thymol-Chitosan Hydrogels with Antimicrobial-Antioxidant Activity for Oral Local Delivery. *Materials Science and Engineering C* **2017**, *81*, 588-596.
176. Aycan, D.; Alemdar, N., Development of pH-Responsive Chitosan-Based Hydrogel Modified with Bone Ash for Controlled Release of Amoxicillin. *Carbohydrate Polymers* **2018**, *184*, 401-407.
177. Lu, M.; Liu, Y.; Huang, Y. C.; Huang, C. J.; Tsai, W. B., Fabrication of Photo-Crosslinkable Glycol Chitosan Hydrogel as a Tissue Adhesive. *Carbohydrate Polymers* **2018**, *181*, 668-674.
178. Fatmanur, T.-D., Development of *In Situ* Poloxamer-Chitosan Hydrogels for Vaginal Drug Delivery of Benzydamine Hydrochloride: Textural, Mucoadhesive and *In Vitro* Release Properties. *Marmara Pharmaceutical Journal* **2017**, *21* (4), 762-770.
179. Xie, W.; Gao, Q.; Guo, Z.; Wang, D.; Gao, F.; Wang, X.; Wei, Y.; Zhao, L., Injectable and Self-Healing Thermosensitive Magnetic Hydrogel for Asynchronous Control Release of Doxorubicin and Docetaxel to Treat Triple-Negative Breast Cancer. *ACS Applied Materials and Interfaces* **2017**, *9* (39), 33660-33673.
180. Qiao, X.; Peng, X.; Qiao, J.; Jiang, Z.; Han, B.; Yang, C.; Liu, W., Evaluation of a Photocrosslinkable Hydroxyethyl Chitosan Hydrogel as a Potential Drug Release System for Glaucoma Surgery. *Journal of Materials Science Materials in Medicine* **2017**, *28* (10), 149.
181. Bankoti, K.; Rameshbabu, A. P.; Datta, S.; Maity, P. P.; Goswami, P.; Datta, P.; Ghosh, S. K.; Mitra, A.; Dhara, S., Accelerated Healing of Full Thickness Dermal Wounds by Macroporous Waterborne Polyurethane-Chitosan Hydrogel Scaffolds. *Materials Science and Engineering C* **2017**, *81*, 133-143.
182. Yoon, S. J.; Hyun, H.; Lee, D. W.; Yang, D. H., Visible Light-Cured Glycol Chitosan Hydrogel Containing a Beta-Cyclodextrin-Curcumin Inclusion Complex Improves Wound Healing *In Vivo*. *Molecules* **2017**, *22* (9), 1513.
183. Ouyang, Q. Q.; Hu, Z.; Lin, Z. P.; Quan, W. Y.; Deng, Y. F.; Li, S. D.; Li, P. W.; Chen, Y., Chitosan Hydrogel in Combination with Marine Peptides from Tilapia for Burns Healing. *International Journal of Biological Macromolecules* **2018**, *112*, 1191-1198.
184. Zhai, M.; Xu, Y.; Zhou, B.; Jing, W., Keratin-Chitosan/n-ZnO Nanocomposite Hydrogel for Antimicrobial Treatment of Burn Wound Healing: Characterization and Biomedical Application. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology* **2018**, *180*, 253-258.
185. Kashi, M.; Baghbani, F.; Moztarzadeh, F.; Mobasheri, H.; Kowsari, E., Green Synthesis of Degradable Conductive Thermosensitive Oligopyrrole/Chitosan Hydrogel Intended for Cartilage Tissue Engineering. *International Journal of Biological Macromolecules* **2018**, *107* (Pt B), 1567-1575.
186. Li, Z.; Shim, H.; Cho, M. O.; Cho, I. S.; Lee, J. H.; Kang, S. W.; Kwon, B.; Huh, K. M., Thermo-Sensitive Injectable Glycol Chitosan-Based Hydrogel for Treatment of Degenerative Disc Disease. *Carbohydrate Polymers* **2018**, *184*, 342-353.

187. Xu, B.; Li, Y.; Deng, B.; Liu, X.; Wang, L.; Zhu, Q. L., Chitosan Hydrogel Improves Mesenchymal Stem Cell Transplant Survival and Cardiac Function Following Myocardial Infarction in Rats. *Experimental and Therapeutic Medicine* **2017**, *13* (2), 588-594.
188. Huang, J.; Deng, Y.; Ren, J.; Chen, G.; Wang, G.; Wang, F.; Wu, X., Novel In Situ Forming Hydrogel based on Xanthan and Chitosan Re-Gelifying in Liquids for Local Drug Delivery. *Carbohydrate Polymers* **2018**, *186*, 54-63.
189. Kiene, K.; Porta, F.; Topacogullari, B.; Detampel, P.; Huwyler, J., Self-Assembling Chitosan Hydrogel: A Drug-Delivery Device Enabling the Sustained Release of Proteins. *Journal of Applied Polymer Science* **2017**, *135* (1), 45638.
190. Dhanikula, A. B.; Panchagnula, R., Development and Characterization of Biodegradable Chitosan Films for Local Delivery of Paclitaxel. *AAPS Journal* **2004**, *6* (3), 88-99.
191. Rodrigues, L. B.; Leite, H. F.; Yoshida, M. I.; Saliba, J. B.; Cunha, A. S.; Faraco, A. A., In Vitro Release and Characterization of Chitosan Films as Dexamethasone Carrier. *International Journal of Pharmaceutics* **2009**, *368* (1-2), 1-6.
192. Smith, J. K.; Bumgardner, J. D.; Courtney, H. S.; Smeltzer, M. S.; Haggard, W. O., Antibiotic-Loaded Chitosan Film for Infection Prevention: A Preliminary In Vitro Characterization. *Journal of Biomedical Materials Research B* **2010**, *94* (1), 203-211.
193. Noel, S. P.; Courtney, H.; Bumgardner, J. D.; Haggard, W. O., Chitosan Films: A Potential Local Drug Delivery System for Antibiotics. *Clinical Orthopaedics and Related Research* **2008**, *466* (6), 1377-1382.
194. Bavarsad, N.; Kouchak, M.; Mohamadipour, P.; Sadeghi-Nejad, B., Preparation and Physicochemical Characterization of Topical Chitosan-Based Film Containing Griseofulvin-Loaded Liposomes. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research* **2016**, *7* (3), 91-98.
195. Wu, Y. Y.; Jiao, Y. P.; Xiao, L. L.; Li, M. M.; Liu, H. W.; Li, S. H.; Liao, X.; Chen, Y. T.; Li, J. X.; Zhang, Y., Experimental Study on Effects of Adipose-Derived Stem Cell-Seeded Silk Fibroin Chitosan Film on Wound Healing of a Diabetic Rat Model. *Annals of Plastic Surgery* **2018**, *80* (5), 572-580.
196. Abarrategi, A.; Civantos, A.; Ramos, V.; Sanz Casado, J. V.; López-Lacomba, J. L., Chitosan Film as rhBMP2 Carrier: Delivery Properties for Bone Tissue Application. *Biomacromolecules* **2008**, *9* (2), 711-718.
197. Liu, H.; Qu, X.; Kim, E.; Lei, M.; Dai, K.; Tan, X.; Xu, M.; Li, J.; Liu, Y.; Shi, X.; Li, P.; Payne, G. F.; Liu, C., Bio-Inspired Redox-Cycling Antimicrobial Film for Sustained Generation of Reactive Oxygen Species. *Biomaterials* **2018**, *162*, 109-122.
198. Ignatova, M.; Manolova, N.; Rashkov, I., Electrospun Antibacterial Chitosan-Based Fibers. *Macromolecular Bioscience* **2013**, *13* (7), 860-872.
199. Ignatova, M.; Manolova, N.; Rashkov, I., Novel Antibacterial Fibers of Quaternized Chitosan and Poly(vinyl pyrrolidone) Prepared by Electrospinning. *European Polymer Journal* **2007**, *43* (4), 1112-1122.
200. Arvand, M.; Mirzaei, E.; Derakhshan Mohammad, A.; Kharrazi, S.; Sadroddiny, E.; Babapour, M.; Faridi-Majidi, R., Fabrication of Antibacterial Silver Nanoparticle-Modified Chitosan Fibers using Eucalyptus Extract as a Reducing Agent. *Journal of Applied Polymer Science* **2015**, *132* (25), 42133.
201. Zhou, Z.; Yan, D.; Cheng, X.; Kong, M.; Liu, Y.; Feng, C.; Chen, X., Biomaterials Based on N,N,N-Trimethyl Chitosan Fibers in Wound Dressing Applications. *International Journal of Biological Macromolecules* **2016**, *89*, 471-476.
202. Zhou, Y.; Yang, H.; Liu, X.; Mao, J.; Gu, S.; Xu, W., Potential of Quaternization-Functionalized Chitosan Fiber for Wound Dressing. *International Journal of Biological Macromolecules* **2013**, *52*, 327-332.

203. Cooper, A.; Bhattarai, N.; Zhang, M., Fabrication and Cellular Compatibility of Aligned Chitosan–PCL Fibers for Nerve Tissue Regeneration. *Carbohydrate Polymers* **2011**, *85* (1), 149-156.
204. Funakoshi, T.; Majima, T.; Iwasaki, N.; Yamane, S.; Masuko, T.; Minami, A.; Harada, K.; Tamura, H.; Tokura, S.; Nishimura, S., Novel Chitosan-Based Hyaluronan Hybrid Polymer Fibers as a Scaffold in Ligament Tissue Engineering. *Journal of Biomedical Materials Research A* **2005**, *74* (3), 338-346.
205. Lian, Q.; Li, D.; Jin, Z.; Wang, J.; Li, A.; Wang, Z., Fabrication and In Vitro Evaluation of Calcium Phosphate Combined with Chitosan Fibers for Scaffold Structures. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* **2009**, *24* (1_suppl), 113-124.
206. Tuzlakoglu, K.; Alves, C. M.; Mano, J. F.; Reis, R. L., Production and Characterization of Chitosan Fibers and 3-D Fiber Mesh Scaffolds for Tissue Engineering Applications. *Macromolecular Bioscience* **2004**, *4* (8), 811-819.
207. Huang, X.; Bao, X.; Wang, Z.; Hu, Q., A Novel Silver-Loaded Chitosan Composite Sponge with Sustained Silver Release as a Long-Lasting Antimicrobial Dressing. *RSC Advances* **2017**, *7* (55), 34655-34663.
208. Vo, D. T.; Lee, C. K., Antimicrobial Sponge Prepared by Hydrophobically Modified Chitosan for Bacteria Removal. *Carbohydrate Polymers* **2018**, *187*, 1-7.
209. Revi, D.; Paul, W.; Anilkumar, T. V.; Sharma, C. P., Chitosan Scaffold Co-Cultured with Keratinocyte and Fibroblast Heals Full Thickness Skin Wounds in Rabbit. *Journal of Biomedical Materials Research A* **2014**, *102* (9), 3273-3281.
210. Lu, B.; Wang, T.; Li, Z.; Dai, F.; Lv, L.; Tang, F.; Yu, K.; Liu, J.; Lan, G., Healing of Skin Wounds with a Chitosan-Gelatin Sponge Loaded with Tannins and Platelet-Rich Plasma. *International Journal of Biological Macromolecules* **2016**, *82*, 884-891.
211. Liang, D.; Lu, Z.; Yang, H.; Gao, J.; Chen, R., Novel Asymmetric Wetttable AgNPs/Chitosan Wound Dressing: In Vitro and In Vivo Evaluation. *ACS Applied Materials and Interfaces* **2016**, *8* (6), 3958-3968.
212. Han, F.; Dong, Y.; Su, Z.; Yin, R.; Song, A.; Li, S., Preparation, Characteristics and Assessment of a Novel Gelatin-Chitosan Sponge Scaffold as Skin Tissue Engineering Material. *International Journal of Pharmaceutics* **2014**, *476* (1-2), 124-133.
213. Lu, Z.; Gao, J.; He, Q.; Wu, J.; Liang, D.; Yang, H.; Chen, R., Enhanced Antibacterial and Wound Healing Activities of Microporous Chitosan-Ag/ZnO Composite Dressing. *Carbohydrate Polymers* **2017**, *156*, 460-469.
214. Parker, A. C.; Beenken, K. E.; Jennings, J. A.; Hittle, L.; Shirliff, M. E.; Bumgardner, J. D.; Smeltzer, M. S.; Haggard, W. O., Characterization of Local Delivery with Amphotericin B and Vancomycin from Modified Chitosan Sponges and Functional Biofilm Prevention Evaluation. *Journal of Orthopaedic Research* **2015**, *33* (3), 439-447.
215. Jennings, J. A.; Beenken, K. E.; Parker, A. C.; Smith, J. K.; Courtney, H. S.; Smeltzer, M. S.; Haggard, W. O., Polymicrobial Biofilm Inhibition Effects of Acetate-Buffered Chitosan Sponge Delivery Device. *Macromolecular Bioscience* **2016**, *16* (4), 591-598.
216. Kassem, M. A.; ElMeshad, A. N.; Fares, A. R., Lyophilized Sustained Release Mucoadhesive Chitosan Sponges for Buccal Buspirone Hydrochloride Delivery: Formulation and In Vitro Evaluation. *AAPS PharmSciTech* **2015**, *16* (3), 537-547.
217. Chen, J.; Li, Y.; Wang, B.; Yang, J.; Heng, B. C.; Yang, Z.; Ge, Z.; Lin, J., TGF- β 1 Affinity Peptides Incorporated within a Chitosan Sponge Scaffold can Significantly Enhance Cartilage Regeneration. *Journal of Materials Chemistry B* **2018**, *6* (4), 675-687.
218. Crini, G., Review: A History of Cyclodextrins. *Chemical Reviews* **2014**, *114* (21), 10940-10975.

219. Del Valle, E. M. M., Cyclodextrins and their Uses: A Review. *Process Biochemistry* **2004**, 39 (9), 1033-1046.
220. Reineccius, T. A.; Reineccius, G. A.; Peppard, T. L., Encapsulation of Flavors using Cyclodextrins: Comparison of Flavor Retention in Alpha, Beta, and Gamma Types. *Journal of Food Science* **2006**, 67 (9), 3271-3279.
221. Shaw, P. E.; Tatum, J. H.; Wilson, C. W., Improved Flavor of Navel Orange and Grapefruit Juices by Removal of Bitter Components with Beta-Cyclodextrin Polymer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1984**, 32 (4), 832-836.
222. Numanoglu, U.; Sen, T.; Tarimci, N.; Kartal, M.; Koo, O. M.; Onyüksel, H., Use of Cyclodextrins as a Cosmetic Delivery System for Fragrance Materials: Linalool and Benzyl Acetate. *AAPS PharmSciTech* **2007**, 8 (4), E85.
223. Scalia, S.; Molinari, A.; Casolari, A.; Maldotti, A., Complexation of the Sunscreen Agent, Phenylbenzimidazole Sulphonic Acid with Cyclodextrins: Effect on Stability and Photo-Induced Free Radical Formation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2004**, 22 (4), 241-249.
224. Scalia, S.; Villani, S.; Scatturin, A.; Vandelli, M. A.; Forni, F., Complexation of the Sunscreen Agent, Butyl-Methoxydibenzoylmethane, with Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin. *International Journal of Pharmaceutics* **1998**, 175 (2), 205-213.
225. Scalia, S.; Tursilli, R.; Iannuccelli, V., Complexation of the Sunscreen Agent, 4-Methylbenzylidene Camphor with Cyclodextrins: Effect on Photostability and Human Stratum Corneum Penetration. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2007**, 44 (1), 29-34.
226. Tanaka, M.; Iwata, Y.; Kouzuki, Y.; Taniguchi, K.; Matsuda, H.; Arima, H.; Tsuchiya, S., Effect of 2-Hydroxypropyl-Beta-Cyclodextrin on Percutaneous Absorption of Methyl Paraben. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* **1995**, 47 (11), 897-900.
227. Cireli, A.; Yurdakul, B., Application of Cyclodextrin to the Textile Dyeing and Washing Processes. *Journal of Applied Polymer Science* **2006**, 100 (1), 208-218.
228. Savarino, P.; Viscardi, G.; Quagliotto, P.; Montoneri, E.; Barni, E., Reactivity and Effects of Cyclodextrins in Textile Dyeing. *Dyes and Pigments* **1999**, 42 (2), 143-147.
229. Lo Nostro, P.; Fraton, L.; Baglioni, P., Modification of a Cellulosic Fabric with β -Cyclodextrin for Textile Finishing Applications. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* **2002**, 44 (1), 423-427.
230. Ortiz Mellet, C.; García Fernández, J. M.; Benito, J. M., Cyclodextrin-Based Gene Delivery Systems. *Chemical Society Reviews* **2011**, 40 (3), 1586-1608.
231. Otero-Espinar, F. J.; Torres-Labandeira, J. J.; Alvarez-Lorenzo, C.; Blanco-Méndez, J., Cyclodextrins in Drug Delivery Systems. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* **2010**, 20 (4), 289-301.
232. Hwang Pun, S.; Gonzalez, H.; Davis, M. E.; Bellocq, N. C.; Cheng, J., Complexing Agents for Compositions Containing Inclusion Complexes. **2015**, US20150031753.
233. Tripodo, G.; Wischke, C.; Neffe, A. T.; Lendlein, A., Efficient Synthesis of Pure Monotosylated Beta-Cyclodextrin and its Dimers. *Carbohydrate Research* **2013**, 381, 59-63.
234. Xu, M.; Wu, S.; Zeng, F.; Yu, C., Cyclodextrin Supramolecular Complex as a Water-Soluble Ratiometric Sensor for Ferric Ion Sensing. *Langmuir* **2010**, 26 (6), 4529-4534.
235. Gonil, P.; Sajomsang, W.; Ruktanonchai, U. R.; Pimpha, N.; Sramala, I.; Nuchuchua, O.; Saesoo, S.; Chaleawler-umpon, S.; Puttipipatkachorn, S., Novel Quaternized Chitosan Containing β -Cyclodextrin Moiety: Synthesis, Characterization and Antimicrobial Activity. *Carbohydrate Polymers* **2011**, 83 (2), 905-913.
236. Yang, J. S.; Han, S. Y.; Yang, L.; Zheng, H. C., Synthesis of Beta-Cyclodextrin-Grafted-Alginate and its Application for Removing Methylene Blue from Water Solution. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **2014**, 91 (3), 618-623.

237. Tan, L.; Liu, Y.; Ha, W.; Ding, L.-S.; Peng, S.-L.; Zhang, S.; Li, B.-J., Stimuli-Induced Gel-Sol Transition of Multi-Sensitive Supramolecular Beta-Cyclodextrin Grafted Alginate/Ferrocene Modified Pluronic Hydrogel. *Soft Matter* **2012**, *8* (21), 5746-5749.
238. Pluemsab, W.; Sakairi, N.; Furuike, T., Synthesis and Inclusion Property of Alpha-Cyclodextrin-Linked Alginate. *Polymer* **2005**, *46* (23), 9778-9783.
239. Kohn, J.; Wilchek, M., Mechanism of Activation of Sepharose and Sephadex by Cyanogen Bromide. *Enzyme and Microbial Technology* **1982**, *4* (3), 161-163.
240. Jaime, C.; Redondo, J.; Sánchez-Ferrando, F.; Virgili, A., β -Cyclodextrin Inclusion Complex with Adamantane Intermolecular $^1\text{H}\{^1\text{H}\}$ NOE Determinations and Molecular Mechanics Calculations. *Journal of Molecular Structure* **1991**, *248* (3), 317-329.
241. Sadrerafi, K.; Moore, E.; Lee, M., Association Constant of β -Cyclodextrin with Carboranes, Adamantane, and their Derivatives using Displacement Binding Technique. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* **2015**, *83* (1-2), 159-166.
242. Li, L.; Guo, X.; Wang, J.; Liu, P.; Prud'homme, R. K.; May, B. L.; Lincoln, S. F., Polymer Networks Assembled by Host-Guest Inclusion between Adamantyl and β -Cyclodextrin Substituents on Poly(acrylic acid) in Aqueous Solution. *Macromolecules* **2008**, *41* (22), 8677-8681.
243. Koopmans, C.; Ritter, H., Formation of Physical Hydrogels via Host-Guest Interactions of β -Cyclodextrin Polymers and Copolymers Bearing Adamantyl Groups. *Macromolecules* **2008**, *41* (20), 7418-7422.
244. Charlot, A.; Auzély-Velty, R., Synthesis of Novel Supramolecular Assemblies Based on Hyaluronic Acid Derivatives Bearing Bivalent β -Cyclodextrin and Adamantane Moieties. *Macromolecules* **2007**, *40* (4), 1147-1158.
245. Christoforides, E.; Papaioannou, A.; Bethanis, K., Crystal Structure of the Inclusion Complex of Cholesterol in β -Cyclodextrin and Molecular Dynamics Studies. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* **2018**, *14*, 838-848.
246. Breslow, R.; Zhang, B., Cholesterol Recognition and Binding by Cyclodextrin Dimers. *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118* (35), 8495-8496.
247. Van de Manacker, F.; Van der Pot, M.; Vermonden, T.; Van Nostrum, C. F.; Hennink, W. E., Self-Assembling Hydrogels Based on β -Cyclodextrin/Cholesterol Inclusion Complexes. *Macromolecules* **2008**, *41* (5), 1766-1773.
248. Kwak, H. S.; Kim, S. H.; Kim, J. H.; Choi, H. J.; Kang, J., Immobilized Beta-Cyclodextrin as a Simple and Recyclable Method for Cholesterol Removal in Milk. *Archives of Pharmaceutical Research* **2004**, *27* (8), 873-877.
249. Kim, S.-H.; Han, E.-M.; Ahn, J.; Kwak, H.-S., Effect of Crosslinked β -Cyclodextrin on Quality of Cholesterol-Reduced Cream Cheese. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* **2005**, *18* (4), 584-589.
250. Hooley, R. J.; Biros, S. M.; Rebek, J., A Deep, Water-Soluble Cavitand Acts as a Phase-Transfer Catalyst for Hydrophobic Species. *Angewandte Chemie* **2006**, *45* (21), 3517-3519.
251. Ton, X. A.; Tse Sum Bui, B.; Resmini, M.; Bonomi, P.; Dika, I.; Soppera, O.; Haupt, K., A Versatile Fiber-Optic Fluorescence Sensor Based on Molecularly Imprinted Microstructures Polymerized In Situ. *Angewandte Chemie* **2013**, *52* (32), 8317-8321.
252. Yang, D. B.; Zhu, J. B.; Huang, Z. J.; Ren, H. X.; Zheng, Z. J., Synthesis and Application of Poly(Ethylene Glycol)-Cholesterol (Chol-PEGm) Conjugates in Physicochemical Characterization of Nonionic Surfactant Vesicles. *Colloids and Surfaces B Biointerfaces* **2008**, *63* (2), 192-199.
253. Foley, T. L.; Yasgar, A.; Garcia, C. J.; Jadhav, A.; Simeonov, A.; Burkart, M. D., Preparation of FRET Reporters to Support Chemical Probe Development. *Organic and Biomolecular Chemistry* **2010**, *8* (20), 4601-4606.

254. Silva, D.; Pinto, L. F. V.; Bozukova, D.; Santos, L. F.; Serro, A. P.; Saramago, B., Chitosan/Alginate Based Multilayers to Control Drug Release from Ophthalmic Lens. *Colloids and Surfaces B Biointerfaces* **2016**, *147*, 81-89.
255. Kyung, K.-H.; Kim, S.-H.; Shiratori, S., Preparation and Characterization of Antithrombogenic Chitosan/Alginate Films with Enhanced Physical Stability by Cross-Linking Using Layer-By-Layer Method. *MATEC Web of Conferences* **2013**, *4*, 05008.
256. Shanmugasundaram, O. L., Development and Characterization of Cotton and Organic Cotton Gauze Fabric Coated with Biopolymers and Antibiotic Drugs for Wound Healing. *Indian Journal of Fibre and Textile Research* **2012**, *37*, 146-150.
257. Shanmugasundaram, O. L.; Mahendra Gowda, R. V., Development and Characterization of Cotton, Organic Cotton Flat Knit Fabrics Coated with Chitosan, Sodium Alginate, Calcium Alginate Polymers, and Antibiotic Drugs for Wound Healing. *Journal of Industrial Textiles* **2011**, *42* (2), 156-175.
258. Feng, W.; Nie, W.; He, C.; Zhou, X.; Chen, L.; Qiu, K.; Wang, W.; Yin, Z., Effect of pH-Responsive Alginate/Chitosan Multilayers Coating on Delivery Efficiency, Cellular Uptake and Biodistribution of Mesoporous Silica Nanoparticles Based Nanocarriers. *ACS Applied Materials and Interfaces* **2014**, *6* (11), 8447-8460.
259. Kievit, F. M.; Florczyk, S. J.; Leung, M. C.; Wang, K.; Wu, J. D.; Silber, J. R.; Ellenbogen, R. G.; Lee, J. S.; Zhang, M., Proliferation and Enrichment of CD133(+) Glioblastoma Cancer Stem Cells on 3D Chitosan-Alginate Scaffolds. *Biomaterials* **2014**, *35* (33), 9137-9143.
260. Kievit, F. M.; Wang, K.; Erickson, A. E.; Lan Levengood, S. K.; Ellenbogen, R. G.; Zhang, M., Modeling the Tumor Microenvironment Using Chitosan-Alginate Scaffolds to Control the Stem-Like State of Glioblastoma Cells. *Biomaterials Science* **2016**, *4* (4), 610-613.
261. Florczyk, S. J.; Kievit, F. M.; Wang, K.; Erickson, A. E.; Ellenbogen, R. G.; Zhang, M., 3D Porous Chitosan-Alginate Scaffolds Promote Proliferation and Enrichment of Cancer Stem-Like Cells. *Journal of Materials Chemistry B* **2016**, *4* (38), 6326-6334.
262. Wang, K.; Kievit, F. M.; Florczyk, S. J.; Stephen, Z. R.; Zhang, M., 3D Porous Chitosan-Alginate Scaffolds as an In Vitro Model for Evaluating Nanoparticle-Mediated Tumor Targeting and Gene Delivery to Prostate Cancer. *Biomacromolecules* **2015**, *16* (10), 3362-3372.
263. Chung, T. W.; Yang, J.; Akaike, T.; Cho, K. Y.; Nah, J. W.; Kim, S. I.; Cho, C. S., Preparation of Alginate/Galactosylated Chitosan Scaffold for Hepatocyte Attachment. *Biomaterials* **2002**, *23* (14), 2827-2834.
264. Bagre, A. P.; Jain, K.; Jain, N. K., Alginate Coated Chitosan Core Shell Nanoparticles for Oral Delivery of Enoxaparin: In Vitro and In Vivo Assessment. *International Journal of Pharmaceutics* **2013**, *456* (1), 31-40.
265. Li, P.; Dai, Y. N.; Zhang, J. P.; Wang, A. Q.; Wei, Q., Chitosan-Alginate Nanoparticles as a Novel Drug Delivery System for Nifedipine. *International Journal of Biomedical Science* **2008**, *4* (3), 221-228.
266. Nagarwal, R. C.; Kumar, R.; Pandit, J. K., Chitosan Coated Sodium Alginate-Chitosan Nanoparticles Loaded with 5-FU for Ocular Delivery: In Vitro Characterization and In Vivo Study in Rabbit Eye. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2012**, *47* (4), 678-685.
267. Biswas, S.; Chattopadhyay, M.; Sen, K. K.; Saha, M. K., Development and Characterization of Alginate Coated Low Molecular Weight Chitosan Nanoparticles as New Carriers for Oral Vaccine Delivery in Mice. *Carbohydrate Polymers* **2015**, *121*, 403-410.

268. Neeraj, K.; Shatakshee, C., Alginate Coated Chitosan Nanoparticles as Potential Oral Vaccine Carriers: Synthesis and In-Vitro Characterization. *Nano Science and Nano Technology* **2011**, 5 (1), 59-62.
269. Azevedo, M. A.; Bourbon, A. I.; Vicente, A. A.; Cerqueira, M. A., Alginate/Chitosan Nanoparticles for Encapsulation and Controlled Release of Vitamin B2. *International Journal of Biological Macromolecules* **2014**, 71, 141-146.
270. Maestrelli, F.; Jug, M.; Cirri, M.; Kosalec, I.; Mura, P., Characterization and Microbiological Evaluation of Chitosan-Alginate Microspheres for Cefixime Vaginal Administration. *Carbohydrate Polymers* **2018**, 192, 176-183.
271. Abd El Rasoul, S.; Ahmed, M., Chitosan Polymer as a Coat of Calcium Alginate Microcapsules Loaded by Non-Steroidal Antiinflammatory Drug. *Bulletin of Pharmaceutical Sciences* **2010**, 33, 179-187.
272. Petta, S.; J., V. R.; Kasa, R. R., Design and Evaluation of Controlled Release Chitosan-Calcium Alginate Microcapsules of Anti Tubercular Drugs for Oral Use. *International Journal of ChemTech Research* **2003**, 2 (1), 88-98.
273. Shukla, R.; Gupta, J.; Shukla, P.; Dwivedi, P.; Tripathi, P.; Bhattacharya, S. M.; Mishra, P. R., Chitosan Coated Alginate Micro Particles for the Oral Delivery of Antifilarial Drugs and Combinations for Intervention in Brugia Malayi Induced Lymphatic Filariasis. *RSC Advances* **2015**, 5 (85), 69047-69056.
274. Araujo, V.; Gamboa, A.; Caro, N.; Abugoch, L.; Gotteland, M.; Valenzuela, F.; Merchant, H. A.; Basit, A. W.; Tapia, C., Release of Prednisolone and Inulin from a New Calcium-Alginate Chitosan-Coated Matrix System for Colonic Delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2013**, 102 (8), 2748-2759.
275. Deka, C.; Deka, D.; Bora, M. M.; Jha, D. K.; Kakati, D. K., Synthesis of Peppermint Oil-Loaded Chitosan/Alginate Polyelectrolyte Complexes and Study of their Antibacterial Activity. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* **2016**, 35, 314-322.
276. Zheng, C. H.; Liang, W. Q.; Li, F.; Zhang, Y. P.; Fang, W. J., Optimization and Characterization of Chitosan-Coated Alginate Microcapsules Containing Albumin. *Pharmazie* **2005**, 60 (6), 434-438.
277. Omer, A. M.; Tamer, T. M.; Hassan, M. A.; Rychter, P.; Mohy Eldin, M. S.; Koseva, N., Development of Amphoteric Alginate/Aminated Chitosan Coated Microbeads for Oral Protein Delivery. *International Journal of Biological Macromolecules* **2016**, 92, 362-370.
278. Onishi, H.; Koyama, K.; Sakata, O.; Machida, Y., Preparation of Chitosan/Alginate/Calcium Complex Microparticles Loaded with Lactoferrin and Their Efficacy on Carrageenan-Induced Edema in Rats. *Drug Development and Industrial Pharmacy* **2010**, 36 (8), 879-884.
279. Wang, F. Q.; Li, P.; Zhang, J. P.; Wang, A. Q.; Wei, Q., A Novel pH-Sensitive Magnetic Alginate-Chitosan Beads for Albendazole Delivery. *Drug Development and Industrial Pharmacy* **2010**, 36 (7), 867-877.
280. Liu, H. J.; Li, P.; Wei, Q., Magnetic N-Succinyl Chitosan/Alginate Beads for Carbamazepine Delivery. *Drug Development and Industrial Pharmacy* **2010**, 36 (11), 1286-1294.
281. Wong, T. W.; Nurulaini, H., Sustained-Release Alginate-Chitosan Pellets Prepared by Melt Pelletization Technique. *Drug Development and Industrial Pharmacy* **2012**, 38 (12), 1417-1427.
282. Li, L.; Wang, L.; Shao, Y.; Ni, R.; Zhang, T.; Mao, S., Drug Release Characteristics from Chitosan-Alginate Matrix Tablets Based on the Theory of Self-Assembled Film. *International Journal of Pharmaceutics* **2013**, 450 (1-2), 197-207.

283. Kaygusuz, H.; Torlak, E.; Akın-Evingür, G.; Özen, İ.; Von Klitzing, R.; Erim, F. B., Antimicrobial Cerium Ion-Chitosan Crosslinked Alginate Biopolymer Films: A Novel and Potential Wound Dressing. *International Journal of Biological Macromolecules* **2017**, *105* (Pt 1), 1161-1165.
284. Wang, L.; Khor, E.; Wee, A.; Lim, L. Y., Chitosan-Alginate PEC Membrane as a Wound Dressing: Assessment of Incisional Wound Healing. *Journal of Biomedical Materials Research* **2002**, *63* (5), 610-618.
285. Hu, Z.; Ouyang, Q. Q.; Cheng, Y.; Hong, P. Z.; Liao, M. N.; Chen, F. J.; Li, S. D., Optimization of Preparation Process and Characterization of Carboxymethyl Chitosan/Sodium Alginate Hemostatic Sponge. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* **2017**, *213* (1), 012045.
286. Öztürk, E.; Ağalar, C.; Keçeci, K.; Denkbaşı Emir, B., Preparation and Characterization of Ciprofloxacin-Loaded Alginate/Chitosan Sponge as a Wound Dressing Material. *Journal of Applied Polymer Science* **2006**, *101* (3), 1602-1609.
287. Dumont, M.; Villet, R.; Guirand, M.; Montembault, A.; Delair, T.; Lack, S.; Barikosky, M.; Crepet, A.; Alcouffe, P.; Laurent, F.; David, L., Processing and Antibacterial Properties of Chitosan-Coated Alginate Fibers. *Carbohydrate Polymers* **2018**, *190*, 31-42.
288. Reed, S.; Wu, B. M., Biological and Mechanical Characterization of Chitosan-Alginate Scaffolds for Growth Factor Delivery and Chondrogenesis. *Journal of Biomedical Materials Research B* **2017**, *105* (2), 272-282.
289. Li, Z.; Zhang, M., Chitosan-Alginate as Scaffolding Material for Cartilage Tissue Engineering. *Journal of Biomedical Materials Research A* **2005**, *75* (2), 485-493.
290. Iwasaki, N.; Yamane, S.-T.; Majima, T.; Kasahara, Y.; Minami, A.; Harada, K.; Nonaka, S.; Maekawa, N.; Tamura, H.; Tokura, S.; Shiono, M.; Monde, K.; Nishimura, S.-I., Feasibility of Polysaccharide Hybrid Materials for Scaffolds in Cartilage Tissue Engineering: Evaluation of Chondrocyte Adhesion to Polyion Complex Fibers Prepared from Alginate and Chitosan. *Biomacromolecules* **2004**, *5* (3), 828-833.
291. Seo, S. J.; Kim, I. Y.; Choi, Y. J.; Akaike, T.; Cho, C. S., Enhanced Liver Functions of Hepatocytes Cocultured with NIH 3T3 in the Alginate/Galactosylated Chitosan Scaffold. *Biomaterials* **2006**, *27* (8), 1487-1495.
292. Yang, J.; Woong Chung, T.; Nagaoka, M.; Goto, M.; Cho, C.-S.; Akaike, T., Hepatocyte-Specific Porous Polymer-Scaffolds of Alginate/Galactosylated Chitosan Sponge for Liver-Tissue Engineering. *Biotechnology Letters* **2001**, *23* (17), 1385-1389.
293. Chen, F.; Tian, M.; Zhang, D.; Wang, J.; Wang, Q.; Yu, X.; Zhang, X.; Wan, C., Preparation and Characterization of Oxidized Alginate Covalently Cross-Linked Galactosylated Chitosan Scaffold for Liver Tissue Engineering. *Materials Science and Engineering C* **2012**, *32* (2), 310-320.
294. Francis, N. L.; Hunger, P. M.; Donius, A. E.; Riblett, B. W.; Zavaliangos, A.; Wegst, U. G.; Wheatley, M. A., An Ice-Templated, Linearly Aligned Chitosan-Alginate Scaffold for Neural Tissue Engineering. *Journal of Biomedical Materials Research A* **2013**, *101* (12), 3493-3503.
295. Pfister, L. A.; Papaloizos, M.; Merkle, H. P.; Gander, B., Hydrogel Nerve Conduits Produced from Alginate/Chitosan Complexes. *Journal of Biomedical Materials Research A* **2007**, *80* (4), 932-937.
296. Li, Z.; Ramay, H. R.; Hauch, K. D.; Xiao, D.; Zhang, M., Chitosan-Alginate Hybrid Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Biomaterials* **2005**, *26* (18), 3919-3928.
297. Florczyk, S. J.; Leung, M.; Li, Z.; Huang, J. I.; Hopper, R. A.; Zhang, M., Evaluation of Three-Dimensional Porous Chitosan-Alginate Scaffolds in Rat Calvarial

- Defects for Bone Regeneration Applications. *Journal of Biomedical Materials Research A* **2013**, *101* (10), 2974-2983.
298. Venkatesan, J.; Bhatnagar, I.; Kim, S. K., Chitosan-Alginate Biocomposite Containing Fucoïdan for Bone Tissue Engineering. *Marine Drugs* **2014**, *12* (1), 300-316.
299. Liu, X.; Peng, W.; Wang, Y.; Zhu, M.; Sun, T.; Peng, Q.; Zeng, Y.; Feng, B.; Lu, X.; Weng, J.; Wang, J., Synthesis of an RGD-Grafted Oxidized Sodium Alginate-N-Succinyl Chitosan Hydrogel and an In Vitro Study of Endothelial and Osteogenic Differentiation. *Journal of Materials Chemistry B* **2013**, *1* (35), 4484-4492.
300. Park, D. J.; Choi, B. H.; Zhu, S. J.; Huh, J. Y.; Kim, B. Y.; Lee, S. H., Injectable Bone Using Chitosan-Alginate Gel/Mesenchymal Stem Cells/BMP-2 Composites. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* **2005**, *33* (1), 50-54.
301. Majima, T.; Funakoshi, T.; Iwasaki, N.; Yamane, S. T.; Harada, K.; Nonaka, S.; Minami, A.; Nishimura, S., Alginate and Chitosan Polyion Complex Hybrid Fibers for Scaffolds in Ligament and Tendon Tissue Engineering. *Journal of Orthopaedic Science* **2005**, *10* (3), 302-307.
302. Ziv, K.; Nuhn, H.; Ben-Haim, Y.; Sasportas, L. S.; Kempen, P. J.; Niedringhaus, T. P.; Hrynyk, M.; Sinclair, R.; Barron, A. E.; Gambhir, S. S., A Tunable Silk-Alginate Hydrogel Scaffold for Stem Cell Culture and Transplantation. *Biomaterials* **2014**, *35* (12), 3736-3743.
303. Mladenovska, K.; Cruaud, O.; Richomme, P.; Belamie, E.; Raicki, R. S.; Venier-Julienne, M. C.; Popovski, E.; Benoit, J. P.; Goracinova, K., 5-ASA Loaded Chitosan-Ca-Alginate Microparticles: Preparation and Physicochemical Characterization. *International Journal of Pharmaceutics* **2007**, *345* (1-2), 59-69.
304. Cury, J. A.; Bragotto, C.; Valdrighi, L., The Demineralizing Efficiency of EDTA Solutions on Dentin. I. Influence of pH. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* **1981**, *52* (4), 446-448.
305. Godugu, C.; Patel, A. R.; Desai, U.; Andey, T.; Sams, A.; Singh, M., AlgiMatrix™ Based 3D Cell Culture System as an In-Vitro Tumor Model for Anticancer Studies. *PLoS ONE* **2013**, *8* (1), e53708.
306. Coussens, L. M.; Werb, Z., Inflammation and Cancer. *Nature* **2002**, *420*, 860-867.
307. Richard, D.; Chevalet, P.; Fournel, S.; Giraud, N.; Gros, F.; Laurenti, P.; Pradère, F.; Soubaya, T., *Biologie*. 2012.
308. Sarma, J. V.; Ward, P. A., The Complement System. *Cell and Tissue Research* **2011**, *343* (1), 227-235.
309. Golias, C.; Charalabopoulos, A.; Stagikas, D.; Charalabopoulos, K.; Batistatou, A., The Kinin System--Bradykinin: Biological Effects and Clinical Implications. Multiple Role of the Kinin System--Bradykinin. *Hippokratia* **2007**, *11* (3), 124-128.
310. Sharma, J. N.; Al-Omran, A.; Parvathy, S. S., Role of Nitric Oxide in Inflammatory Diseases. *Inflammopharmacology* **2007**, *15* (6), 252-259.
311. Kumar, R.; Clermont, G.; Vodovotz, Y.; Chow, C. C., The Dynamics of Acute Inflammation. *Journal of Theoretical Biology* **2004**, *230* (2), 145-155.
312. Merrell, J. G.; McLaughlin, S. W.; Tie, L.; Laurencin, C. T.; Chen, A. F.; Nair, L. S., Curcumin-Loaded Poly(Epsilon-Caprolactone) Nanofibres: Diabetic Wound Dressing with Anti-Oxidant and Anti-Inflammatory Properties. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* **2009**, *36* (12), 1149-1156.
313. Méndez, J. A.; Fernández, M.; González-Corchón, A.; Salvado, M.; Collía, F.; de Pedro, J. A.; Levenfeld, B. L.; López-Bravo, A.; Vázquez, B.; San Román, J., Injectable Self-Curing Bioactive Acrylic-Glass Composites Charged with Specific Anti-Inflammatory/Analgesic Agent. *Biomaterials* **2004**, *25* (12), 2381-2392.

314. Ito, T.; Fraser, I. P.; Yeo, Y.; Highley, C. B.; Bellas, E.; Kohane, D. S., Anti-Inflammatory Function of an In Situ Cross-Linkable Conjugate Hydrogel of Hyaluronic Acid and Dexamethasone. *Biomaterials* **2007**, *28* (10), 1778-1786.
315. Webber, M. J.; Matson, J. B.; Tamboli, V. K.; Stupp, S. I., Controlled Release of Dexamethasone from Peptide Nanofiber Gels to Modulate Inflammatory Response. *Biomaterials* **2012**, *33* (28), 6823-6832.
316. Lee, C.-H.; Lo, L.-W.; Mou, C.-Y.; Yang, C.-S., Synthesis and Characterization of Positive-Charge Functionalized Mesoporous Silica Nanoparticles for Oral Drug Delivery of an Anti-Inflammatory Drug. *Advanced Functional Materials* **2008**, *18* (20), 3283-3292.
317. Wong, K. K.; Cheung, S. O.; Huang, L.; Niu, J.; Tao, C.; Ho, C. M.; Che, C. M.; Tam, P. K., Further Evidence of the Anti-Inflammatory Effects of Silver Nanoparticles. *ChemMedChem* **2009**, *4* (7), 1129-1135.
318. David, L.; Moldovan, B.; Vulcu, A.; Olenic, L.; Perde-Schrepler, M.; Fischer-Fodor, E.; Florea, A.; Crisan, M.; Chiorean, I.; Clichici, S.; Filip, G. A., Green Synthesis, Characterization and Anti-Inflammatory Activity of Silver Nanoparticles using European Black Elderberry Fruits Extract. *Colloids and Surfaces B Biointerfaces* **2014**, *122*, 767-777.
319. Moldovan, B.; David, L.; Vulcu, A.; Olenic, L.; Perde-Schrepler, M.; Fischer-Fodor, E.; Baldea, I.; Clichici, S.; Filip, G. A., In Vitro and In Vivo Anti-Inflammatory Properties of Green Synthesized Silver Nanoparticles Using Viburnum Opulus L. Fruits Extract. *Materials Science and Engineering C* **2017**, *79*, 720-727.
320. Hirst, S. M.; Karakoti, A. S.; Tyler, R. D.; Sriranganathan, N.; Seal, S.; Reilly, C. M., Anti-Inflammatory Properties of Cerium Oxide Nanoparticles. *Small* **2009**, *5* (24), 2848-2856.
321. Xu, M. X.; Zhu, Y. F.; Chang, H. F.; Liang, Y., Nanoceria Restrains PM2.5-Induced Metabolic Disorder and Hypothalamus Inflammation by Inhibition of Astrocytes Activation Related NF- κ B Pathway in Nrf2 Deficient Mice. *Free Radical Biology and Medicine* **2016**, *99*, 259-272.
322. Wang, H.; Zhu, H.; Fu, W.; Zhang, Y.; Xu, B.; Gao, F.; Cao, Z.; Liu, W., A High Strength Self-Healable Antibacterial and Anti-Inflammatory Supramolecular Polymer Hydrogel. *Macromolecular Rapid Communications* **2017**, *38* (9), 1600695.
323. Isa, I. L.; Srivastava, A.; Tiernan, D.; Owens, P.; Rooney, P.; Dockery, P.; Pandit, A., Hyaluronic Acid Based Hydrogels Attenuate Inflammatory Receptors and Neurotrophins in Interleukin-1 β Induced Inflammation Model of Nucleus Pulposus Cells. *Biomacromolecules* **2015**, *16* (6), 1714-1725.
324. Rosenfeld, Y.; Shai, Y., Lipopolysaccharide (Endotoxin)-Host Defense Antibacterial Peptides Interactions: Role in Bacterial Resistance and Prevention of Sepsis. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* **2006**, *1758* (9), 1513-1522.
325. Kelm, M., Nitric Oxide Metabolism and Breakdown. *Biochimica et Biophysica Acta* **1999**, *1411* (2-3), 273-289.
326. Bryan, N. S.; Grisham, M. B., Methods to Detect Nitric Oxide and its Metabolites in Biological Samples. *Free Radical Biology and Medicine* **2007**, *43* (5), 645-657.
327. Galdiero, S.; Falanga, A.; Cantisani, M.; Tarallo, R.; Della Pepa, M. E.; D'Orlando, V.; Galdiero, M., Microbe-Host Interactions: Structure and Role of Gram-Negative Bacterial Porins. *Current Protein and Peptide Science* **2012**, *13* (8), 843-854.
328. Eck, M. J.; Sprang, S. R., The Structure of Tumor Necrosis Factor-Alpha at 2.6 Å Resolution. Implications for Receptor Binding. *The Journal of Biological Chemistry* **1989**, *264* (29), 17595-17605.
329. Qin, H.; Wilson, C. A.; Lee, S. J.; Zhao, X.; Benveniste, E. N., LPS Induces CD40 Gene Expression Through the Activation of NF-KappaB and STAT-1alpha in Macrophages and Microglia. *Blood* **2005**, *106* (9), 3114-3122.

330. Scholzen, T.; Gerdes, J., The Ki-67 Protein: From the Known and the Unknown. *Journal of Cellular Physiology* **2000**, 182 (3), 311-322.
331. Yoon, H. J.; Moon, M. E.; Park, H. S.; Im, S. Y.; Kim, Y. H., Chitosan Oligosaccharide (COS) Inhibits LPS-Induced Inflammatory Effects in RAW 264.7 Macrophage Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2007**, 358 (3), 954-959.
332. Jie, Z.; Yuanyuan, Z.; Guoyou, W.; Zhen, X.; Huanqin, Z.; Xiaomei, Y., Inhibitory Effects of Oligochitosan on TNF- α , IL-1 β and Nitric Oxide Production in Lipopolysaccharide-Induced RAW264.7 Cells. *Molecular Medicine Reports* **2015**, 11 (1), 729-733.
333. Tejashri, G.; Amrita, B.; Darshana, J., Cyclodextrin Based Nanosponges for Pharmaceutical Use: A Review. *Acta Pharmaceutica* **2013**, 63 (3), 335-358.
334. Landry, Y.; Gies, J.-P., *Pharmacologie : Des Cibles Vers L'Indication Thérapeutique*. 2003.
335. Rozou, S.; Voulgari, A.; Antoniadou-Vyza, E., The Effect of pH Dependent Molecular Conformation and Dimerization Phenomena of Piroxicam on the Drug:Cyclodextrin Complex Stoichiometry and its Chromatographic Behaviour. A New Specific HPLC Method for Piroxicam:Cyclodextrin Formulations. *European Journal of Pharmaceutical Science* **2004**, 21 (5), 661-669.
336. Jug, M.; Bećirević-Laćan, M., Multicomponent Complexes of Piroxicam with Cyclodextrins and Hydroxypropyl Methylcellulose. *Drug Development and Industrial Pharmacy* **2004**, 30 (10), 1051-1060.
337. Deroubaix, X.; Stockis, A.; Allemon, A. M.; Lebacq, E.; Acerbi, D.; Ventura, P., Oral Bioavailability of CHF1194, an Inclusion Complex of Piroxicam and Beta-Cyclodextrin, in Healthy Subjects under Single Dose and Steady-State Conditions. *European Journal of Clinical Pharmacology* **1995**, 47 (6), 531-536.
338. Woodcock, B. G.; Acerbi, D.; Merz, P. G.; Rietbrock, S.; Rietbrock, N., Supramolecular Inclusion of Piroxicam with Beta-Cyclodextrin: Pharmacokinetic Properties in Man. *European Journal of Rheumatology and Inflammation* **1993**, 12 (4), 12-28.
339. Osadebe, P.; Onugwu, L. E.; Attama, A., Energetics of the Interaction Between Piroxicam and Beta-Cyclodextrin (Beta-CD) in Inclusion Complexes. *Scientific Research and Essay* **2008**, 3 (3), 86-93.
340. Nagabhushanam, M. V., Formulation Studies on Cyclodextrin Complexes of Piroxicam. *Rasayan Journal of Chemistry* **2010**, 3 (2), 314-320.
341. Chiong, H. S.; Yong, Y. K.; Ahmad, Z.; Sulaiman, M. R.; Zakaria, Z. A.; Yuen, K. H.; Hakim, M. N., Cytoprotective and Enhanced Anti-Inflammatory Activities of Liposomal Piroxicam Formulation in Lipopolysaccharide-Stimulated RAW 264.7 Macrophages. *International Journal of Nanomedicine* **2013**, 8, 1245-1255.
342. Kirkiacharian, S., *Guide de Chimie Médicinale et Médicaments*. 2010.
343. Djedaini, F.; Perly, B., Nuclear Magnetic Resonance Investigation of the Stoichiometries in Beta-Cyclodextrin:Steroid Inclusion Complexes. *Journal of Pharmaceutical Science* **1991**, 80 (12), 1157-1161.
344. Uekama, K.; Fujinaga, T.; Hirayama, F.; Otagiri, M.; Yamasaki, M., Inclusion Complexations of Steroid Hormones with Cyclodextrins in Water and in Solid Phase. *International Journal of Pharmaceutics* **1982**, 10 (1), 1-15.
345. Uekama, K.; Otagiri, M.; Uemura, Y.; Fujinaga, T.; Arimori, K.; Matsuo, N.; Tasaki, K.; Sugii, A., Improvement of Oral Bioavailability of Prednisolone by Beta-Cyclodextrin Complexation in Humans. *Journal of Pharmacobio-dynamics* **1983**, 6 (2), 124-127.

346. Ashok, R.; Prakash, P. P.; Tamil Selvan, R., Development and Validation of Analytical Method for Estimation of Prednisolone in Bulk and Tablets using UV-Visible Spectroscopy. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **2011**, 3 (4), 184-186.
347. Ali, M.; Senthil Kumar, S. K.; Parthiban, S., Design and Evaluation of pH Triggered Osmotically Controlled System for Ileo-Colonic Drug Delivery. *Asian Journal of Pharmaceutical Research* **2013**, 3 (2), 66-74.
348. Gasparini, G.; Bang, E. K.; Molinard, G.; Tulumello, D. V.; Ward, S.; Kelley, S. O.; Roux, A.; Sakai, N.; Matile, S., Cellular Uptake of Substrate-Initiated Cell-Penetrating Poly(disulfide)s. *Journal of the American Chemical Society* **2014**, 136 (16), 6069-6074.
349. Nair, D. P.; Podgórski, M.; Chatani, S.; Gong, T.; Xi, W.; Fenoli, C. R.; Bowman, C. N., The Thiol-Michael Addition Click Reaction: A Powerful and Widely Used Tool in Materials Chemistry. *Chemistry of Materials* **2014**, 26 (1), 724-744.

Publication associée

β -Cyclodextrin-Functionalized Chitosan/Alginate Compact Polyelectrolyte Complexes (CoPECs) as Functional Biomaterials with Anti-Inflammatory Properties

Alexandre Hardy,[†] Cendrine Seguin,[†] Anaïs Brion,[†] Philippe Laval,[‡] Pierre Schaaf,[‡] Sylvie Fournel,[†] Line Bourel-Bonnet,[†] Benoît Frisch,^{*,†} and Marcella De Giorgi^{*,†}

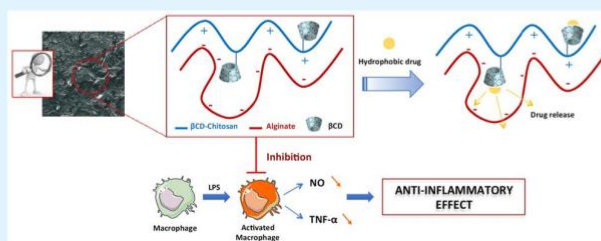
[†]Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, CNRS, Laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives UMR 7199, 74 route du Rhin, 67401 Illkirch Cedex, France

[‡]Faculté de Chirurgie Dentaire de Strasbourg, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, Université de Strasbourg, INSERM, Biomaterials and Bioengineering UMR 1121, 11, Rue Humann, 67085 Strasbourg Cedex, France

S Supporting Information

ABSTRACT: Nowadays, the need for therapeutic biomaterials displaying anti-inflammatory properties to fight against inflammation-related diseases is continuously increasing. Compact polyelectrolyte complexes (CoPECs) represent a new class of materials obtained by ultracentrifugation of a polyanion/polycation complex suspension in the presence of salt. Here, a noncytotoxic β -cyclodextrin-functionalized chitosan/alginate CoPEC was formulated, characterized, and described as a promising drug carrier displaying an intrinsic anti-inflammatory property. This new material was successfully formed, and due to the presence of cyclodextrins, it was able to trap and release hydrophobic drugs such as piroxicam used as a model drug. The intrinsic anti-inflammatory activity of this CoPEC was analyzed in vitro using murine macrophages in the presence of lipopolysaccharide (LPS) endotoxin. In this model, it was shown that CoPEC inhibited LPS-induced TNF- α and NO release and moderated the differentiation of LPS-activated macrophages. Over time, this kind of bioactive biomaterial could constitute a new family of delivery systems and expand the list of therapeutic tools available to target inflammatory chronic diseases such as arthritis or Crohn's disease.

KEYWORDS: natural biomaterials, CoPECs, chitosan, alginate, cyclodextrins, anti-inflammatory, drug carriers



1. INTRODUCTION

Nowadays, the development of biomaterials, such as nanoparticles and microparticles, beads, membranes, or implants, is of great importance in biomedical, biotechnological, and pharmaceutical fields. Biomaterials features, along with bio-industrial requirements, have progressively evolved from bio-inertia to biocompatibility and biodegradability, to finally target a fully controlled bioactivity. To date, the use of those therapeutic biomaterials is envisaged for the treatment of different diseases such as inflammatory chronic diseases.¹

Inflammation is part of the innate immune response involved in the fight against pathogens and cancer. Inflammation is physiologically induced by pathogen-associated molecular pattern (PAMP) or damage-associated molecular pattern (DAMP). For example, lipopolysaccharide (LPS), as part of Gram-negative bacteria cell wall (endotoxin), is a PAMP known to induce inflammation. Inflammation is physiologically highly regulated. However, in some cases, it becomes chronic and is involved in the development of many severe diseases, such as cancer, rheumatoid arthritis, or Crohn's disease. Numerous anti-inflammatory biomaterials have been developed, and most of them display this activity by

releasing an anti-inflammatory active substance incorporated in their structure.^{2–6} To date, only few biomaterials showing intrinsic anti-inflammatory properties have been described, among which one can enumerate silver,^{7–9} cerium oxide nanoparticles,^{10,11} and some hydrogels made of *N*-acryloyl glycineamide¹² or hyaluronic acid.¹³

When considering further pharmacological development, fully natural polymers or synthetic ones possessing hydrolysable bonds and/or recyclable units are generally preferred for new biomaterials.

Chitosan is a natural cationic aminopolysaccharide obtained from *N*-deacetylation of chitin, which is a structural constituent of crustacean shells. It is biocompatible, biodegradable, and nontoxic and exhibits antimicrobial activity against bacteria and fungi.¹⁴ Alginate is a natural anionic and hydrophilic polysaccharide isolated from marine brown algae species or produced by bacteria.¹⁵ It is biocompatible, less toxic, and relatively less expensive.

Received: June 11, 2018

Accepted: August 14, 2018

Published: August 14, 2018

Due to their respective remarkable biological properties, numerous works related to the association of these two polyelectrolytes have already been conducted and have led to a large variety of biomaterials. Association of these two components finds applications as membranes for soft tissue engineering,^{16,17} as hydrogels for tissue regeneration,¹⁸ as nanoparticles^{19–21} or microcapsules and nanocapsules^{22,23} for drug carrying or dyeing, as polymer networks for cartilage regeneration,²⁴ or as fibers for other applications.²⁵ These biomaterials show different features depending on polymer concentrations and/or formulation conditions, such as pH, ionic strength, and temperature.

Recently, Schlenoff and co-workers have first described the so-called compact polyelectrolyte complexes (CoPECs) obtained by mixing two oppositely charged synthetic polyelectrolytes, such as poly(diallyldimethylammonium) (PDADMA) and poly(styrene sulfonate) (PSS), in the presence of salt and then compacting the resulting complexes by ultracentrifugation or extrusion. These innovative materials were described as saloplastic, as they show a plastic behavior thanks to the presence of salt that plays the role of plasticizer.^{26,27} Then, as part of our research in the field of drug delivery, Reisch et al. worked on complexes of poly(acrylic acid) (PAA) and poly(allylamine hydrochloride) (PAH) and showed that these materials possess remarkable self-healing and stretching properties.^{28,29} Moreover, Tirado et al. also demonstrated that these materials have the interesting properties to immobilize, protect, and enhance the activity of enzymes incorporated inside their structure.³⁰

In a recent work, Phoeung et al. found that by finely tuning the experimental conditions, one can process chitosan/alginate-based CoPECs, which are antiadhesive against cells and non-proinflammatory materials.³¹ As these new chitosan/alginate-based CoPECs do not have the ability to carry drugs and especially hydrophobic drugs due to their hydrophilic properties, the first aim of the present work was to modify natural chitosan and alginate to develop functionalized chitosan/alginate CoPECs to further give them the ability to carry and release drugs. For that purpose, we envisaged to functionalize these two polysaccharides with a cyclodextrin (CD) ring able to create host–guest interactions with hydrophobic drugs.

Cyclodextrins (CDs) are cyclic oligosaccharides obtained by enzymatic degradation of starch, composed of α -(1,4)-D-glucopyranose units. The three common natural α -, β -, and γ -cyclodextrins are constituted of six, seven, and eight glucose residues, respectively. Usually presented as a three-dimensional-truncated cone, CDs are hydrophilic on their outer surface due to the numerous hydroxyl groups, but their inner cavity is essentially hydrophobic. CDs have therefore the ability to host lipophilic molecules while being soluble in water. Among the three common cyclodextrins and given the ideal size of its cavity (internal diameter of 6.0–6.5 Å), β -CD (Figure 1) is particularly well adapted to form host–guest inclusion complexes with a wide variety of molecules containing a hydrophobic moiety.^{32–34}

In this original work, β -cyclodextrin-functionalized chitosan/alginate CoPEC was designed to be further used as a potential new carrier for drug delivery. The newly functionalized CoPEC was thoroughly characterized, and its intrinsic anti-inflammatory properties were fully assessed through in vitro biological assays.

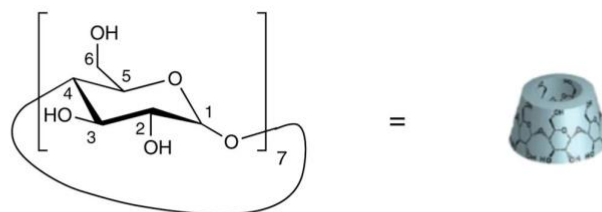


Figure 1. Structure of β -cyclodextrin.

2. RESULTS AND DISCUSSION

2.1. Synthesis and Characterization of β -Cyclodextrin-Functionalized Chitosan. Different methods to obtain functionalized β -cyclodextrins (amino-, formyl-, carboxy-, halogeno-CDs) have already been reported in the literature.³⁵ In this work, we were interested in the functionalization of β -cyclodextrin on its primary hydroxyl group by a leaving group that could be further displaced by nucleophiles to synthesize useful derivatives. For that purpose, 6-OTs- β CD **1** was synthesized from commercially available β CD (Scheme 1).

The monotosylation of β -cyclodextrin on its primary hydroxyl group has been extensively studied exploiting either aqueous or organic solvents polarity. Pyridine is a solvent-reputed optimal for a selective monotosylation on the 6-OH position of β CD. It generally results in good conversion yields, but its removal is never complete, leading to suboptimal subsequent coupling reactions with polysaccharides. In the present work, the monotosylation reaction was performed according to Tripodo's method³⁶ in an aqueous NaOH solution and the purification of the crude product was further performed with a cation-exchange resin. The overall yield of this reaction (23%) and the purity of the product (99.9%) were in accordance with the literature (35 and >98%, respectively). The ¹H NMR spectrum was also in accordance with the expected product **1**, with characteristic signals of β -cyclodextrin and one tosyl group. The resulting 6-OTs- β CD **1** was further used in reactions with chitosan (Scheme 2).

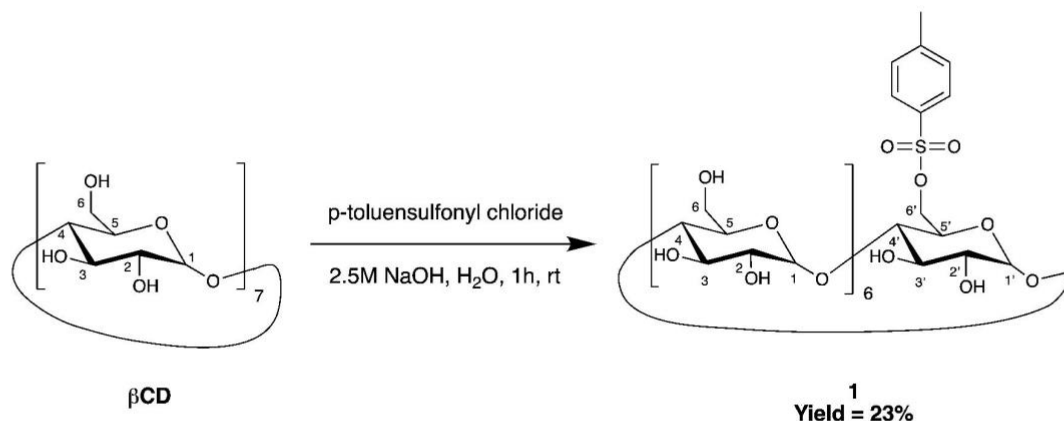
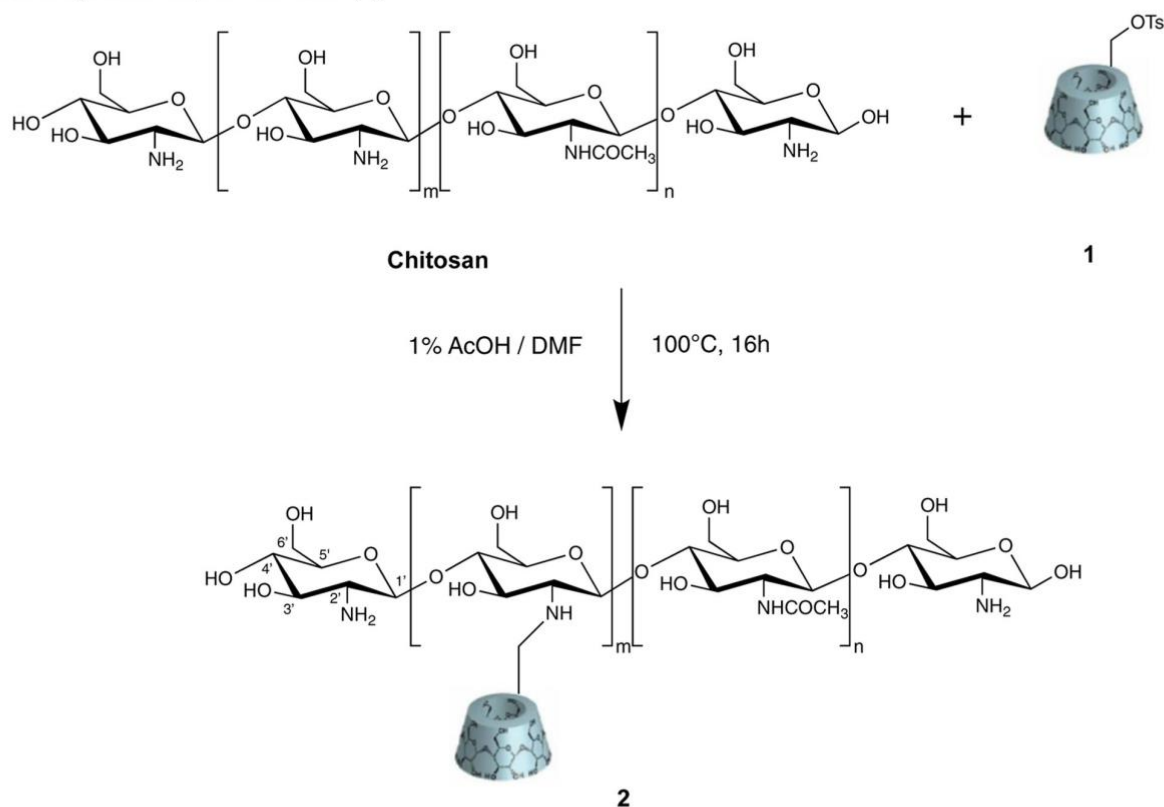
Gonil et al. described a nucleophilic substitution between $-NH_2$ groups of chitosan and 6-OTs- β CD under acidic conditions (acetic acid, 1% v/v in water), the tosyl being a good leaving group (Scheme 2).³⁷

¹H NMR spectroscopy was used to assess the substitution degree (DS) of the functionalized chitosan. The integration value of the H1 anomeric proton of cyclodextrin signal at δ = 4.98 ppm was compared to that of chitosan H2' protons at δ = 2.89 ppm by the following equation

$$DS (\%) = \frac{H1CD/7}{H2' \text{ chitosan}}$$

We found a DS of 25%.

2.2. Preparation of CoPECs. Recently, two processing methodologies combining polysaccharides and/or synthetic polyelectrolytes showed the possibility to obtain compact polyelectrolyte complexes by either ultracentrifugation/extrusion²⁷ or evaporation¹⁷ in the presence of salt. Here, we prepared CoPECs by the ultracentrifugation method. Alginate is known to form good complexes between its carboxylic groups ($-COOH$) and primary amino groups of the natural polysaccharide chitosan ($-NH_2$) through the COO^-/NH_3^+ ion pair. We chose this binary system as an original natural-based CoPECs formulation. In a recent work,³¹ we identified suitable assembly conditions, leading to handy and macro-

Scheme 1. Synthesis of 6-OTs- β CD (1)Scheme 2. Synthesis of β CD-Chitosan (2)

scopically homogeneous biomaterials. Besides the types of polyelectrolytes and their relative quantity, the influence of pH and salt concentration on the macroscopic properties of CoPEC was studied and optimal formulation conditions were determined.

In the present work, we functionalized chitosan and alginate with β -cyclodextrin and we first formulated three new CoPECs, i.e., β CD chitosan/alginate (β CD-Chi/Alg), chitosan/ β CD alginate, and β CD chitosan/ β CD alginate CoPECs. Early in vitro studies showed a proinflammatory activity of the chitosan/ β CD alginate and β CD chitosan/ β CD alginate CoPECs (Supporting Information Figures S1–S3) so that we only focus here on the β CD chitosan/alginate CoPEC.

The functionalization of chitosan with cyclodextrins (DS = 25%) led to a decrease of the number of amino groups available for the complexation with alginate. Thus, for the formulation of β CD chitosan/alginate CoPEC, we increased by around 25% the number of chitosan sugar units to reach the same number of ionic groups as in the case of the CoPEC made from unmodified chitosan.

The ionic strength of the medium influences the plasticity of the material during the complexation and the ultracentrifugation processes. Indeed, low salt concentrations lead to soft biomaterials uneasy to handle, while high salt concentrations lead to more compact materials. On the basis of our previous results, a 1 M NaBr concentration was chosen for the

formulation of all of the β CD functionalized chitosan/alginate CoPECs.³¹

Finally, the ultracentrifugation was performed at 308 000g and 23 °C for 12 h.³¹ All of these conditions led to a homogenous and easy-to-handle material (Figure 2a).

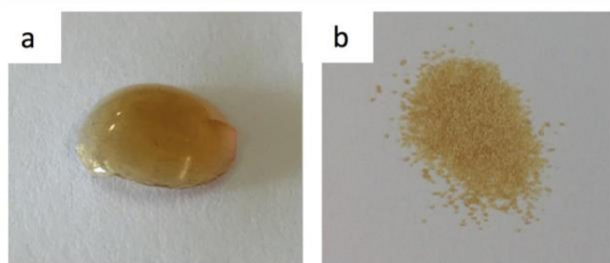


Figure 2. (a) Physical aspect of β CD-Chi/Alg CoPEC sample obtained after ultracentrifugation: [NaBr] = 1 M; [polysaccharides] = 1.25 mg/mL; and ultracentrifugation speed = 308 000g. (b) β CD-Chi/Alg CoPEC microparticles ($\leq 300 \mu\text{m}$) obtained after crushing and sieving steps on freeze-dried CoPEC.

These materials could easily be freeze-dried and reshaped as microparticles by crushing/sieving steps, affording homogeneous CoPECs powders suitable for in vitro assays (Figure 2b). Here, the use of microparticles of diameter smaller than $300 \mu\text{m}$ allows us to obtain a dose–response relationship during in vitro assays.

2.3. Surface and Inner Microstructures Observations.

Next, we compared the structures of Chi/Alg and β CD-Chi/Alg CoPECs before crushing (that is to say, immediately after ultracentrifugation and freeze drying). We used scanning electron microscopy (SEM) for that purpose. As shown in Figure 3, the different microstructures were not porous, but very homogeneous. Moreover, the general aspects of Chi/Alg

(Figure 3a,b) and β CD-Chi/Alg (Figure 3c,d) CoPECs were similar.

Therefore, it seems that the chemical modification of the CoPEC by β -cyclodextrin has no great impact on the microstructure of the final material.

2.4. Determination of the Composition of the β CD-Chi/Alg CoPEC. During the polyelectrolyte complex formulation, all of the introduced molecules are not necessarily complexed and some free molecules may remain in the supernatant. Thus, to evaluate the ratio between the two constituents of the material (β CD chitosan and alginate), alginate was labeled on its carboxylate groups with rhodamine B isothiocyanate and titrated by UV–vis spectrophotometry. The substitution degree of the labeled polymer was 0.7%, which was enough to detect the alginate and sufficiently low to keep the molar mass of the polymer and its overall charge unchanged.

According to the UV–vis spectrophotometry measurements obtained with the supernatant before ultracentrifugation, only 0.2 mg out of 10.3 mg of alginate were found there, which means that more than 98% of alginate was complexed into the final material. That data allowed us to deduce the amount of β CD chitosan in the final CoPEC. On a dry β CD-Chi/Alg CoPEC sample of 18.4 mg, 8.3 mg of β CD chitosan and 10.1 mg of alginate were found corresponding to 0.051 mmol ($\text{COO}^- + \text{COOH}$) from alginate units and 0.012 mmol ($\text{NH}_3^+ + \text{NH}_2$) from β CD chitosan units. The molar ratio ($\text{COO}^- + \text{COOH}$)/($\text{NH}_3^+ + \text{NH}_2$) is thus of 1:0.24. This ratio, with an excess of alginate, is probably due to the steric hindering coming from the cyclodextrins grafted onto chitosan, leading to a need for more alginate moieties to reach the different cationic groups of β CD chitosan.

2.5. Inclusion of Piroxicam in Chitosan/Alginate and β CD Chitosan/Alginate CoPECs. To evaluate the ability of our functionalized CoPEC to trap and deliver hydrophobic drugs, a model drug, piroxicam, was included into chitosan/

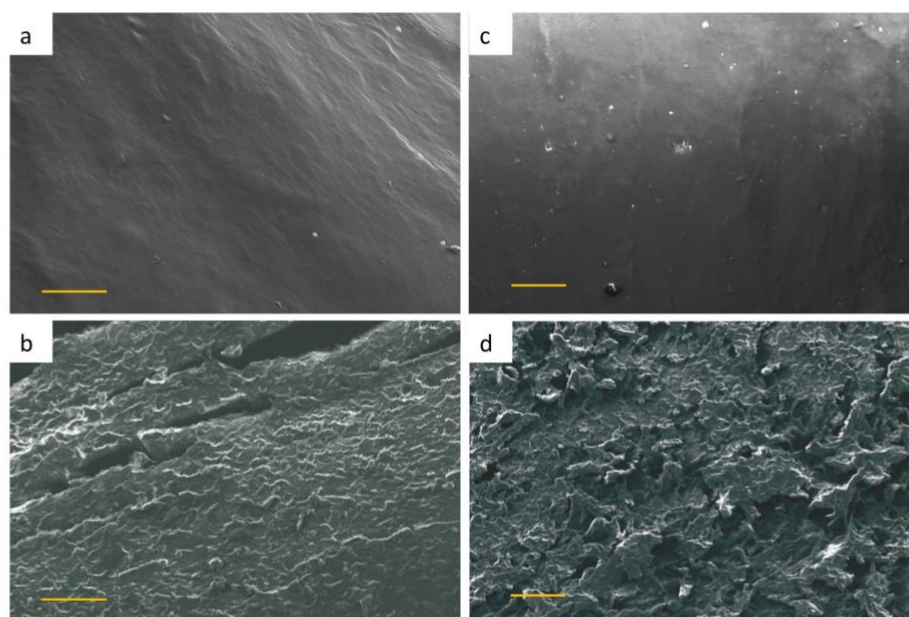


Figure 3. SEM images of the homogeneous and nonporous surface and interior of Chi/Alg (a, b) and β CD-Chi/Alg (c, d) CoPECs (yellow bar = $100 \mu\text{m}$).

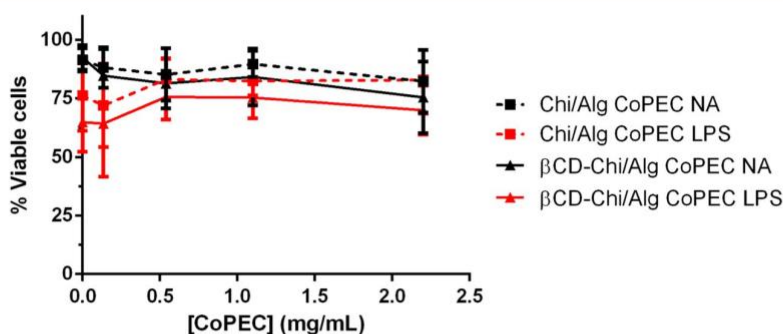


Figure 4. CoPECs functionalized or not by β -cyclodextrins are noncytotoxic. Raw cells were preincubated 24 h with CoPECs before 24 h activation with 50 ng/mL LPS. Viability was assessed by cytometry with an FVD labeling ($n = 3$). NA = nonactivated cells and LPS = LPS-activated cells.

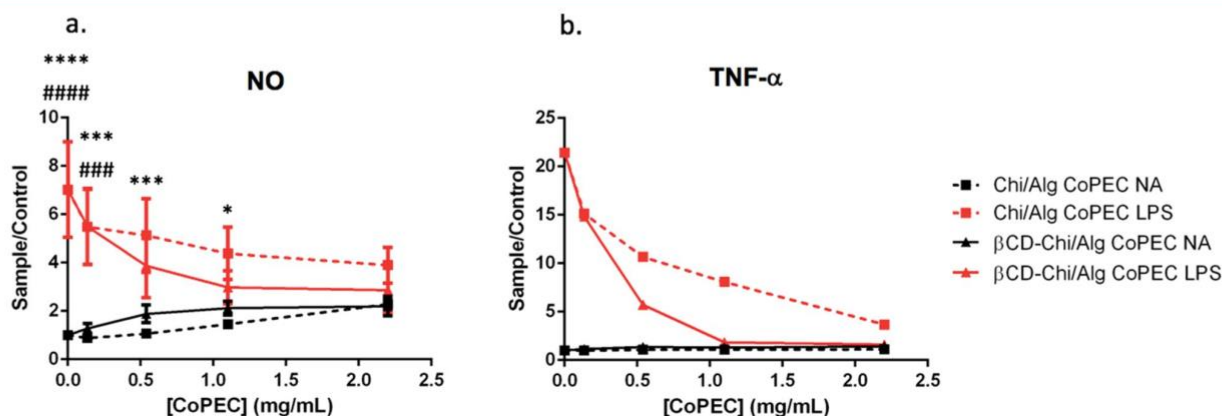


Figure 5. CoPECs functionalized or not by β -cyclodextrins decrease NO and TNF- α production by activated cells in a dose-dependent manner. Raw cells were activated by 50 ng/mL LPS 24 h after incubation with CoPECs. Cell supernatants were collected 24 h after activation. Data are presented as a ratio between the different samples and the referent untreated RAW cell supernatant (no CoPEC, no LPS). NO production (a) was assessed by the Griess test ($n = 3$), and TNF- α production (b) was estimated by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test ($n = 1$ representative of three experiments). NA = nonactivated cells and LPS = LPS-activated cells. ****, ***, and * = p -value <0.0001, <0.001, and <0.05, respectively, difference between Chi/Alg CoPEC NA and Chi/Alg CoPEC LPS. ##### and ### = p -value <0.0001 and <0.001, respectively, difference between β CD-Chi/Alg CoPEC NA and β CD-Chi/Alg CoPEC LPS.

alginate and β CD chitosan/alginate CoPECs. The inclusion was performed in methanol, this solvent being optimal as its modest polarity permits the solubilization of piroxicam and forces the hydrophobic moieties to reach the cyclodextrin cavities. The included piroxicam was then extracted from the CoPECs using dichloromethane, a strongly hydrophobic solvent. The extracted piroxicam was quantified by UV-vis spectrophotometry and, from the same amount of chitosan/alginate and β CD chitosan/alginate CoPECs (10 mg), we quantified 1.24 and 2.99 μ mol piroxicam, respectively. Thus, the presence of β CD in the CoPEC allowed more than a doubling of the quantity of piroxicam included.

After performing characterizations of this new functional material and verifying its ability to trap and release a hydrophobic model drug, we conducted in vitro biological assays to evaluate its potential anti-inflammatory activity.

2.6. Evaluation of the Anti-Inflammatory Activity of CoPECs. The in vitro evaluation of the anti-inflammatory properties of a material is usually conducted using macrophages that can be activated by chemical compounds to mimic inflammation. The anti-inflammatory activity is then estimated by assessing the amount of various inflammation mediators produced by the cells, such as nitric oxide (NO) or proinflammatory cytokines. Moreover, inflammation induces differentiation of macrophages, which results in the decrease of

proliferation as well as differentiation/activation marker expression.

In our study, RAW 264.7 mouse macrophages were activated by LPS, a well-known endotoxin described as an inflammation inducer. The viability of those macrophages in the presence of CoPECs was assessed, as well as the production of NO and TNF- α proinflammatory cytokines in cell supernatants. The expression of Ki-67 and CD40 was followed as proliferation and activation markers, respectively.

Flow cytometry analyses using a fixable viability dye (FVD) demonstrated that chitosan/alginate and β CD chitosan/alginate CoPECs were not cytotoxic, both on LPS-activated and nonactivated cells (Figure 4). Indeed, the percentage of viable cells is similar when cells are not treated ([CoPEC] = 0 mg/mL) and when they are treated with CoPECs.

To analyze the effect of CoPECs devoid of active substance on NO release and proinflammatory cytokine production, macrophages were incubated with CoPECs for 24 h and then activated by LPS for 24 h. As expected, LPS induced the production of NO (Figure 5a) and TNF- α (Figure 5b). The CoPECs containing or not β CD caused a decrease of NO and TNF- α detected in cell supernatants. Interestingly, although these decreased NO and TNF- α levels were observed for both CoPECs (i.e., with or without cyclodextrin), it was much more notable in the case of the cyclodextrin-containing one (solid

red line). Moreover, one can note that in the case of $\text{TNF-}\alpha$, this cytokine is almost absent in the supernatants after treatment by the βCD chitosan/alginate CoPEC.

NO and $\text{TNF-}\alpha$ determinations were also conducted with the piroxicam-containing βCD chitosan/alginate CoPEC (Supporting Information Figures S4 and S5). In these experiments, the different functionalized CoPEC concentrations corresponded to piroxicam concentrations ranging from around 25–200 $\mu\text{g/mL}$. From these experiments, it can be noted that the piroxicam-containing CoPEC induces a decrease of NO and $\text{TNF-}\alpha$ production by activated macrophages. However, the effect of CoPEC was not significantly better than that of the CoPEC devoid of piroxicam. This could be explained by the low quantity of piroxicam available in this case. Indeed, to obtain a significant anti-inflammatory effect due to piroxicam alone, it is necessary to have at least 300 nmol piroxicam/mL, as described by Chiong et al.³⁸ In our work, even if the cyclodextrins are saturated by piroxicam, the concentration in piroxicam is pretty low in the samples (62 nmol/mL for the first one) and the effect of CoPEC alone is so important that the effect of piroxicam is completely masked by the material (Supporting Information, Figures S4 and S5). Hereinafter and for that reason, we focused on the CoPEC without piroxicam for further studies.

To ensure that the lowered NO and $\text{TNF-}\alpha$ levels detected in cell supernatants were not due to any trapping of LPS and $\text{TNF-}\alpha$ in the materials and, in particular, into the cyclodextrins, two complementary experiments were conducted. In the first experiment, LPS was incubated with βCD chitosan/alginate CoPEC for 24 h and then supernatants were incubated with macrophages. Here, we can observe that after being in contact with CoPEC, LPS induces a NO production from macrophages comparable to that induced by fresh LPS (+ control) (Figure 6).

In the second experiment, $\text{TNF-}\alpha$ was incubated with βCD chitosan/alginate CoPEC for 24 h and then quantified by ELISA. In this experiment, similar levels of $\text{TNF-}\alpha$ were

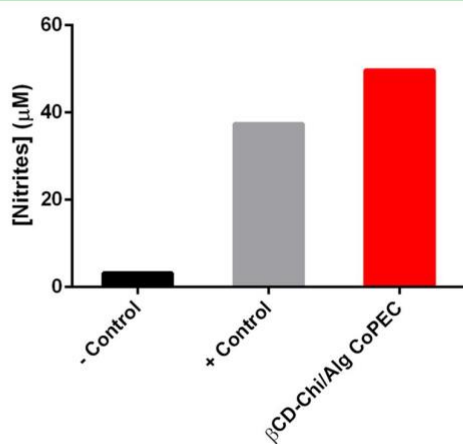


Figure 6. $\beta\text{CD-Chi/Alg CoPEC}$ does not trap LPS. LPS was incubated with CoPEC for 24 h. Filtered CoPEC supernatant was then placed onto macrophages. After 24 h, the supernatant was collected. NO production was assessed by the Griess test ($n = 1$). – Control corresponds to the NO production of nonactivated macrophages, and + control corresponds to the NO production induced by the addition of fresh LPS onto macrophages.

detected in both the cases when this cytokine was incubated with CoPEC or not (control) (Figure 7).

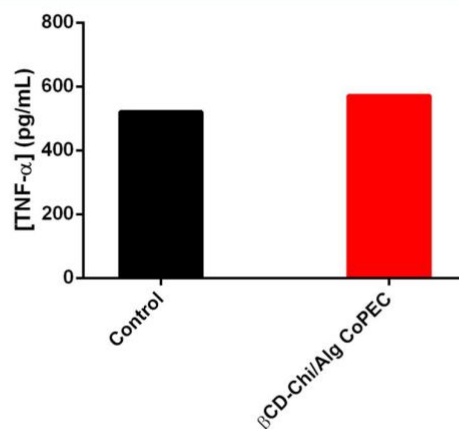


Figure 7. $\beta\text{CD-Chi/Alg CoPEC}$ does not trap $\text{TNF-}\alpha$. The CoPEC supernatant was collected 24 h after addition of $\text{TNF-}\alpha$. $\text{TNF-}\alpha$ content in supernatant was quantified by ELISA test ($n = 1$). The control corresponds to $\text{TNF-}\alpha$ in culture medium without any contact with CoPEC.

From these two experiments, it can be concluded that the above-mentioned inhibitions are not due to any trapping of LPS or $\text{TNF-}\alpha$ into the CoPECs. Thus, we can affirm that our CoPECs inhibit NO and $\text{TNF-}\alpha$ productions by activated macrophages, which is an evidence of the intrinsic anti-inflammatory action of our materials.

To confirm the intrinsic anti-inflammatory activity of $\beta\text{CD-Chi/Alg CoPECs}$, the differentiation state of activated macrophages was evaluated by following proliferation using Ki-67 marker and following activation using CD40 marker. As expected, Figure 8 shows that macrophages stop proliferating (Figure 8a) and express the activation CD40 marker (Figure 8b) when activated by LPS. However, in the presence of CoPECs functionalized or not, proliferation is restored and CD40 expression is decreased, showing an inhibition of macrophage differentiation, thereby confirming the inhibition of the inflammation.

All together, these results show that our CoPECs have high intrinsic anti-inflammatory properties.

To better understand the biological activity of the materials, some in vitro evaluations have been conducted on the polyelectrolytes used for CoPEC formulation. In particular, the influence of alginate, chitosan, and βCD chitosan on the NO production by LPS-activated macrophages has been studied (Supporting Information Figure S6). From these experiments, it can be concluded that the anti-inflammatory activity of CoPECs most probably comes from chitosan and βCD chitosan as these two polyelectrolytes induce a lowering of NO production by activated cells. Our results seem to corroborate those obtained by Yoon et al.³⁹ and Zhu et al.⁴⁰ on chitosan oligosaccharides.

Thus, in this work, we have developed a saloplastic biomaterial made of β -cyclodextrin-functionalized chitosan and alginate that preserves the anti-inflammatory activity of chitosan and that is able to contain and release hydrophobic drugs forming an inclusion complex with β -cyclodextrin. Compared to the unmodified chitosan/alginate CoPEC, we have detected a slightly increased anti-inflammatory activity of

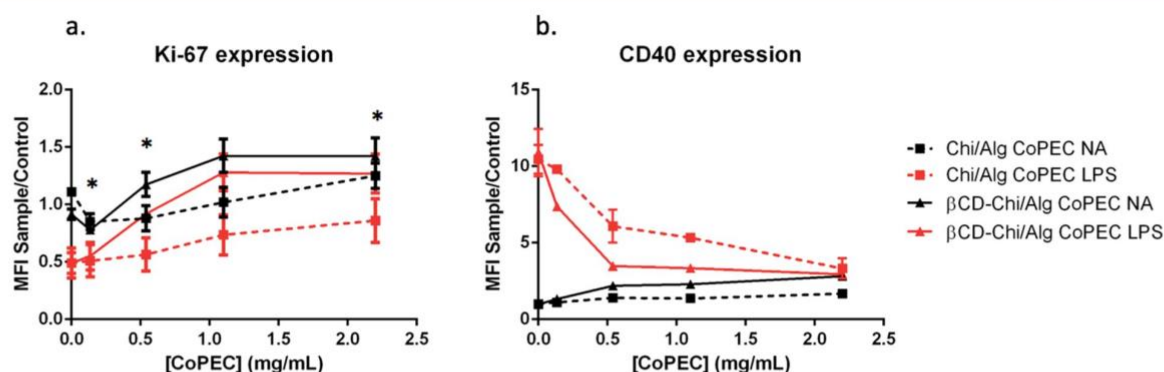


Figure 8. CoPECs functionalized or not restore cell proliferation and decrease LPS-induced cell activation. Raw cells were activated by LPS 24 h after incubation with CoPECs; 24 h after activation, the cells were collected and cell proliferation and activation were estimated by cytometry with (a) Ki-67 ($n = 2$) and (b) CD40 labeling ($n = 2$), respectively. Data are represented as a median fluorescence intensity ratio between sample and untreated RAW cells (no CoPEC, no LPS). NA = nonactivated cells and LPS = LPS-activated cells. * = p -value < 0.05, difference between Chi/Alg CoPEC NA and Chi/Alg CoPEC LPS.

the β -cyclodextrin-functionalized material. Two hypothesis can be formulated to justify this effect: (i) the modification of the tridimensional arrangement of the polyelectrolyte chains and (ii) the modification of physicochemical properties (decrease of total positive charges number and enhanced solubility for example) of chitosan due to the presence of β -cyclodextrin. Therefore, we could consider that this new functionalized CoPEC has a very high potential as bioactive material that could find applications in implantable devices.

3. CONCLUSIONS

In the present work, the recently described chitosan/alginate CoPEC was functionalized with β -cyclodextrin. This modification led to a β -cyclodextrin chitosan/alginate CoPEC, a new material that was characterized for its composition and microstructure. The ability of this new material to carry piroxicam drug was demonstrated. Through in vitro experiments with an inflammation model (activated macrophages), this new functionalized CoPEC was demonstrated to be noncytotoxic, to inhibit NO and proinflammatory cytokine TNF- α production as well as to decrease LPS-induced differentiation. These are highly reliable proofs that this new biomaterial exhibits intrinsic anti-inflammatory activities. Moreover, these intrinsic anti-inflammatory activities of the CoPEC were so important that the presence of the anti-inflammatory piroxicam could not enhance its efficacy.

The next stage will be to include an active pharmaceutical ingredient devoid of anti-inflammatory activity (antibiotics or anticancer drug, for example) into this β -cyclodextrin chitosan/alginate CoPEC to evaluate its ability to carry and release such a molecule. Over time, this kind of biomaterial could constitute a new standard in the field of combination therapy with an intrinsic anti-inflammatory activity and an additional therapeutic effect provided by an extra active molecule included in the CoPEC.

4. EXPERIMENTAL SECTION

4.1. Materials. 4.1.1. Chemical Reagents and Equipment.

Chitosan (average molecular weight, 250 000; viscosity, 30–100 cP; deacetylation degree >90%) was obtained from Glentham Life Sciences (Corsham, U.K.). Alginic acid sodium salt (average molecular weight, 155 000; viscosity, 15–20 cP; 1% in water), rhodamine B isothiocyanate, mixed isomers, and acetic acid were obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, MO). β -Cyclodextrin, p -

toluenesulfonyl chloride, and piroxicam were purchased from Alfa Aesar (Ward Hill, MA). Cation-exchange resin beads Amberlist IR 120, H were obtained from Acros Organics. Purified 18 M Ω ultrapure water (Elga, Veolia) was used in the experiments. All other reagents and anhydrous solvents were commercially available and used without further purification.

^1H NMR spectrum, which showed a shift referenced to the residual signal of nonfully deuterated NMR solvents, was recorded on a Bruker Advance DPX400 NMR spectrometer locked to the major signal of each NMR solvent. Samples were dissolved in either D $_2$ O or DMSO- d_6 (Sigma-Aldrich) at 25 $^\circ\text{C}$. Scanning electron microscopy (SEM) images were obtained on a QuantaTM 250 FEG from FEI Company (Eindhoven, the Netherlands).

4.1.2. Biological Reagents and Equipment. All media and supplements for cell culture were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO). LPS from *Escherichia coli* (K12) was obtained from InvivoGen (San Diego, CA).

Purified antimouse TNF- α antibody clone 1F3F3D4 and biotinylated antimouse TNF- α antibody clone XT3/XT22 for ELISA testing were purchased from eBioscience/ThermoFischer Scientific (Waltham, MA). Horseradish peroxidase avidin (Avidin HRP) was obtained from Jackson (West Grove, PA).

For the flow cytometry analysis, fixable viability dye (FVD) eFluorTM 660 and Ki-67 monoclonal antibody clone SolA15 were obtained from eBioscience and CD40 APC clone 3/23 was obtained from BD Biosciences (San Jose, CA). Cells were analyzed on a FACSCalibur from BD (Franklin Lake, NJ) using CellQuest software (BD) for data acquisition and FlowJo software (FlowJo Inc) for data analysis.

4.2. Synthesis. 4.2.1. Synthesis of Mono-6-deoxy-6-(p -toluenesulfonyl)- β -cyclodextrin 1 (6-OTs- β CD). 6-OTs- β CD was synthesized according to an organic solvent-free published methodology with minor modifications.³⁶ In a round-bottom flask, dry β -cyclodextrin (29.8 g, 26.3 mmol) was solubilized in 270 mL of Milli-Q water and a 2.5 M aqueous solution of NaOH (105 mL) was added. Then, 7.6 g (39.9 mmol, 1.5 equiv) of p -toluenesulfonyl chloride was added in little portions and the suspension was stirred for 1 h at room temperature. The residue was filtered off and washed with water. To the filtrate solution (average pH = 10), cation-exchange resin beads (Amberlist IR 120, H) preactivated with a HCl 6 M aqueous solution were added under stirring at room temperature. On reaching a pH value of 2–3, the reaction product was precipitated. The mixture was first filtered through sieve (300 μm) to separate the resin beads from the expected 6-OTs- β CD. Then, the precipitated white powder was filtrated on a sinter glass. The paste obtained was finally washed with water and freeze-dried to give 1 as a white solid (yield: 23%).

^1H NMR (DMSO- d_6) δ (ppm) 7.76 (d, 2H, Ph), 7.44 (d, 2H, Ph), 5.88–5.63 (m, 14H, OH2 and OH3 β CD), 4.90–4.75 (m, 7H, H1

β CD), 4.57–4.40 (m, 6H, OH6, β CD), 4.39–4.29 (m, 2H, H6' β CD), 4.25–4.13 (m, 1H, HS' β CD), 3.74–3.50 (m, 25H, H3, H5 et H6 β CD), 3.48–3.19 (m, H2 and H4 β CD overlap with water), 2.44 (s, 3H, Ph-CH₃).

4.2.2. Synthesis of Chitosan Grafted with β -Cyclodextrin 2 (β CD-Chi). β -Cyclodextrin-grafted chitosan 2 was synthesized following Yuan's method with minor modifications.⁴¹ Chitosan (2.0 g, 12.4 mmol repeating units) was first dissolved in 1% (v/v) acetic acid (160 mL). A solution of 6-OTs- β CD 1 (7.0 g, 5.4 mmol, 0.4 equiv) in dimethylformamide (80 mL) was then added to the chitosan solution, and the mixture was refluxed at 100 °C for 16 h. After a brief evaporation by distillation to decrease the volume of the solvent, the solution was dialyzed through a membrane with a molecular weight cutoff (MWCO) of 3500 Da for 2 days against 0.1 M NaCl aqueous solution and then against ultrapure water. The solution was finally freeze-dried to afford 2.7 g of 2 as a white solid (degree of substitution, DS = 25%, determined by ¹H NMR).

¹H NMR (D₂O) δ (ppm) 7.60 (d, Ph 6-OTs- β CD), 7.28 (d, Ph 6-OTs- β CD), 4.98 (s, H1 β CD), 3.90–3.42 (m, H2, H3, H4, H5, H6, β CD and H1', H3', H4', H5', H6' chitosan), 2.89 (s, H2' chitosan), 2.32 (s, Ph-CH₃ 6-OTs- β CD).

4.3. General Method for Preparation of Chitosan/Alginate (Chi/Alg) Compact Polyelectrolyte Complexes. Chitosan/alginate CoPECs were obtained as described in our previous work.³¹ Briefly, the alginate solution was obtained by dissolving sodium alginate in ultrapure water (1.25 mg/mL). The pH was then adjusted to 6.5 with an aqueous solution of 0.1 M acetic acid. Solid NaBr was added in little portions to reach 1 M concentration.

The chitosan solution was obtained by suspending chitosan in ultrapure water (1.25 mg/mL) before adding 0.2% (v/v) of acetic acid to reach complete dissolution. Then, the pH was adjusted to 4.5 using a 6 M NaOH aqueous solution. Solid NaBr was also added in little portions to reach a concentration of 1 M.

The CoPECs were obtained by blending alginate and chitosan solutions in equal volumes. Perfect combination was performed by simultaneously pumping both solutions using a peristaltic pump (Ismatec IPC 9329, flow rate = 100 mL/min). The resultant mixture was stirred with a magnetic stir bar at 200 rpm, and the obtained suspension was then transferred into propylene centrifuge tubes and centrifuged at 9400g (Centrifuge Sigma 4K15C) at 20 °C for 15 min. Finally, precompact complexes were transferred into thin-wall polyallomer ultracentrifuge tubes (Beckman Coulter, Inc.) with their supernatant and ultracentrifuged (Beckman Coulter Ultracentrifuge) at 308 000g using a 90Ti rotor type at 23 °C for 12 h to obtain CoPECs.

4.4. Preparation of β CD Chitosan/Alginate (β CD-Chi/Alg) Compact Polyelectrolyte Complexes. β CD-Chi/Alg CoPECs were obtained following the same procedure described in the previous paragraph except that the quantity of chitosan was adjusted, due to the β CD functionalization, to keep an equal amount of $-\text{NH}_3^+$ on chitosan and of COO^- on sodium alginate.

4.5. Visualization of the Microstructures by Scanning Electron Microscopy (SEM). After ultracentrifugation and washing, CoPECs were cut into slices and freeze-dried. The surface and the interior of the materials were then observed by SEM.

4.6. Determination of the Composition of β CD-Chi/Alg CoPEC. **4.6.1. Labeling of Sodium Alginate with Rhodamine.** Sodium alginate was labeled with rhodamine B isothiocyanate following the procedure described by Ziv et al. with little modifications.⁴² An aqueous 2% (w/w) sodium alginate solution (300 mg, 1.5 mmol) was prepared and adjusted to pH 8. Then, rhodamine B isothiocyanate mixed with isomer (20 mg, 0.04 mmol, 0.03 equiv) in 8 mL of dimethyl sulfoxide (DMSO) was slowly added. The mixture was stirred at 40 °C for 1 h before addition of 5.4 g of sodium chloride to stop the reaction. The product was dialyzed through a membrane with an MWCO of 12–14 000 Da against 0.05 M NaCl and finally against ultrapure water until no significant fluorescence was detected in the dialysis medium. The product was then isolated by freeze drying, leading to 264 mg of a purple solid.

The substitution degree of the rhodamine-labeled alginate was determined by absorbance at 560 nm⁴³ in 0.1 M pH 8 phosphate buffer using a standard curve and was found to be of 0.7%.

4.6.2. Preparation of the β CD-Chi/Alg-Rhodamine CoPEC. As the molar mass of the sodium alginate was almost unmodified by the rhodamine labeling, the CoPEC was prepared following the same procedure and using the same polyelectrolytes proportions as for the unlabeled alginate until the ultracentrifugation step.

4.6.3. Estimation of the Amount of Alginate Not Included in the CoPEC. The amount of alginate present in the supernatant before the ultracentrifugation step (to say, the amount of alginate which was not included in the final material) was determined by UV–vis spectrophotometry at 560 nm using a standard curve obtained from alginate-rhodamine solutions in 0.1 M pH 8 phosphate buffer.

4.7. Preparation of CoPECs Microparticles. CoPECs (Chi/Alg and β CD-Chi/Alg) obtained by ultracentrifugation were washed for 24 h twice in Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS, Sigma-Aldrich, St Louis, MO), i.e., a solution of 136.9 mM NaCl, 1.5 mM KH₂PO₄, 8.1 mM Na₂HPO₄, and 2.7 mM KCl, before the CoPECs pieces were freeze-dried. Successively, they were ground using a mortar and sieved (300 μ m sieve from CISA) to obtain ≤ 300 μ m particles.

4.8. Inclusion, Extraction, and Quantification of Piroxicam in Chitosan/Alginate and β CD Chitosan/Alginate CoPECs. CoPEC microparticles (300 mg) were incubated in 90 mL of a 1 mg/mL piroxicam solution in methanol for 72 h at 30 °C and 90 rpm. The microparticles were collected by filtration, washed with a minimum amount of ultrapure water, and dried at 37 °C for 24 h. The particles were then crushed and sieved at 300 μ m before extraction of the included piroxicam was performed by incubating microparticles in 20 mL of dichloromethane for 24 h at 30 °C and 130 rpm. The microparticles were then separated by filtration, washed with dichloromethane, and the filtrates were evaporated under reduced pressure to collect the extracted piroxicam under its solid form. Extracted piroxicam was dissolved in methanol, diluted in 0.1 M aqueous HCl, and then quantified by UV–vis spectrophotometry at 333 nm and by using a standard curve built from piroxicam solutions in 0.1 M aqueous HCl.

4.9. Evaluation of Inflammation in an in Vitro Model. **4.9.1. Cell Culture.** RAW 264.7 mouse macrophages (ATCC TIB-71TM) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium high glucose (containing stabilized glutamine, supplemented with 5% (v/v) of fetal bovine serum (FBS), penicillin (1000 U/mL), and streptomycin (100 μ g/mL)) at 37 °C in 5% CO₂, 95% humidity.

Cells were harvested at around 90% confluence using trypsin (0.5 g/L)–ethylenediaminetetraacetic acid (0.2 g/L) for 5 min at 37 °C and resuspended in culture medium to the desired dilution.

4.9.2. Cell Incubation with CoPECs. The incubation process was conducted over 3 days. On day 1, 50 000 cells/well were seeded with CoPEC microparticles concentrations ranging from 0.0677 to 2.2 mg/mL to a final culture medium volume of 100 μ L in a flat-bottom 96-well plate for 24 h at 37 °C. On day 2, the cells were stimulated with 50 ng/mL of LPS. On day 3, the cells and supernatants were collected for subsequent analysis.

4.9.3. Assessment of NO Production. Concentrations of nitrogen dioxide in cell supernatants (representative of the nitric oxide produced by activated cells) were evaluated by the Griess test ($n = 3$). Briefly, 60 μ L of the Griess reagent (v/v mixture of 58.1 mM *p*-aminobenzene sulfonamide in 30% acetic acid and 3.9 mM *N*-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride in 60% acetic acid) was added to 40 μ L of supernatant and the absorbance at 543 nm was measured and compared to a sodium nitrite standard curve.

4.9.4. Assessment of TNF- α Production. The TNF- α concentration in cell supernatants was evaluated by ELISA ($n = 3$) using commercially available reagents and following the manufacturer instructions.

Briefly, the capture antibody was diluted to 1 μ g/mL in a 0.05 M pH 9.6 carbonate/bicarbonate buffer and coated for one night at 4 °C before blocking with PBS 0.05% Tween 20 1% bovine serum albumin (BSA) (1 h, 37 °C). The samples were then diluted with PBS and

incubated with the capture antibody (2 h, 37 °C) before the detection antibody diluted to 0.5 µg/mL in PBS 0.05% Tween 20 1% BSA was added (1 h, 37 °C). Avidin HRP was then introduced (45 min, 37 °C) and revelation was conducted by adding a solution of 1.25 mM tetramethylbenzidine and 13.05 mM H₂O₂ in 0.1 M pH 5 citrate buffer. Revelation was finally stopped by addition of 1 M HCl, and absorbance was measured at 450 nm.

4.9.5. Evaluation of the Eventual Trapping of LPS in CoPECs. On day 1, 1 mg/mL βCD-Chi/Alg CoPEC in the form of microparticles of diameter smaller than 300 µm with 10 µL of a 500 ng/mL LPS solution in culture medium were incubated in a flat-bottom 96-well plate for 24 h at 37 °C. In another plate, 50 000 cells/well were seeded and were also incubated for 24 h at 37 °C. On day 2, the supernatants of CoPEC in contact with LPS were collected, filtrated (Flowmi cell stainers, 70 µm), and placed on cells. On day 3, the supernatants were collected and the NO content was assessed through the Griess test.

4.9.6. Evaluation of the Eventual Trapping of TNF-α in CoPECs. On day 1, 1 mg/mL βCD-Chi/Alg CoPEC in the form of microparticles of diameter smaller than 300 µm in culture medium was placed in a flat-bottom 96-well plate during 24 h at 37 °C. On day 2, 10 µL of a 20 ng/mL TNF-α solution was added. On day 3, the supernatants were collected and the TNF-α content in supernatants was then assessed by ELISA testing.

4.9.7. Flow Cytometry Analysis. PBS supplemented with 2% FBS was used for washing and diluting the antibodies, FVD, and the cells. The cells (100 000) were stained either with 1/2000 diluted fixable viability dye eFluorTM 660 for 10–15 min at 37 °C (*n* = 3) or 1 µg/mL CD40 APC for 15 min at 4 °C (*n* = 2). For Ki-67 staining, the cells needed to be fixed with PFA 1% and permeabilized with cold pure acetone before addition of 0.25 µg/mL Ki-67 monoclonal antibody for 60 min at room temperature (*n* = 2). The cells were then analyzed on the cytometer.

4.9.8. Statistical Analysis. The statistical significance was calculated using the GraphPad Prism 5.0 software by performing a multiple comparison RM two-way ANOVA with a Sidak correction.

■ ASSOCIATED CONTENT

■ Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acsami.8b09733.

Synthesis of βCD alginate; assessment of IL-6 production from chitosan/βCD alginate CoPEC-treated macrophages; assessment of IL-6 and TNF-α production by βCD chitosan/βCD alginate CoPEC-treated macrophages; assessment of NO and TNF-α production by piroxicam-containing βCD chitosan/alginate CoPEC-treated and activated macrophages; assessment of NO production from chitosan, and βCD chitosan and sodium alginate-treated and activated macrophages (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*E-mail: frisch@unistra.fr. Phone: +33 3 68 85 41 68 (B.F.).

*E-mail: degorgi@unistra.fr. Phone: +33 3 68 85 41 70 (M.D.G.).

ORCID

Alexandre Hardy: 0000-0003-2788-4697

Philippe Laval: 0000-0001-8798-912X

Pierre Schaaf: 0000-0001-7423-5492

Marcella De Giorgi: 0000-0003-1035-8519

Author Contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Funding

A.H. gratefully acknowledges the financial support from Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. C.S., A.B., S.F., L.B.-B., B.F., and M.D.G. acknowledge Université de Strasbourg and Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS). P.L. and P.S. acknowledge the financial support from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM).

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge Eric Mathieu and Joseph Hemmerlé for their support for MEB experiences.

■ ABBREVIATIONS

Avidin HRP, horseradish peroxidase avidin; CD, cyclodextrin; CoPEC, compact polyelectrolyte complexes; DAMP, damage-associated molecular pattern; DS, substitution degree; IL-6, interleukin 6; LPS, lipopolysaccharide; NO, nitric oxide; PAA, poly(acrylic acid); PAH, poly(allylamine hydrochloride); PAMP, pathogen-associated molecular pattern; PDADMA, poly(diallyldimethylammonium); PMMA, poly(methyl methacrylate); PSS, poly(styrene sulfonate); TNF-α, tumor necrosis factor α

■ REFERENCES

- (1) Patel, N. R.; Gohil, P. P. A Review on Biomaterials: Scope, Applications & Human Anatomy Significance. *Int. J. Adv. Res. Technol.* **2012**, 2, 91–101.
- (2) Merrell, J. G.; McLaughlin, S. W.; Tie, L.; Laurencin, C. T.; Chen, A. F.; Nair, L. S. Curcumin-Loaded Poly(Epsilon-Caprolactone) Nanofibres: Diabetic Wound Dressing with Anti-Oxidant and Anti-Inflammatory Properties. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2009**, 36, 1149–1156.
- (3) Méndez, J. A.; Fernandez, M.; Gonzalez-Corchon, A.; Salvado, M.; Colliá, F.; de Pedro, J. A.; Levenfeld, B. L.; Lopez-Bravo, A.; Vazquez, B.; San Roman, J. Injectable Self-Curing Bioactive Acrylic-Glass Composites Charged with Specific Anti-Inflammatory/Analgesic Agent. *Biomaterials* **2004**, 25, 2381–2392.
- (4) Ito, T.; Fraser, I. P.; Yeo, Y.; Highley, C. B.; Bellas, E.; Kohane, D. S. Anti-Inflammatory Function of An In Situ Cross-Linkable Conjugate Hydrogel of Hyaluronic Acid and Dexamethasone. *Biomaterials* **2007**, 28, 1778–1786.
- (5) Webber, M. J.; Matson, J. B.; Tamboli, V. K.; Stupp, S. I. Controlled Release of Dexamethasone from Peptide Nanofiber Gels to Modulate Inflammatory Response. *Biomaterials* **2012**, 33, 6823–6832.
- (6) Lee, C. H.; Lo, L. W.; Mou, C. Y.; Yang, C. S. Synthesis and Characterization of Positive-Charge Functionalized Mesoporous Silica Nanoparticles for Oral Drug Delivery of an Anti-Inflammatory Drug. *Adv. Funct. Mater.* **2008**, 18, 3283–3292.
- (7) Wong, K. K. Y.; Cheung, S. O. F.; Huang, L. M.; Niu, J.; Tao, C.; Ho, C. M.; Che, C. M.; Tam, P. K. H. Further Evidence of the Anti-inflammatory Effects of Silver Nanoparticles. *ChemMedChem* **2009**, 4, 1129–1135.
- (8) David, L.; Moldovan, B.; Vulcu, A.; Olenic, L.; Perde-Schrepler, M.; Fischer-Fodor, E.; Florea, A.; Crisan, M.; Chiorean, I.; Clichici, S.; Filip, G. A. Green Synthesis, Characterization and Anti-Inflammatory Activity of Silver Nanoparticles Using European Black Elderberry Fruits Extract. *Colloids Surf., B* **2014**, 122, 767–777.

- (9) Moldovan, B.; David, L.; Vulcu, A.; Olenic, L.; Perde-Schrepler, M.; Fischer-Fodor, E.; Baldea, L.; Clichici, S.; Filip, G. A. In Vitro and In Vivo Anti-Inflammatory Properties of Green Synthesized Silver Nanoparticles Using *Viburnum Opulus* L. Fruits Extract. *Mater. Sci. Eng., C* **2017**, *79*, 720–727.
- (10) Hirst, S. M.; Karakoti, A. S.; Tyler, R. D.; Sriranganathan, N.; Seal, S.; Reilly, C. M. Anti-Inflammatory Properties of Cerium Oxide Nanoparticles. *Small* **2009**, *5*, 2848–2856.
- (11) Xu, M. X.; Zhu, Y. F.; Chang, H. F.; Liang, Y. Nanoceria Restrains Pm2.5-Induced Metabolic Disorder and Hypothalamus Inflammation by Inhibition of Astrocytes Activation Related Nf-Kappab Pathway in Nrf2 Deficient Mice. *Free Radical Biol. Med.* **2016**, *99*, 259–272.
- (12) Wang, H.; Zhu, H.; Fu, W.; Zhang, Y.; Xu, B.; Gao, F.; Cao, Z.; Liu, W. A High Strength Self-Healable Antibacterial and Anti-Inflammatory Supramolecular Polymer Hydrogel. *Macromol. Rapid Commun.* **2017**, *38*, No. 1600695.
- (13) Isa, I. L. M.; Srivastava, A.; Tiernan, D.; Owens, P.; Rooney, P.; Dockery, P.; Pandit, A. Hyaluronic Acid Based Hydrogels Attenuate Inflammatory Receptors and Neurotrophins in Interleukin-1 β Induced Inflammation Model of Nucleus Pulposus Cells. *Biomacromolecules* **2015**, *16*, 1714–1725.
- (14) Raafat, D.; Sahl, H. G. Chitosan and its Antimicrobial Potential-A Critical Literature Survey. *Microb. Biotechnol.* **2009**, *2*, 186–201.
- (15) Nalamothu, N.; Potluri, A.; Muppalla, M. B. Review on Marine Alginates and Its Applications. *Indo Am. J. Pharm. Res.* **2014**, *4*, 4006–4015.
- (16) Wang, L.; Khor, E.; Wee, A.; Lim, L. Y. Chitosan-Alginate PEC Membrane as A Wound Dressing: Assessment of Incisional Wound Healing. *J. Biomed. Mater. Res.* **2002**, *63*, 610–618.
- (17) Costa, R. R.; Costa, A. M. S.; Caridade, S. G.; Mano, J. F. Compact Saloplastic Membranes of Natural Polysaccharides for Soft Tissue Engineering. *Chem. Mater.* **2015**, *27*, 7490–7502.
- (18) Pfister, L. A.; Papaloizos, M.; Merkle, H. P.; Gander, B. Hydrogel Nerve Conduits Produced from Alginate/Chitosan Complexes. *J. Biomed. Mater. Res., A* **2007**, *80*, 932–937.
- (19) Gazori, T.; Khoshayand, M. R.; Azizi, E.; Yazdizade, P.; Nomanie, A.; Haririan, I. Evaluation of Alginate/Chitosan Nanoparticles As Antisense Delivery Vector: Formulation, Optimization And In Vitro Characterization. *Carbohydr. Polym.* **2009**, *77*, 599–606.
- (20) Nagarwal, R. C.; Kumar, R.; Pandit, J. K. Chitosan Coated Sodium Alginate–Chitosan Nanoparticles Loaded with 5-Fu for Ocular Delivery: In Vitro Characterization And In Vivo Study in Rabbit Eye. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2012**, *47*, 678–685.
- (21) Sarmento, B.; Ribeiro, A.; Veiga, F.; Sampaio, P.; Neufeld, R.; Ferreira, D. Alginate/Chitosan Nanoparticles are Effective for Oral Insulin Delivery. *Pharm. Res.* **2007**, *24*, 2198–2206.
- (22) Acosta, N.; Aranaz, I.; Peniche, C.; Heras, A. Tramadol Release from a Delivery System Based on Alginate-Chitosan Microcapsules. *Macromol. Biosci.* **2003**, *3*, 546–551.
- (23) Natrajan, D.; Srinivasan, S.; Sundar, K.; Ravindran, A. Formulation of Essential Oil-Loaded Chitosan–Alginate Nanoparticles. *J. Food Drug Anal.* **2015**, *23*, 560–568.
- (24) Tigli, R. S.; Gumusderelioglu, M. Evaluation of Alginate-Chitosan Semi INPs As Cartilage Scaffolds. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2009**, *20*, 699–709.
- (25) Shao, X.; Hunter, C. J. Developing an Alginate/Chitosan Hybrid Fiber Scaffold for Annulus Fibrosus Cells. *J. Biomed. Mater. Res., A* **2007**, *82*, 701–710.
- (26) Hariri, H. H.; Schlenoff, J. B. Saloplastic Macroporous Polyelectrolyte Complexes: Cartilage Mimics. *Macromolecules* **2010**, *43*, 8656–8663.
- (27) Porcel, C. H.; Schlenoff, J. B. Compact Polyelectrolyte Complexes: “Saloplastic” Candidates for Biomaterials. *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 2968–2975.
- (28) Reisch, A.; Roger, E.; Phoeung, T.; Antheaume, C.; Orthlieb, C.; Boulmedais, F.; Laval, P.; Schlenoff, J. B.; Frisch, B.; Schaaf, P. On the Benefits of Rubbing Salt in the Cut: Self-Healing of Saloplastic PAA/PAH Compact Polyelectrolyte Complexes. *Adv. Mater.* **2014**, *26*, 2547–2551.
- (29) Reisch, A.; Tirado, P.; Roger, E.; Boulmedais, F.; Collin, D.; Voegel, J.-C.; Frisch, B.; Schaaf, P.; Schlenoff, J. Compact Saloplastic Poly(Acrylic Acid)/Poly(Allylamine) Complexes: Kinetic Control Over Composition, Microstructure, and Mechanical Properties. *Adv. Funct. Mater.* **2013**, *23*, 673–682.
- (30) Tirado, P.; Reisch, A.; Roger, E.; Boulmedais, F.; Jier, L.; Laval, P.; Voegel, J.-C.; Schaaf, P.; Schlenoff, J.; Frisch, B. Catalytic Saloplastics: Alkaline Phosphatase Immobilized and Stabilized in Compacted Polyelectrolyte Complexes. *Adv. Funct. Mater.* **2013**, *23*, 4785–4792.
- (31) Phoeung, T.; Spanedda, M. V.; Roger, E.; Heurtault, B.; Fomel, S.; Reisch, A.; Mutschler, A.; Perrin-Schmitt, F.; Hemmerle, J.; Collin, D.; Rawiso, M.; Boulmedais, F.; Schaaf, P.; Laval, P.; Frisch, B. Alginate/Chitosan Compact Polyelectrolyte Complexes (CoPEC): A Cell and Bacterial Repellent Material. *Chem. Mater.* **2017**, *29*, 10418–10425.
- (32) Crini, G. Review: A History of Cyclodextrins. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 10940–10975.
- (33) Kurkov, S. V.; Loftsson, T. Cyclodextrins. *Int. J. Pharm.* **2013**, *453*, 167–180.
- (34) Arun, R. Cyclodextrins as Drug Carrier Molecule: A Review. *Sci. Pharm.* **2008**, *76*, 567–598.
- (35) Khan, A. R.; Forgo, P.; Stine, K. J.; D’Souza, V. T. Methods for Selective Modifications of Cyclodextrins. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1977–1996.
- (36) Tripodo, G.; Wischke, C.; Neffe, A. T.; Lendlein, A. Efficient Synthesis of Pure Monotosylated Beta-Cyclodextrin And its Dimers. *Carbohydr. Res.* **2013**, *381*, 59–63.
- (37) Gonil, P.; Sajomsang, W.; Ruktanonchai, U. R.; Pimpha, N.; Sramala, I.; Nuchuchua, O.; Saesoo, S.; Chaleawler-umpon, S.; Puttipipatkachorn, S. Novel Quaternized Chitosan Containing beta-Cyclodextrin Moiety: Synthesis, Characterization And Antimicrobial Activity. *Carbohydr. Polym.* **2011**, *83*, 905–913.
- (38) Chiong, H.-S.; Yong, Y. K.; Ahmad, Z.; Sulaiman, M. R.; Zakaria, Z. A.; Yuen, K. H.; Hakim, M. N.; Tang, S. Cytoprotective And Enhanced Anti-Inflammatory Activities of Liposomal Piroxicam Formulation in Lipopolysaccharide-Stimulated Raw 264.7 Macrophages. *Int. J. Nanomed.* **2013**, *8*, 1245–1255.
- (39) Yoon, H. J.; Moon, M. E.; Park, H. S.; Im, S. Y.; Kim, Y. H. Chitosan Oligosaccharide (COS) Inhibits LPS-Induced Inflammatory Effects In Raw 264.7 Macrophage Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *358*, 954–959.
- (40) Zhu, J.; Zhang, Y.; Wu, G.; Xiao, Z.; Zhou, H.; Yu, X. Inhibitory Effects of Oligochitosan on TNF- α , IL-1 β And Nitric Oxide Production In Lipopolysaccharide-Induced Raw264.7 Cells. *Mol. Med. Rep.* **2015**, *11*, 729–733.
- (41) Yuan, Z.; Ye, Y.; Gao, F.; Yuan, H.; Lan, M.; Lou, K.; Wang, W. Chitosan-Graft-Beta-Cyclodextrin Nanoparticles as A Carrier for Controlled Drug Release. *Int. J. Pharm.* **2013**, *446*, 191–198.
- (42) Ziv, K.; Nuhn, H.; Ben-Haim, Y.; Sasportas, L. S.; Kempen, P. J.; Niedringhaus, T. P.; Hrynyk, M.; Sinclair, R.; Barron, A. E.; Gambhir, S. S. A Tunable Silkealginate Hydrogel Scaffold for Stem Cell Culture And Transplantation. *Biomaterials* **2014**, *35*, 3736–3743.
- (43) Mladenovska, K.; Cruaud, O.; Richomme, P.; Belamie, E.; Raicki, R. S.; Venier-Julienne, M. C.; Popovski, E.; Benoit, J. P.; Goracinova, K. 5-ASA Loaded Chitosan–Ca–Alginate Micro-particles: Preparation And Physicochemical Characterization. *Int. J. Pharm.* **2007**, *345*, 59–69.

Biomatériaux fonctionnels à base de complexes de polyélectrolytes de type chitosan/alginate

Conception, caractérisation et premières évaluations biologiques

Résumé

De nos jours, de nombreuses maladies chroniques telles que le cancer ou l'arthrose nécessitent encore de nouvelles modalités de traitement. Des biomatériaux naturels capables de véhiculer des substances actives font partie des solutions à cette problématique. Récemment, des travaux ont été menés sur un nouveau type de biomatériau, les Complexes de Polyélectrolytes Compacts (CoPEC).

Dans le cadre de cette thèse, des CoPEC à base de polyélectrolytes biosourcés, le chitosan et l'alginate, fonctionnalisés avec la β -cyclodextrine (β CD) ont été formulés. Le CoPEC β CD-chitosan/alginate, non-cytotoxique, a présenté des propriétés anti-inflammatoires intrinsèques dans le cadre d'un modèle in vitro d'inflammation. De plus, ce CoPEC a présenté une capacité à contenir et relarguer deux substances actives hydrophobes modèles, le piroxicam et la prednisolone. Enfin, une stratégie d'inclusion de substances actives hydrophiles au sein du matériau a été mise en œuvre.

Le nouveau CoPEC est prometteur car il peut exposer un effet anti-inflammatoire intrinsèque et d'autres effets thérapeutiques via l'inclusion de substances actives au sein des cyclodextrines.

Mots-clés : CoPEC, biomatériaux naturels, polyélectrolytes, cyclodextrines, anti-inflammatoires

Abstract

Nowadays, many chronic diseases, such as cancer or osteoarthritis, still need new modalities of treatment. Natural biomaterials able to convey active substances represent a solution to this problematic. Lately, several research works have been conducted on a new type of biomaterial named Compact Polyelectrolyte Complexes (CoPEC).

As part of this thesis, CoPEC have been prepared from two biosourced polyelectrolytes, chitosan and alginate, functionalized with β -cyclodextrin (β CD). Through an in vitro inflammation model, the non-cytotoxic β CD-chitosan/alginate CoPEC has displayed intrinsic anti-inflammatory properties. Moreover, this CoPEC has demonstrated a capacity to host and release piroxicam and prednisolone, two model hydrophobic active substances. Finally, a strategy to include hydrophilic active substances into the material has been implemented.

Thus, the newly CoPEC is promising because it can exhibit an intrinsic anti-inflammatory effect as well as other therapeutic effects through the inclusion of active substances into the cyclodextrins.

Keywords: CoPEC, natural biomaterials, polyelectrolytes, cyclodextrins, anti-inflammatory drugs