



Elaboration de biomatériaux pour la délivrance contrôlée de principes actifs hydrophobes

Lisa Racine

► To cite this version:

Lisa Racine. Elaboration de biomatériaux pour la délivrance contrôlée de principes actifs hydrophobes. Biochimie [q-bio.BM]. Université Grenoble Alpes, 2016. Français. ⟨NNT : 2016GREAV061⟩. ⟨tel-01687397⟩

HAL Id: tel-01687397

<https://theses.hal.science/tel-01687397v1>

Submitted on 18 Jan 2018

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.



HAL Authorization

THÈSE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE
GRENOBLE ALPES**

Spécialité : **Sciences des polymères**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Lisa RACINE

Thèse dirigée par **Isabelle TEXIER-NOGUES** et

Co-dirigée par **Rachel AUZELY-VELTY**

préparée au sein du **CEA-Leti** et du **CERMAV**

dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Elaboration de biomatériaux pour la délivrance contrôlée de principes actifs hydrophobes

Thèse soutenue publiquement le **22 novembre 2016**,
devant le jury composé de :

Madame Florence PETIT-AGNELY

Professeur, Université Paris-Sud 11, Paris, Rapporteur

Monsieur Costantino CRETON

Directeur de recherche CNRS, ESPCI, Paris, Rapporteur

Monsieur Martial BALLAND

Maître de conférences, Université Grenoble-Alpes, Grenoble, Président

Madame Véronique LARRETA-GARDE

Professeur, Université de Cergy Pontoise, Cergy Pontoise, Examineur

Madame Catherine LADAVIERE

Directeur de recherche CNRS, Université Lyon 1, Lyon, Examineur

Madame Rachel AUZELY-VELTY

Professeur CNRS, CERMAV, Grenoble, Co-directeur de thèse

Madame Isabelle TEXIER-NOGUES

Ingénieur chercheur CEA, Grenoble, Directeur de thèse



Abstract

Due to their high biocompatibility, macroscale hydrogels have been studied as promising materials for the design of drug delivery systems (DDS). Such systems devoted to the local administration and prolonged drug release can improve the efficacy of pharmaceutical compounds while limiting undesired side-effects. Hydrogels present a high water content and soft consistency with mechanical properties that can match those of biological tissues. Nevertheless, these systems are essentially limited to the delivery of hydrophilic drugs. Our approach for extended release of hydrophobic drugs is to design composite materials composed of lipid nanoparticles (LNPs) entrapped within polysaccharide hydrogels. We selected two polysaccharides which are currently used in pharmaceutical and biomedical applications: carboxymethylcellulose (CMC) and chitosan (CS). We also used poly(ethylene glycol) (PEG) as a plasticizer to tune the matrix mechanical properties. Three types of LNP-loaded hybrid materials were studied; i) bulk CMC/PEG hydrogels, ii) CS/PEG films, and iii) CS/PEG sponges. These materials were chemically crosslinked through attractive click reactions. LNPs were successfully entrapped within the three materials without affecting their properties. A deeper study was conducted with the CMC/PEG composite hydrogel. The LNP release profiles were correlated with the network structure and particles properties. The different materials appear promising systems for the time-controlled delivery of therapeutics.

Résumé

Le développement de nouveaux systèmes pour la délivrance locale et contrôlée de principes actifs (PA) peut avoir plusieurs intérêts : augmenter la biodisponibilité du PA, délivrer une forte dose prolongée en limitant les effets secondaires, et améliorer le confort du patient. Pour développer ces nouveaux systèmes de délivrance, des matériaux composites ont été élaborés. Ces matériaux sont constitués d'une matrice hydrogel intégrant des nanoparticules lipidiques (LNPs) capables de solubiliser un principe actif hydrophobe. Cette double encapsulation a pour but de solubiliser puis de délivrer un principe actif hydrophobe qui ne pourrait pas être encapsulé directement dans la matrice hydrophile, et de retarder sa libération en créant des interactions particules/polymères. Nous avons élaboré différents matériaux en sélectionnant 2 polysaccharides largement utilisés pour des applications biomédicales : la carboxyméthylcellulose (CMC) et le chitosane (CS). Ces 2 polymères ont été mélangés à du poly(éthylène glycol) (PEG), un polymère synthétique flexible, pour augmenter les possibilités de moduler la structure et les propriétés mécaniques de la matrice. Ces hydrogels hybrides de CMC/PEG ou CS/PEG réticulés chimiquement par chimies clics, ont été proposés sous forme d'hydrogel en volume, de films ou d'éponges. Après un travail sur le développement et la caractérisation de ces nouvelles matrices hydrogels, les propriétés des matériaux composites polysaccharides/LNPs ont été évaluées et corrélées à la diffusion des particules dans le réseau hydrogel.

Remerciements

Ces 3 années de thèse ont été pour moi l'occasion d'interagir avec de nombreuses personnes du CEA, du CERMAV, ou d'ailleurs. Toutes ces personnes ont apporté leur touche positive à ces travaux, je souhaite sincèrement les remercier.

Je remercie en premier mes deux directrices de thèse Rachel et Isabelle, pour m'avoir fait confiance et pour avoir su me motiver pendant ces 3 années. Merci pour la liberté que vous m'avez accordé dans mon travail et pour avoir toujours considéré mes idées. Cette thèse entre les 2 laboratoires a demandé un peu d'organisation mais vous avez su me faciliter la tâche en privilégiant toujours la science. Votre complémentarité scientifique a été un réel atout pour avancer sur ce sujet et a rendu la rédaction (presque) plaisante ! J'espère que cette collaboration entre le CEA et le CERMAV continuera.

J'adresse également mes remerciements aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont témoigné à l'égard de ces travaux de thèse. Merci particulièrement à Florence Petit-Agnély et Costantino Creton pour avoir rapporté ce travail. Merci aussi à Catherine Ladavière et Véronique Larreta-Garde pour avoir enrichi la discussion par leurs questions pertinentes ainsi qu'à Martial Balland pour avoir présidé le jury et su animer la discussion avec beaucoup de dynamisme.

Un « spécial merci » à Anne-Claude pour m'avoir formée et conduite jusqu'à la thèse. Tes conseils et ta positive attitude m'ont toujours motivée pendant le stage, et ces 3 années de thèse. Je te remercie pour tout ce que tu m'as appris et pour le bel exemple de maman chercheuse que tu m'as donné. Je te souhaite beaucoup de bonheur dans ta nouvelle vie madrilène.

Je souhaiterais également remercier celles qui m'ont donné goût à la science. Merci à madame Kergoat, ma prof de chimie de prépa qui m'a toujours encouragée et conseillée. Vous m'avez bcp aidée et je vous en suis très reconnaissante. Merci également à Géraldine avec qui ça a été un plaisir de travailler à l'EPFL et qui a beaucoup contribué à ma venue au CEA.

Je souhaite ensuite remercier tous ceux qui ont contribué à ce travail. Merci tout d'abord à Eric Bayma pour ton aide précieuse quant à l'utilisation des instruments de la plateforme rhéologie et pour les nombreux essais mécaniques que tu as pu réaliser pour moi qui m'ont fait gagner un temps précieux. Je te remercie aussi car grâce à toi j'ai (peut-être) acquis des connaissances en mécanique de la vis... Merci également à Jimmy pour m'avoir transmis ton savoir-faire en polysaccharides dans la joie et la bonne humeur. Merci Anna pour tous les conseils scientifiques que tu as pu me donner lors des réunions labo. Je remercie également Guillaume Costa pour les images des éponges au microscope. Ta gentillesse et ta disponibilité font qu'il est toujours très agréable de travailler avec toi. Merci à Mathieu, roi de l'HPLC, pour ton aide dans les manips. Ta rigueur, mélangée à de bonnes blagues, apportent un peu de fun à la chimie analytique. Un premier merci aussi à Claire pour les images au « fameux » microscope confocal et à Marie pour les particules formulées. Je remercie aussi les copains du bureau CERMAV, Dom, Marlène, Robin, Tamiris, Takeshi et les brésiliennes pour m'avoir évité de nombreux allers-retours CEA-CERMAV en changeant mes dialyses, stoppant mes UF ou en sortant des produits du lyoph. Merci également pour toutes nos discussions qui ont pu m'aider à avancer sur le sujet. Merci également à Isa pour m'avoir initiée, non sans mal, à la RMN. Merci à Ozgul, toujours

disponible pour faire avancer les manips. Enfin, un grand merci à Aynur et sa bonne humeur avec qui travailler fut un plaisir. Je te souhaite bonne chance pour la suite de ta thèse.

Lors de cette thèse j'ai eu la chance de collaborer avec plusieurs chercheurs, je remercie Véronique Larreta-Garde et Irène Wang dont le travail, associé à une immense gentillesse, a permis d'étoffer le chapitre 2. Un grand merci également à Denis Mariolle pour la détermination dont il a fait preuve dans les mesures compliquées d'AFM liquide des hydrogels. Votre enthousiasme, votre rigueur et votre implication dans vos recherches ont été un exemple pour moi. J'allais avec plaisir passer ces quelques journées à l'AFM. J'espère que nous garderons contact et continuerons à discuter d'agriculture raisonnée et de bons plans restos autour d'un café cette fois !

Un grand merci à Gilles, Pascal et Séverine pour m'avoir accueillie au sein du LCMI. Je les remercie pour l'intérêt qu'ils ont porté à ces travaux de thèse. Je remercie particulièrement Pascal pour ses supers blagues du weekly. Et Séverine pour nos discussions chitosane ou plus personnelles, merci pour la bienveillance que tu portes sur chaque LCMIen. Ton manuscrit, bien qu'un peu dégarni avec l'âge, m'a beaucoup aidé.

Je remercie ensuite ceux qui ont su me faire sortir de mes films et de mes éponges.

Merci aux collègues du bureau au CERMAV (Robin, Marlène, Dom et Tamiris), vous êtes maintenant devenus de supers copains. Merci de m'avoir de suite acceptée et mise dans l'ambiance CERMAV malgré mon étiquette de vacancière CEA. Vous m'avez très bien cernée, vous avez su me remonter le moral quand j'étais « bouguon », m'agasser parfois quand j'étais susceptible. Robin, merci pour toutes tes onomatopées qui animaient le bureau (et me faisaient hérissier les poils pendant la rédaction), pour ton aide précieuse dans les manips, et ton gradient de bonne humeur... Marlène, mini-tempête du labo, tu es la vraie copine fille, nos discussions shopping/actualités/bons plans restos nous ont bien occupées. Ton avis critique m'a toujours permise d'avancer, merci pour tout ça. Dom et Tamiris, merci pour votre cool attitude, ça crée du contraste dans ce bureau ! Bonne chance aux futurs docteurs et au docteur !

Merci à tout le LCMI et particulièrement à l' « open space du bas », Marie, Véro, Emilie, Ozgul, Isa, Mélanie, Pasha, Gaetan, Raph, Melissa pour votre bonne humeur. Merci Marie pour ta disponibilité, ta sincérité, ton efficacité, et ton franc parlé. Avec toi tout paraît plus simple et réalisable, je voudrais te mettre dans ma poche et t'embarquer dans mon prochain travail ?! Merci à Véro pour ta patience et ta générosité, ton coup de boost des derniers jours m'a permis de dormir les 3 jours avant la soutenance... je t'en suis très reconnaissante. (Votre complicité, Véro et Marie, m'a toujours faite rêver, j'espère retrouver une Claire un jour à mon travail). Merci Emilie pour ton réconfort, et ton soutien. Merci Mélanie pour ton smile à toutes épreuves et pour tous tes bons plans sorties. Un grand merci également à Pasha, le boute-en-train de l'open space, ta bonne et mauvaise humeur m'ont manqué pendant la rédaction.

Je souhaiterais également remercier Dorothée, merci pour ta délicatesse et pour nos longues heures passées à discuter au milieu du labo. Tu as toujours été à l'écoute et tu as su m'orienter et me conseiller de la meilleure façon possible.

Merci également à toute la team course à pied CEA et CERMAV. Ça vide toujours la tête une petite sortie aux Vouillants avant d'attaquer une dure aprem.

Merci ensuite à tous les jeun's sympas du CERMAV, Harisoa, Léa, Lauric, Agus, Legouic, Yotam, Emilie, Antoine, Bruno et Pierre (oui je vous mets dans les jeun's), Laurent, Milène, Arnaud, Mélanie1-2, Sophie, Emeline, Felix, Erics, pour les nombreuses sorties bar et les pauses déjeuners animées.

Merci à tous les copains du CEA, Fred, Thomas, John, Emilie1-2, Alan, Raph, Mélissa, Mathieu1-2, Julie, Gaetan1-2, Etzael et tous ceux de la team microflu. J'ai conscience que c'était réellement une chance que de travailler entourée d'une telle équipe de jeun's. Un merci spécial à Thomas, Emilie, Fred, Mathieu, John pour les sorties arrosées.

Merci à toute la team Glob'Alps / BT et particulièrement à Carine, Marie, et Felix. Nos réunions du soir à discuter démarchage et programme se sont toujours faites dans la bonne humeur, souvent avec une bonne bouteille de rouge, et avec en prime une bonne fondue, quelle régalade ! Ce fut un réel plaisir de « travailler » avec vous, si l'un de nous a une idée révolutionnaire, je vous suis pour monter la start-up !

Un grand merci à mes supers copines de thèse, Jess, Marjo et Claire, merci d'avoir toujours été là. Jess merci de nous avoir transmis ta passion pour le DIY (Do It Yourself pour les incultes), grâce à toi nos journées « recherche d'emploi » se sont transformées en journées tricot, découpage... et ski (mais ça, on ne peut pas dire que ce soit de ta faute, j'irai plutôt chercher la coupable du côté des Grelous ☺). Et je vais te rassurer, j'ai bien compris que le sac à dos ne devait pas remplacer le sac à main. Merci à Marjo, super copine Grelou et binôme de course à pieds, fan de montagne et de fromages, pour tous tes bons conseils de jeune docteur et pour ton soutien pour la dernière ligne droite (Merci également à Jess pour les répets en comité réduit). Enfin merci Claire, mon binôme de thèse de ces 3 années (comme tu dis). Quel plaisir d'avoir au boulot une personne en qui l'on a totalement confiance, à qui l'on peut se confier et tout partager ! Tu auras été la cerise sur le gâteau, la crème de la crème de cette thèse. Merci pour tous les bons moments partagés en thèse, pourvu que ça dur... et c'est bien parti, le chômage à deux c'est plutôt sympa !

Je souhaiterais remercier ensuite mes amis les plus proches, mes copains les Touyas, fidèles copains du lycée. Je suis fière d'avoir des copains comme vous, même dans les pires plans galères ! Merci à mes copines de Toulouse, nos virées régulières à droite à gauche sont toujours une bouffée d'oxygène et me permettent de rester un peu branchées, malgré le style très « montagne » de Grenoble !

Merci à Antho, tu as su m'épauler et me distraire pendant ces 3 années. Tu as été là dans les meilleurs comme dans les pires moments. La mise en page sur word n'a plus aucun secret pour toi...Merci d'être là à mes côtés !

Enfin, je remercie ma famille qui m'a toujours soutenue et encouragée dans mes études. Ce fut une réelle fierté d'avoir mes 4 grands-parents présents lors de la soutenance. Merci pour votre enthousiasme. Je vous aime fort, vous m'apportez beaucoup ! Une pensée spéciale à mon papi qui m'a toujours protégée et encouragée dans tout ce que j'entreprenais. Merci papi pour tout, tu sais à quel point je t'en suis reconnaissante. Merci à ma maman pour toute l'énergie et l'amour que tu me donnes depuis presque 28 ans. Tu es la meilleure des mamans. Enfin merci à ma sœur « Chatoune » d'être la sœur si parfaite... même si ces 3 ans à Grenoble ne m'auront pas permis de te mettre la rouste au ski, tant pis !

Liste des abréviations

AFM	<i>Atomic Force Microscopy</i> – microscope à force atomique
CMC	Carboxyméthylcellulose
CMC-p	Carboxyméthylcellulose-penténoate
CS	Chitosane
CS-p	Chitosane-penténoate
DA	Degré d'acétylation
DBCO	Dibenzocyclooctyne
DDS	<i>Drug delivery system</i> - système de délivrance de principes actifs
DEX	Dexaméthasone
Dil	Fluorophore lipophile (cyanine)
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i> – technique d'analyse spectroscopique par diffusion dynamique de la lumière
DMF	Diméthylformamide
DS	Degré de substitution
E	Module d'Young
eq	Etat d'équilibre de gonflement
EtOH	Ethanol
G'	Module de conservation
G''	Module de perte
HA	Acide hyaluronique
HCl	Acide chlorhydrique
HPMC	Hydroxypropyl methyl cellulose
IR	Spectroscopie infrarouge
LNP	<i>Lipid nanoparticles</i> - nanoparticules lipidiques
MEB	Microscopie électronique à balayage
mol%	Pourcentage molaire
PA	Principe actif
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i> – tampon phosphate
PDI	<i>PolyDispersity Index</i> – distribution d'une population de particules en tailles
PEG	Poly(éthylène glycol)
PEG-SH	Poly(éthylène glycol) bis thiol

PVA	Poly(vinyl) alcool
RMN	Résonnance à magnétique nucléaire
SEC	<i>Size exclusion chromatography</i> – chromatographie d'exclusion stérique
SPAAC	<i>Strain-promoted azide-alkyne cycloaddition</i> – cycle contraint azoture-alcyne
UV	Ultra violet
vol%	Pourcentage volumique
wt%	Pourcentage massique

Introduction générale	1
Chapitre 1 Problématique : délivrer localement, de façon contrôlée et prolongée un principe actif hydrophobe	5
1.1 Problématique et contexte	7
1.2 Les hydrogels comme systèmes de délivrance de principes actifs (PA)	9
1.2.1 Définition et structure des hydrogels.....	9
1.2.2 Etat de l'art : les hydrogels comme systèmes de délivrance de principes actifs	10
1.2.3 L'intégration d'un principe actif dans les hydrogels	12
1.2.4 Les mécanismes de libération du principe actif (PA) depuis l'hydrogel.....	13
1.3 NOTRE APPROCHE : les hydrogels composites pour la délivrance contrôlée de principes actifs..	15
1.3.1 Présentation des hydrogels composites.....	15
1.3.2 Les hydrogels composites étudiés dans la littérature	16
1.3.3 Choix des éléments constituant les hydrogels composites.....	16
1.4 Conclusion	64
Références.....	66
Chapitre 2 Les hydrogels de carboxyméthylcellulose/PEG	71
2.1 Contexte	73
2.1.1 Objectifs	73
2.1.2 APPROCHE : les hydrogels composites de carboxyméthylcellulose (CMC)/PEG	73
2.2 Résultats.....	74
2.2.1 Caractérisation de la carboxyméthylcellulose (CMC)	74
2.2.2 Article.....	76
2.2.3 Résultats complémentaires	122
2.3 Conclusion	134
Références.....	135
Chapitre 3 Les films de chitosane/PEG.....	137
3.1 Objectifs et approche.....	139
3.2 Résultats expérimentaux.....	140
3.2.1 Caractérisation du chitosane (CS).....	140
3.2.2 Synthèse et caractérisation du chitosane-penténoate (CS-p)	142

3.2.3	Mise en forme des films.....	144
3.2.4	Caractérisation des films	145
3.3	Conclusion	156
	Références.....	157
Chapitre 4	Les éponges de chitosane/PEG	159
4.1	Contexte	161
4.1.1	Objectifs	161
4.1.2	APPROCHE : les éponges de chitosane/PEG réticulées	161
4.2	Résultats.....	162
4.2.1	Article sur les éponges de chitosane/PEG	162
4.2.2	Résultats complémentaires sur les éponges.....	188
4.3	Conclusion	198
	Références.....	200
Chapitre 5	Matériels et méthodes complémentaires	201
5.1	Caractérisations complémentaires des hydrogels de CMC-p/PEG	203
5.1.1	Caractérisations de la carboxyméthylcellulose (CMC).....	203
5.1.2	Caractérisations des propriétés mécaniques des hydrogels de CMC-p/PEG.....	204
5.1.3	Analyse de la morphologie des hydrogels de CMC-p/PEG.....	209
5.2	Caratérisations complémentaires des éponges de CS/PEG.....	210
5.2.1	Caractérisations du chitosane	210
5.2.2	Formulation et caractérisations des éponges composites de CS/PEG + LNPs	211
5.3	Fabrication et caractérisations des films de CS/PEG.....	213
5.3.1	Matériels	213
5.3.2	Synthèse du chitosane-pentenoate (CS-p)	213
5.3.3	Fabrication des films de CS/PEG	214
5.3.4	Caractérisation des films de CS/PEG	215
	Références.....	217
	Conclusion générale.....	219

Introduction générale

Actuellement, de nombreux principes actifs sont dégradés avant d'atteindre leur cible biologique ou ne sont pas administrés à des doses correspondant au besoin thérapeutique du patient, ce qui limite leur effet.

Les systèmes macroscopiques à délivrance locale et contrôlée de principes actifs apparaissent alors comme une solution attractive pour pallier ces limites, permettant un contrôle spatio-temporel de la libération de la molécule encapsulée. Les hydrogels, constitués de polymères hydrophiles, capables de retenir un large volume d'eau, sont utilisés pour former la matrice macroscopique, pour leur propriétés « réservoirs ». La cinétique de libération de la molécule active peut être modulée en fonction des propriétés des gels. Ces systèmes peuvent être directement implantés au niveau du site d'action de la substance active ou mis sous forme de patchs transdermiques ou de pansements oculaires. L'équipe « Structure et Modification de Polysaccharides » du CERMAV dispose d'une expertise dans la modification de polysaccharides et dans l'élaboration d'hydrogels chimiques innovants, pour des applications biomédicales. Ces hydrogels sont élaborés à partir de polysaccharides (dextrane, chitosane, acide hyaluronique, carboxyméthylcellulose), des polymères d'origine naturelle, aux propriétés intéressantes, largement utilisés pour des applications biomédicales. Bien que ces hydrogels aient des propriétés intéressantes, ces matrices hydrophiles sont principalement adaptées à la solubilisation et à la délivrance de molécules hydrophiles. Or, le développement croissant de nouveaux principes actifs hydrophobes apporte de nouvelles exigences dans l'élaboration de ces systèmes.

Depuis plusieurs années, le CEA-Leti-DTBS développe des nanoparticules lipidiques (LNPs), dont le cœur, mélange d'huile et de cire, est bien adapté pour la solubilisation et la vectorisation de principes actifs hydrophobes.

Dans ce travail de thèse, qui s'inscrit dans le cadre d'une collaboration entre le CEA-Leti et le CERMAV, de nouveaux systèmes composites à libération contrôlée de principes actifs hydrophobes ont été développés. Ces systèmes se composent d'une matrice hydrogel, dans laquelle des nanoparticules (LNPs), y sont intégrées. Cette double encapsulation a pour but de solubiliser puis délivrer un principe actif hydrophobe, et de retarder sa libération en créant des interactions entre les particules et le polymère.

Pour cette étude, nous avons utilisé 2 polysaccharides, la carboxyméthylcellulose et le chitosane, choisis pour leurs propriétés biologiques. L'originalité de ces travaux vient des différentes formes de matrices hydrogels développées (hydrogels, films, éponges) et des chimies utilisées pour les réticuler.

Le premier chapitre présente les caractéristiques des hydrogels et expose leurs potentiels pour servir de matrice à la délivrance locale et contrôlée de principes actifs. La mise en forme d'hydrogels de chitosane (CS) est particulièrement décrite dans ce chapitre et a fait l'objet d'une revue.

Le deuxième chapitre porte sur le développement d'hydrogels chimiques de carboxyméthylcellulose (CMC)/poly(éthylène glycol) (PEG), dans lesquels des LNPs sont incorporées. Une étude approfondie sur l'hydrogel composite a été conduite. L'objectif visé était de corrélérer la structure de la matrice et les propriétés des particules aux profils de libération obtenus expérimentalement et par le biais d'un modèle basé sur la diffusion des nanoparticules dans la matrice d'hydrogel. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication.

Le troisième et le quatrième chapitre portent davantage sur l'élaboration et la caractérisation de nouvelles matrices hydrogels. Le chapitre 3 rapporte l'élaboration d'hydrogels hybrides de CS/PEG sous forme de films réticulés chimiquement (ou non). Les propriétés de ces 2 types de films sont comparées. Des caractérisations préliminaires sont conduites sur les films composites contenant des LNPs. Le chapitre 4 est dédié à la préparation d'hydrogels hybrides de CS/PEG sous forme d'éponges et au développement d'une nouvelle chimie de réticulation : la chimie thiol-yne par addition nucléophile. Cette chimie est utilisée pour préparer des éponges composées de 2 réseaux semi-interpénétrés. L'étude de ces éponges originales fait l'objet d'une publication. La stabilité des LNPs dans ces éponges est introduite.

Enfin, un cinquième et dernier chapitre complète la partie expérimentale qui n'aurait pas été décrite dans les publications.

Chapitre 1

Problématique : délivrer localement, de façon contrôlée et prolongée un principe actif hydrophobe

Chapitre 1 Problématique : délivrer localement, de façon contrôlée et prolongée un principe actif hydrophobe.....	5
1.1 Problématique et contexte.....	7
1.2 Les hydrogels comme systèmes de délivrance de principes actifs (PA).....	9
1.2.1 Définition et structure des hydrogels	9
1.2.2 Etat de l'art : les hydrogels comme systèmes de délivrance de principes actifs.....	10
1.2.3 L'intégration d'un principe actif dans les hydrogels.....	12
1.2.4 Les mécanismes de libération du principe actif (PA) depuis l'hydrogel	13
1.2.4.1 Libération contrôlée par diffusion	13
1.2.4.2 Libération contrôlée par gonflement	14
1.2.4.3 Libération contrôlée par réaction chimique	15
1.3 NOTRE APPROCHE : les hydrogels composites pour la délivrance contrôlée de principes actifs 15	
1.3.1 Présentation des hydrogels composites	15
1.3.2 Les hydrogels composites étudiés dans la littérature.....	16
1.3.3 Choix des éléments constituant les hydrogels composites	16
1.3.3.1 Les nanoparticules lipidiques (LNPs) développées au CEA.....	16
1.3.3.2 Les polysaccharides choisis.....	18
1.3.3.3 Les hydrogels « clics ».....	57
1.4 Conclusion.....	64
Références.....	66

1.1 Problématique et contexte

Les systèmes de délivrance contrôlée de principes actifs, traduit de l'anglais « drug delivery systems » (DDS) dont l'abréviation sera utilisée dans ce manuscrit, permettent de faciliter l'administration de principes actifs (PA) et améliorent leur efficacité. Actuellement, la majorité des PA sont administrés par voie orale via des comprimés ou par voie intraveineuse, une méthode invasive. Ces méthodes d'administration ne satisfont pas certaines exigences pharmaceutiques. En effet, par injection directe du PA, il est difficile de cibler localement son action ou de réguler la dose administrée. Alors que pour certains PA leur efficacité ne dépend pas de ces exigences, pour beaucoup c'est une vraie limite [1]. Le développement des DDS apparaît alors comme une solution attractive pour pallier à ces limites [2]. Selon la voie d'administration ciblée, le DDS peut se présenter sous forme de microsphères, de nanoparticules, de patchs ou d'implants. Pour que ces DDS réussissent à passer l'étape des essais cliniques, ils doivent être efficaces, stables, faciles à administrer et à mettre en forme.

Idéalement, les DDS les plus efficaces seraient les DDS permettant de délivrer, sur une période prolongée, une dose constante de PA. La cinétique de libération visée est dite d'ordre zéro et est présentée Figure 1-1. Néanmoins, un tel profil nécessite un design très complexe du DDS. De plus, des études ont montré qu'une concentration en PA supérieure à la concentration minimum d'efficacité, délivrée durant la période d'utilisation, suffisait à rendre le DDS efficace (Figure 1-1) [1]. La plupart des dispositifs libèrent, dès leur mise en place au niveau du site d'action, une forte dose de PA, ce qui augmente le risque de toxicité. C'est ce que l'on appelle l'effet de « burst release ». Actuellement, les recherches visent à limiter cet effet avec le développement de nouveaux DDS permettant la libération immédiate d'une quantité moindre et contrôlée de PA [3].

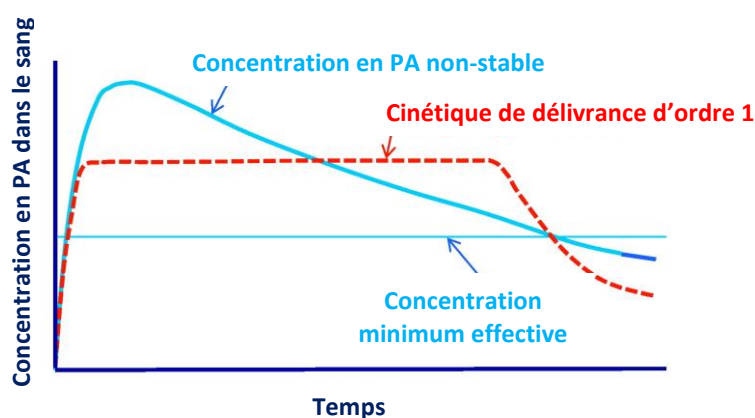


Figure 1-1 : Le principe actif est efficace tant que sa concentration dans le sang est au dessus de la concentration minimum effective selon la pharmacocinétique de PA [1]

Une enquête menée par Anselmo et al. en 2014 à partir du site américain clinicaltrials.gov répertorie les essais cliniques en cours sur les DDS aux Etats-Unis, et met en évidence le fort intérêt pour le développement de DDS permettant de délivrer localement un PA encapsulé (« transdermal » – « implant » – « depot », 58% des essais cliniques sur les DDS) (Figure 1-2) [2].

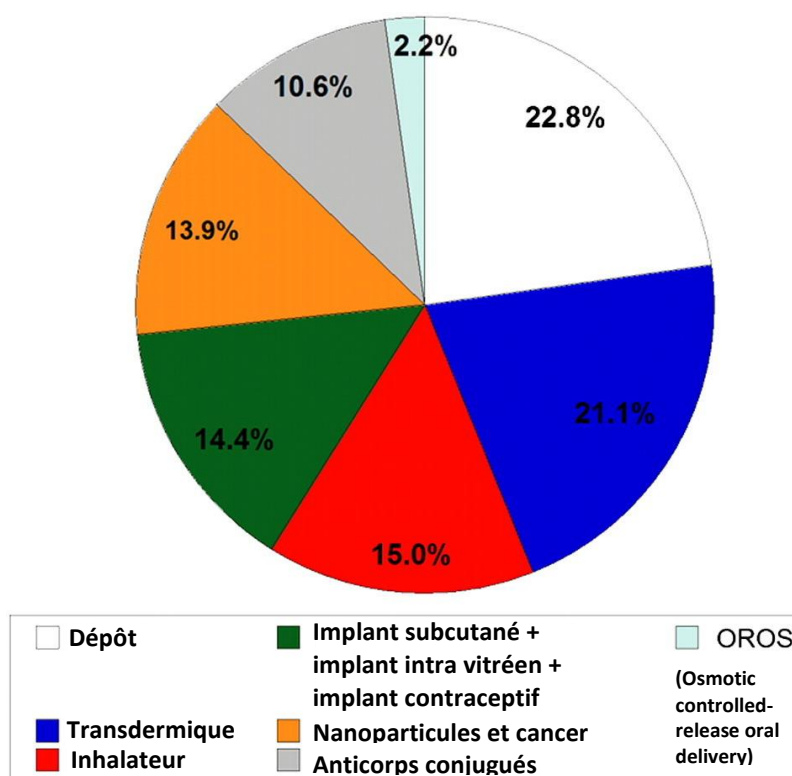


Figure 1-2: Essais cliniques en cours sur les DDS aux Etats-Unis en 2014 [2].

Ces DDS à l'échelle macroscopique suscitent beaucoup d'intérêt dans le domaine pharmaceutique, car ils permettent un contrôle spatio-temporel de la libération du PA encapsulé, au niveau du site d'action [4]. Il est possible de prolonger et contrôler la dose administrée localement pour ainsi limiter les effets indésirables liés à l'effet « burst » ou à la détérioration de tissus périphériques. Un autre avantage lié à la délivrance prolongée du PA, est la possibilité d'utiliser ce DDS durant plusieurs jours, voire mois, afin d'améliorer la qualité de vie du patient en lui évitant des injections régulières, et en limitant les renouvellements du dispositif.

Actuellement, une trentaine de DDS macroscopiques sont commercialisés, comme GLIADEL® un DDS implantable utilisé pour traiter le cancer du cerveau après chirurgie (dégradable en 3 semaines, délivre de la carmustine à partir d'un copolymère commercial, le prolifesoan (polyanhydride)) [5]. NUVARING®, un implant vaginal utilisé comme patch contraceptif (non dégradable, délivre une hormone (l'éthynyl estradiol)) ; il est constitué de 2 compartiments : un cœur en copolymère d'éthylène-vinylacetate

encapsulant l'hormone et une coquille en copolymère d'éthylène-vinylacetate) [6]. DURAGESIC®, un patch utilisé pour délivrer un analgésique (fentanyl) par voie transdermique (dispositif composé de plusieurs couches d'acrylate) [7].

Ces DDS commercialisés sont fabriqués à partir de polymères synthétiques. Les chimies utilisées pour former ces hydrogels ne permettent pas de moduler la libération du PA. Un effet « burst » est observé, limitant l'efficacité de ces systèmes. Le développement croissant de nouveaux principes actifs hydrophobes ajoute une nouvelle exigence à l'élaboration de ces systèmes [8]. Intégrer directement un principe actif hydrophobe dans ces hydrogels conduirait à la précipitation du PA ou à sa libération rapide depuis la matrice.

En ce sens, l'objectif de ces travaux de thèse consiste à développer de nouveaux systèmes de délivrance prolongée de principes actifs hydrophobes. Ces matériaux pourront être implantables ou servir de patch pour délivrer par voie transdermique l'actif encapsulé.

1.2 Les hydrogels comme systèmes de délivrance de principes actifs (PA)

1.2.1 Définition et structure des hydrogels

Les hydrogels sont composés de chaînes de polymères hydrophiles réticulées entre elles. Ils sont capables de retenir un large volume d'eau et gonflent sans dissolution des chaînes de polymères. Afin de pouvoir comprendre pourquoi les hydrogels sont d'excellents candidats pour la délivrance locale et prolongée de principes actifs, il est nécessaire de connaître la structure de ces systèmes. Cette structure est caractérisée par 3 paramètres : la fraction volumique de polymère à l'état gonflé ($v_{2,s}$), la masse molaire M_c entre 2 nœuds de réticulation et la distance entre ces nœuds (ξ), représenté Figure 1-3.

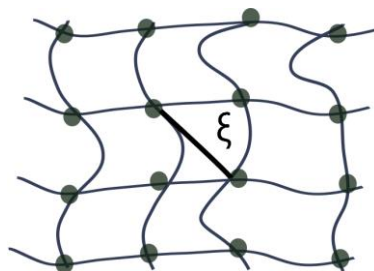


Figure 1-3: Représentation schématique de la structure d'un hydrogel.

$v_{2,s}$, représente la quantité d'eau que le système peut retenir (c'est l'inverse du taux de gonflement du système multiplié par la fraction massique du polymère). M_c apporte une information sur le degré de réticulation du système, et ξ représente la distance entre 2 nœuds de réticulation et est assimilé à la taille de pore [9]. Il est important de préciser que ces paramètres sont des valeurs moyennes représentatives du réseau car la polymérisation se fait aléatoirement. Ces paramètres gouvernent la capacité du système à gonfler, et dépendent de la densité de réticulation du gel, c'est à dire de la quantité éventuelle d'agent réticulant ajouté lors de la préparation du gel.

1.2.2 Etat de l'art : les hydrogels comme systèmes de délivrance de principes actifs

Depuis quelques années, les études visant à développer des hydrogels comme plateforme pour la délivrance de principes actifs se sont développées. En effet, les propriétés physiques des hydrogels les rendent extrêmement adaptés à cette application [10, 11].

La porosité qui caractérise les hydrogels et leur capacité à gonfler, peut être facilement ajustée en contrôlant la densité de réticulation, comme décrit précédemment, et la nature de la réticulation (chimique ou physique). Un gel faiblement réticulé présente un fort taux de gonflement, une large taille de pores et par conséquent une libération accélérée de l'actif encapsulé comparé à un gel plus fortement réticulé. Différents procédés comme la lyophilisation, la cryogélation, ou le séchage au fluide supercritique, permettent également d'introduire et de contrôler la taille des pores. Plus de détails seront donnés sur ces hydrogels à porosité contrôlée dans la revue présentant les mises en forme du chitosane.

En plus de pouvoir contrôler la taille des pores et leur capacité à gonfler, les hydrogels préparés à partir de polymères sensibles à l'environnement extérieur sont capables de modifier leur comportement en réponse à ce stimulus (pH, température, force ionique, lumière...). De cette façon, le système est capable de retenir ou au contraire de libérer l'actif encapsulé selon le stimulus appliqué [12-14]. Ces hydrogels sont appelés « hydrogels intelligents ». Quelques polymères et groupement fonctionnels réagissant à un stimulus extérieur sont présentés en Figure 1-4 [15]. De même, des matrices d'hydrogels dégradables sous l'action d'enzymes ou dans les conditions environnementales peuvent être conçues et adaptées au profil de libération souhaité [16].

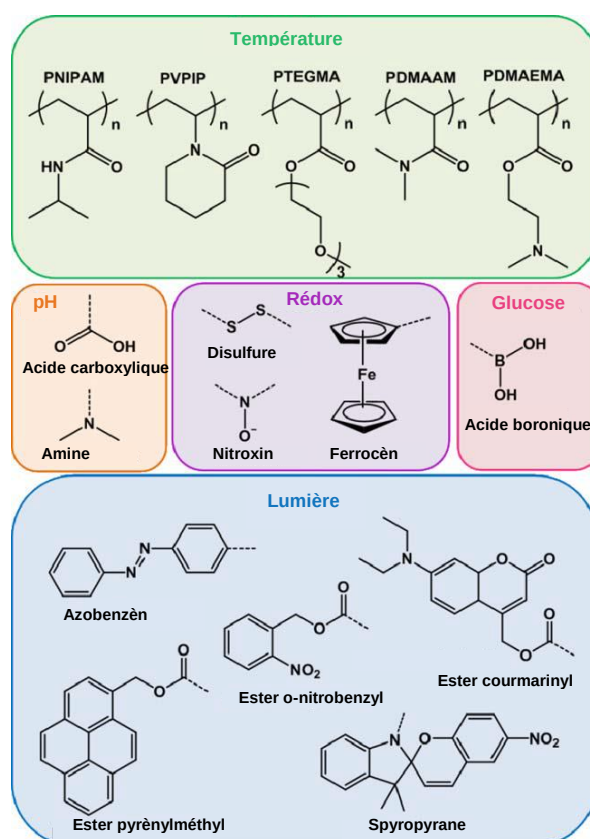


Figure 1-4: Représentation de quelques polymères ou groupements chimiques sensibles à un stimulus [15].

Les hydrogels à l'état hydraté ont des propriétés physiques similaires à ceux des tissus vivants, avec le comportement d'un matériau élastique. Il a été démontré que ce comportement élastique réduisait les risques d'irritation des tissus environnants [17]. Ces systèmes peuvent être injectés, si le système le permet, ou implantés, minimisant les risques de réponse immunitaire. La possibilité de former des hydrogels de taille et de forme très variables les rend également très attractifs. Ils sont en plus déformables et peuvent ainsi rapidement s'adapter aux contraintes de la zone dans laquelle ils doivent être positionnés [18].

Aussi, aux propriétés intéressantes des hydrogels peuvent s'ajouter les propriétés intrinsèques aux polymères. Certains polymères comme le chitosane, le poly(acétate de vinyle) (PVA) ou l'acide poly(acrylique) (PAA) [19], ont des propriétés bioadhésives et mucoadhésives qui facilitent la fixation du gel dans la zone où l'acide polyacrylique doit être administré. Ces propriétés d'adhésion sont dues : pour le chitosane à sa charge positive apportée par les groupements -NH_2 protonés en milieu acide qui interagissent avec les muqueuses chargées négativement, et pour les 2 autres polymères à des interactions avec les glyco-protéines des muqueuses [20, 21].

Actuellement les hydrogels sont utilisés pour délivrer un PA par voie orale, parentale, nasale et transdermique [22]. Parmi les polymères biocompatibles utilisés pour préparer ces formulations, les polysaccharides s'avèrent être d'excellents candidats grâce à leur grande bio-disponibilité (provenance de sources naturelles), aux groupements fonctionnels disponibles (-OH, -COOH, -NH₂) permettant des modifications chimiques, et à leur biocompatibilité et biodégradabilité [23].

1.2.3 L'intégration d'un principe actif dans les hydrogels

Le mécanisme de libération du principe actif (PA) dépend fortement de la manière dont il est introduit dans l'hydrogel. 3 stratégies différentes permettant d'incorporer un agent thérapeutique dans une matrice hydrogel sont présentées ci-dessous.

- (i) Le PA est piégé dans le réseau hydrogel. Il a pu être directement ajouté à la formulation avant l'étape de réticulation de la matrice, ou bien intégré au gel après cette étape, en faisant gonfler le gel dans une solution contenant le PA [17]. Cette deuxième stratégie est préférée lorsque les conditions de réticulation peuvent avoir des effets néfastes sur l'actif [24]. Dans les 2 cas, le PA est simplement retenu par la gêne occasionnée par le gel. Un important « burst release » peut-être obtenu si les propriétés du gel sont mal contrôlées (gonflement, taux de réticulation), notamment si la taille de pores du gel est supérieure à la taille de la molécule à délivrer.
- (ii) Le PA est attaché covalentement au polymère constituant l'hydrogel. Dans ce cas-là, l'hydrolyse de la liaison covalente PA/polymère ou la dégradation du gel activent la libération du PA. Anseth et al. utilisent le clivage enzymatique pour libérer un anti-inflammatoire, la dexaméthasone (DEX), covalentement réticulée à un hydrogel de poly(éthylène glycol) (PEG) par chimie clic thiol-ène. La chimie clic, dont les spécificités seront introduites dans la partie suivante, se fait entre le PEG contenant des groupements norbornène et la dexaméthasone chimiquement modifiée par un peptide, sensible au clivage enzymatique et contenant un groupement thiol [25]. Le mécanisme de libération de la DEX est présenté Figure 1-5(a). Dans le but de contrôler la libération de peptides, Koheler et al ont aussi développé un hydrogel de PEG, réticulé par chimie thiol-maléimide, dans lequel les peptides sont réticulés chimiquement au gel par une réaction de Diels-Alder [26]. Cette réaction de Diels-Alder est réversible et sensible à la température. Ainsi, en modifiant la température il est possible de retenir ou d'accélérer la libération des peptides (Figure 1-5(b)). Le risque, néanmoins, en attachant covalentement l'actif au gel, est de modifier la molécule et de perdre son efficacité.
- (iii) Le PA est retenu dans la matrice grâce à des interactions physiques avec le réseau hydrogel. Elles peuvent être ioniques, électrostatiques ou hydrophobiques (exemples concrets). Le

changement de température ou de pH peuvent être des facteurs d'activation de la libération du PA.

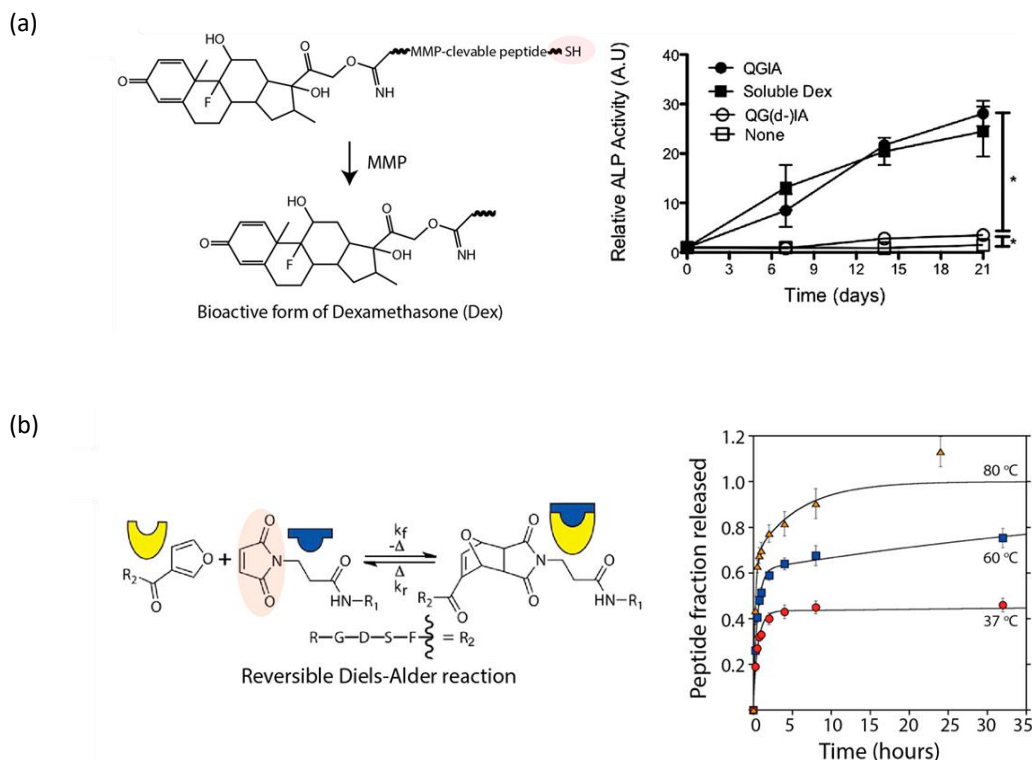


Figure 1-5: Exemples de principes actifs attachés covalentement aux chaînes polymériques du gel : (a) libération de la dexaméthasone par clivage enzymatique (adapté de [25] par [27]) - (b) libération de peptides par augmentation de la température [26].

1.2.4 Les mécanismes de libération du principe actif (PA) depuis l'hydrogel

Les hydrogels de par leurs propriétés peuvent libérer de façon prolongée (sur au moins 12 h) et à un taux régulier le principe actif (PA) encapsulé [28]. La libération de cet actif peut être contrôlée par diffusion (passive ou active), gonflement, par des réactions réversibles polymère-principe actif puis diffusion (dans le cas où le PA est lié au polymère) ou par dégradation du polymère.

1.2.4.1 Libération contrôlée par diffusion

Les systèmes qui libèrent le PA par diffusion sont les plus courants. Dans ces systèmes là, la taille des pores (ξ) ainsi que la taille du PA sont les paramètres principaux influençant la cinétique de libération du PA depuis la matrice hydrogel. La taille de pores peut être déterminée théoriquement à partir du taux de gonflement à l'équilibre du gel ou de son module élastique (E) (Flory, 1978 – Treloar, 1973). Elle peut également être évaluée par des techniques directes : diffusion de la lumière ou microscopie. Les hydrogels

peuvent être classés en fonction de leur taille de pores : hydrogels macroporeux ($> 10\mu\text{m}$), microporeux ($10\text{ nm} - 10\mu\text{m}$), nanoporeux ($< 10\text{ nm}$) [28].

Pour les gels dont la taille de pore excède le diamètre du PA, le coefficient de diffusion du PA dans le gel est le même que dans l'eau. Pour les gels dont la taille de pore est équivalente au diamètre du PA, ce coefficient est réduit, dû à la gêne causée par le réseau réticulé [29, 30]. Dans ce cas là, les mécanismes de transport du PA sont dus à de la diffusion et de la convection dans les pores remplis d'eau. Enfin, pour les gels nanoporeux, souvent obtenus par réticulation chimique des chaînes de polymère, la taille de pore est inférieure au diamètre du PA. La diffusion se fait alors à partir du volume libre, c'est-à-dire le volume qui n'est pas occupé par les chaînes de polymère [16].

La diffusion du PA dans la matrice est décrite par la loi de Fick. En présence d'un gradient de concentration (dC/dx) il apparaît un flux de matière (J) tendant à équilibrer cette concentration. La première loi de Fick énonce que le flux de diffusion est proportionnel au gradient de concentration :

$$J = -D\left(\frac{dC}{dx}\right) \quad (1)$$

J correspond au flux de PA, D au coefficient de diffusion du PA, et C à la concentration en PA. D est relié au diamètre $2r$ du PA par la loi de Stokes-Einstein ($D=k_B T/(6\pi\eta r)$), r étant le diamètre hydrodynamique du PA assimilé à une sphère. La variation dans le temps du gradient de concentration entraîne une diminution du flux de matière. La seconde loi de Fick est alors utilisée pour décrire le profil de libération :

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D\left(\frac{\partial^2 C}{\partial x^2}\right) \quad (2)$$

Ce système d'équations ((1) et (2)) est valable dans le cas de diffusion uni-directionnelle et pour un coefficient de diffusion D indépendant de la concentration. Cette équation peut être appliquée à un grand spectre de systèmes à libération contrôlée par diffusion. Des paramètres supplémentaires qui tiennent compte de la géométrie du système, des interactions polymère-PA, des propriétés physico-chimiques du PA, de la dégradabilité de la matrice ou de sa réponse à un stimulus extérieur, complexifient cette équation.

1.2.4.2 Libération contrôlée par gonflement

Le taux de gonflement contrôle la cinétique de libération du PA lorsque la diffusion du PA est plus rapide que le gonflement du gel. Un exemple concret de ce mécanisme de libération sont les comprimés d'hydroxypropyl méthyl cellulose (HPMC). Les matrices de HPMC contenant le PA sont stockées généralement sous forme déshydratée, à l'état vitreux. Après administration par voie orale du comprimé, la matrice gonfle et une transition de l'état vitreux à l'état élastique a lieu, entraînant la libération du PA.

La libération du PA dépend de la quantité d'eau absorbée et de l'épaisseur de la couche de polymère hydraté et varie au cours du temps après administration [31].

1.2.4.3 Libération contrôlée par réaction chimique

Les systèmes regroupent les gels dont la libération du PA se produit par une réaction chimique à l'intérieur de la matrice. Cela peut être une réaction chimique conduisant à la dégradation de la matrice (hydrolyse par dégradation enzymatique) : ce système est alors qualifié d'érodable et la libération dépend uniquement de la cinétique de dégradation des chaînes polymères. Un autre cas est celui où le PA est lié à la chaîne polymère de façon covalente. La réaction chimique conduisant à la dégradation de cette liaison gouverne la libération du PA, dont la cinétique est contrôlée par la réaction chimique puis la diffusion. Dans ce cas le modèle mathématique décrivant le profil de libération du PA doit être adapté pour tenir compte des paramètres qui caractérisent la réaction de dégradation et la diffusion.

1.3 NOTRE APPROCHE : les hydrogels composites pour la délivrance contrôlée de principes actifs

1.3.1 Présentation des hydrogels composites

Nous avons développé au cours de ces travaux de thèse de nouveaux systèmes composites permettant de délivrer localement un principe actif hydrophobe. Ces systèmes proviennent de la combinaison de deux systèmes de délivrance performants : 1) des nanoparticules lipidiques (LNPs), capables d'encapsuler un principe actif hydrophobe et 2) des matrices d'hydrogels.

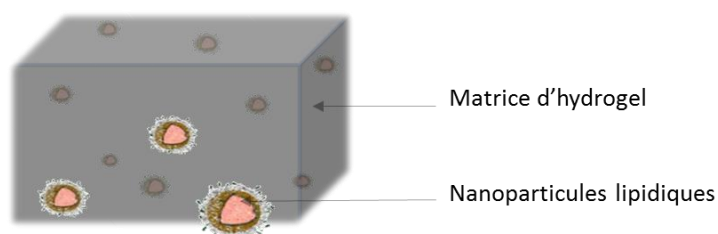


Figure 1-6: Système composite intégrant des nanoparticules lipidiques dans des matrices d'hydrogels.

Dans ces systèmes complexes, présentés Figure 1-6, l'hydrogel sert de plateforme pour la délivrance de molécules actives, il fait le lien entre le site où doit être administré le PA et le PA lui-même. Les LNPs assurent l'encapsulation de l'actif hydrophobe, qui ne pourrait pas être intégré directement dans les hydrogels car hydrophiles. Elles sont l'interface entre le PA et la matrice, et peuvent interagir avec les

chaines de polymères. Cette double encapsulation constitue une barrière supplémentaire dans la libération du principe actif, limitant ainsi l'effet "burst" observé lors de l'administration classique de PA.

L'originalité de cette étude vient aussi des différentes formes de matrices hydrogels développées (hydrogels gonflés, éponges, films) et des chimies utilisées pour réticuler les chaines de polymères. La diffusion des nanoparticules dans les matrices hydrogels formées est passive et peut être modulée grâce à un contrôle précis de la structure du réseau polymère et des propriétés des LNPs. Plus de détails concernant la matrice et les nanoparticules utilisées pour mettre en forme ces hydrogels composites sont donnés dans les paragraphes suivants.

1.3.2 Les hydrogels composites étudiés dans la littérature

La combinaison de nanoparticules et des hydrogels a déjà été étudiée dans la littérature, pour améliorer l'administration de principes actifs. Parmi les nanoparticules existantes, les liposomes ont le plus souvent été choisis pour être incorporés dans les hydrogels [32]. Quelques travaux rapportent l'incorporation d'autres nanoparticules comme les nanoparticules lipidiques [33, 34], les nanoparticules polymériques [35], ou les micelles [36]. Les hydrogels préparés à partir de polysaccharides, comme le chitosane [37], l'acide hyaluronique [38] ou l'alginate [33], ayant déjà seuls un potentiel de DDS ont été particulièrement étudiés pour servir de réservoir. Des études sur ces matériaux composites ont démontré leur capacité à limiter l'effet « burst » souvent observé dans les hydrogels simples et à libérer de façon intacte les particules encapsulées. El Kechai et al. ont développé un système composite composé de liposomes incorporés dans un gel de HA physique injectable, capable de libérer progressivement des liposomes durant 30 jours [38]. Quelques liposomes intacts sont libérés depuis ces systèmes élaborés pour traiter les troubles de l'oreille interne. D'autres systèmes composites aussi prometteurs seront davantage détaillés dans la revue consacrée aux hydrogels innovants de CS présentée dans la partie qui suit.

1.3.3 Choix des éléments constituant les hydrogels composites

1.3.3.1 Les nanoparticules lipidiques (LNPs) développées au CEA

Depuis plusieurs années, le CEA Leti développe des nanoparticules lipidiques (LNPs) pour la vectorisation de molécules. D'abord utilisé pour l'encapsulation de fluorophores lipophiles pour des applications d'imagerie biomédicale *in vivo* et la détection de tumeurs (ref), ce système s'est développé pour d'autres applications, en particulier l'encapsulation de principes actifs lipophiles pour la chimiothérapie.

L'objectif de ces travaux est d'utiliser les LNPs pour solubiliser un principe actif hydrophobe, et en les intégrant dans les hydrogels, permettre de délivrer localement et de façon prolongée l'actif encapsulé.

Ces LNPs sont des nanoémulsions produites par cisaillement d'une phase huile dans une phase aqueuse par ultra-sons ou homogénéisation haute pression (« scale up »). Elles sont composées d'un cœur huileux semi-cristallin, mélange de lipides solides (suppocire) et lipides liquides (huile de soja), stabilisées par une monocouche de tensio-actifs (Figure 1-7). Cette monocouche est composée de phospholipides insolubles (lécithine) et de polymères hydrophiles (PEG) qui permettent l'obtention de nanoparticules stables dans la phase aqueuse sur des durées très longues (> 18 mois à 40°C). La biocompatibilité des particules est assurée par une composition en produits de grade pharmaceutique approuvés chez l'Homme par la FDA (*Food and Drug Administration*) et permet d'envisager des applications *in vivo*. Le cœur hydrophobe autorise l'encapsulation de composés hautement lipophiles, ne pouvant être délivrés sous forme libre. La couronne des particules permet d'envisager le greffage de molécules ou de bio-molécules d'intérêts (peptides, anti-corps...) par des protocoles classiques de bio-conjugaison.

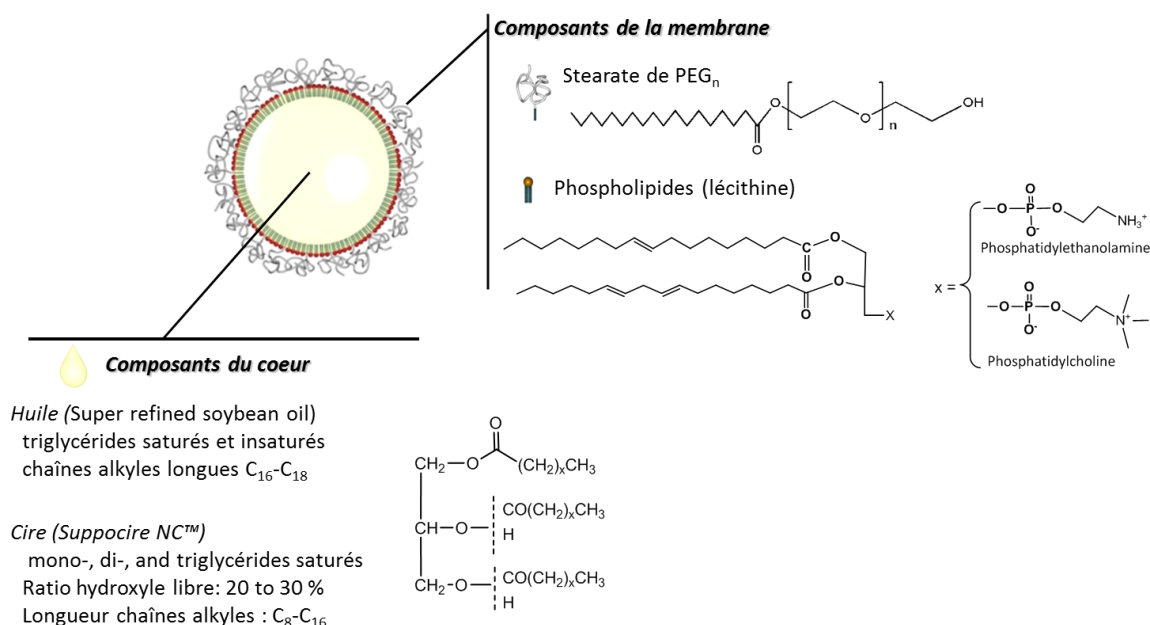


Figure 1-7 : Composition des LNPs développées au CEA-Leti. Les LNPs possèdent un cœur semi-cristallin stabilisé par une monocouche de tensio-actifs.

Le diamètre des LNPs ainsi que leurs charges surfaciques peuvent être facilement modulables. Ceci offre la possibilité d'adapter les propriétés des particules à l'application souhaitée. Pour cette étude, les paramètres taille et charge surfacique pourraient être des paramètres influençant la libération des particules depuis le gel.

Il est possible de synthétiser des LNPs de 30 à 120 nm de diamètre en changeant les proportions cœur/couronne. La couronne peut être également modifiée pour intégrer des charges à la surface des LNPs, la formulation « classique » des LNPs produisant des LNPs neutres ou légèrement anioniques (LNP(N)). Une des stratégies est de remplacer une quantité définie de phospholipides amphiphiles neutres ou légèrement anioniques, par un lipide anionique ou cationique. Précédemment, des travaux de thèse ont permis d'établir une formulation de LNPs cationiques (LNP(+)) pour la transfection d'ARN (acide rubonucléique). Le phospholipide a été remplacé par un lipide cationique, le 1,2-dioléoyl-3-triméthylammonium propane (DOTAP). Une formulation permettant d'obtenir des LNPs anioniques (LNP(-)) a été mise au point au cours de cette thèse afin de pouvoir comparer les profils de libération des LNPs en fonction de leurs charges (positives, neutres ou négatives). L'Hostaphat® remplace dans ce cas une partie du phospholipide.

1.3.3.2 Les polysaccharides choisis

Les hydrogels formés à partir de polysaccharides sont en plein essor, et sont utilisés notamment en ingénierie tissulaire et comme systèmes de « drug delivery ». Ces polymères contiennent des groupements fonctionnels (amine, hydroxyle, acide carboxylique, aldéhyde) offrant la possibilité de les modifier chimiquement. Comparés aux polymères synthétiques, les polysaccharides ont l'avantage d'être biodégradables, biocompatibles, et sont propices à l'adhésion cellulaire. Ils proviennent de sources naturelles, issus des algues (alginate, carraghénane), des plantes (cellulose, gomme de guar), d'organismes microbiens (dextrane), ou d'origine animale (chitosane, acide hyaluronique, heparine) [39, 40]. Parmi ces polysaccharides, la carboxyméthylcellulose, un dérivé de la cellulose, et le chitosane, ont été choisis pour former ces hydrogels composites.

La carboxyméthylcellulose (CMC)

La CMC est un polysaccharide anionique dérivé de la cellulose dont la structure chimique est présentée Figure 1-8. Les groupements hydroxyles de la pyranose constituant la cellulose sont partiellement remplacés par des groupements carboxyméthyles ($-\text{CH}_2\text{COOH}$) [41]. Ce polysaccharide a été largement utilisé dans le domaine pharmaceutique [42] et biomédical [43, 44] pour sa non-toxicité, et son immunogénicité faible [45].

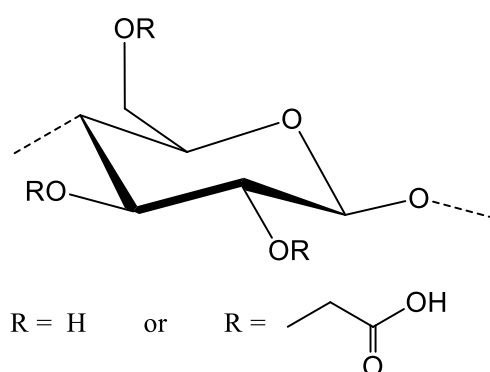


Figure 1-8: Structure chimique de la CMC.

Le chitosane : revue

Le chitosane, un polysaccharide cationique obtenu par déacétylation de la chitine, un composant de l'exosquelette des crustacés, a été largement utilisé dans le cadre de ces travaux de thèse. Un focus particulier sur les propriétés du chitosane et les possibilités infinies de former un hydrogel à partir de ce polysaccharide est présenté sous forme de revue. Cette revue a été acceptée dans le journal Society of Chemical Industry.

Chitosan-based hydrogels: recent design concepts to tailor properties and functions

Lisa Racine^{1,2}, Isabelle Texier^{1*}, and Rachel Auzély-Velty^{2*}

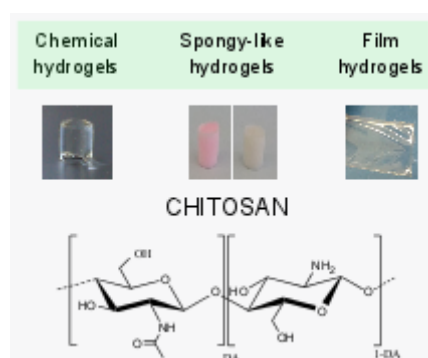
¹ Univ. Grenoble Alpes, F-38000 Grenoble France, and CEA LETI MINATEC Campus, F-38054 Grenoble France

² Univ. Grenoble Alpes, CERMAV-CNRS, F-38000 Grenoble France

Chitosan (CS) has received much attention as a functional biopolymer for designing various hydrogels for biomedical applications. This review provides an overview of the different types of CS-based hydrogels, the approaches that can be used to fabricate hydrogel matrix with specific features and their applications in controlled drug delivery and tissue engineering. Emphasis is laid on the recent design concepts of hybrid hydrogels based on mixtures of CS and natural or synthetic polymers, interpenetrating polymer networks as well as composite hydrogels prepared by embedding nanoparticles into CS matrices.

Keywords: chitosan, hydrogels, crosslinking, click reactions, interpenetrating network, composite hydrogels, tissue engineering, drug delivery.

Graphical abstract



List of abbreviations:

AAm acrylic acid with acrylamide

AD	adamantane
C*	critical overlap concentration
CD	cyclodextrin
CECS	<i>N</i> -carboxyethyl CS derivative
CFR	carboxyfluorescein
CMCS	carboxymethyl-chitosan
CQ	camphorquinone
cryo-SEM	cryo-scanning electron microscopy
CS	chitosan
CS-g-PAA	chitosan- <i>graft</i> -poly(acrylic acid)
CS-NAC	CS- <i>N</i> -acetyl-L-cysteine
DA	degree of acetylation
Darocur 2959	2-hydroxy-1-4(hydroxyethoxy)-phenyl]-2-hydroxy-2-methyl-1-propane-1-one
DS	degree of substitution
E-SEM	environmental-SEM
EGAMA	ethylene glycol acrylate methacrylate
EO	ethylene oxide
FR	fluorescein
β-GP	β -glycerophosphate
GC-CS	glycol-chitosan
(GC-SH)-CS	(thiolated glycol)-chitosan
GO	graphene oxide
HA	Hyaluronic acid
HA-AA	hyaluronic acid-11-azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amine
HAp NPs	hydroxyapatite nanoparticles
HEMA	hydroxymethacrylate
IPN	interpenetrating polymer networks
Irgacure 2959	1-[4-(2-hydroxyethoxy)-phenyl]-2-hydroxy-2-methyl-1-propane-1-one
LAP	lithiumphenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate
LCST	lower critical solution temperature
ME	microemulsions
MLVs	multilamellar vesicles

NPs	nanoparticles
OAC-PEG-OAC	oligo(acryloyl carbonate)-b-poly(ethylene glycol)-b-oligo(acryloyl carbonate)
OB-CS	oxanorboradiene-chitosan
Ox-dex	oxidized dextran
Ox-HA	oxidized hyaluronic acid
PBS	phosphate buffer saline
PEC	polyelectrolyte complex
PEG	poly(ethylene glycol)
PEGDGE	PEG diglycidyl ether
PEG-CMCS	PEGylated carboxymethyl-chitosan
PNIPAAm	poly(N-isopropylacrylamide)
PO	propylene oxide
poly(DMAEMA)	poly(dimethyl-aminoethyl methacrylate)
PPG	poly(propylene glycol)
RF	riboflavin
scCO ₂	supercritical CO ₂
SUVs	small unilamellar vesicles
TPP	tripolyphosphate
VA-086	2,2-Azobis[2-methyl-N-(2-hydroxyethyl) propionamide]

1. Introduction

Hydrogels are highly hydrated networks that have been fabricated from a wide range of hydrophilic polymers. Their high water content, high permeability to small molecules, and mechanical resemblance to natural tissues make these soft materials attractive candidates for many biomedical applications, such as drug delivery, wound healing, ophthalmic materials and tissue engineering.¹⁻⁵ Hydrogels can be classified into ‘reversible’ or ‘physical’ gels and ‘permanent’ or ‘chemical’ gels. In physical gels, the networks are held together by molecular entanglements and/or secondary interactions including ionic cross-links, hydrogen bonds, and hydrophobic interactions. In contrast, chemical gels consist of covalently cross-linked networks.^{6,7} In recent years multicomponent hydrogels, that include hybrid hydrogels which are composed of different polymers interconnected via chemical or physical linkages, interpenetrating polymer networks

(IPN) hydrogels and nanocomposite hydrogels incorporating organic or inorganic nanoparticles, have emerged as innovative materials for biomedical applications.⁸⁻¹¹ These networks most often show physico-chemical properties that can remarkably differ from those of the macromolecular constituents. Importantly, the network properties can be tailored by the type of polymer and its concentration, by the applied crosslinking method as well as by the overall procedure used for their preparation. In many cases, polysaccharides have been selected for the formation of these complex networks due to their attractive properties such as biodegradability, low toxicity, renewability. Biological activity is a potential benefit in some cases. This is highlighted in the case of CS, a linear polysaccharide of randomly distributed *N*-acetyl glucosamine and glucosamine units, which is currently used in a number of commercial applications including wound dressings due to its haemostatic action together with its ability to activate macrophages.¹²⁻¹⁵ The primary amine groups of CS as well as the hydroxyl groups allow chemical derivatization by which the properties of this polymer can be modulated and adjusted to the aimed application. This has resulted in a large variety of CS derivatives with different physical and biological properties, as well as hydrogels.¹⁶⁻²⁰ This review aims at highlighting the recent developments in CS-based hydrogels with emphasis on the fabrication, properties and possible biomedical applications. Recent literature has been cited to summarize the advances on CS-based hydrogel materials including pure CS hydrogels, CS hybrid hydrogels, IPN hydrogels based on CS and CS nanocomposite hydrogels.

2. Hydrogels prepared directly from native CS

2.1. CS physical hydrogels with no external cross-linking agent

CS is a linear copolymer of β -(1-4)-linked D-glucosamine (GlcN) and *N*-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) varying in composition and sequence. This polysaccharide is typically obtained by alkaline deacetylation of chitin, which is the second most abundant biopolymer after cellulose and the main component of the exoskeleton of animals, especially in crustaceans and insects.²¹ It is also the principal fibrillar polymer in the cell wall of certain fungi. The main parameters influencing the characteristics of CS are its molecular weight and degree of acetylation (DA), representing the proportion of *N*-acetylated units. In fact, it is considered that when the DA of chitin is lower than 60 %, it becomes soluble in an aqueous acidic medium ($\text{pH} \leq 5.0$) due to the protonation of the free amine group of the GlcN units, and in these conditions, it is named CS.²² Acidic solutions of CS when exposed to alkaline pH result in a decrease of the apparent charge density of the polymer, and thereby in the formation of physical gels due to hydrogen bonding and hydrophobic interactions. Montembault et al. described the formation of physical hydrogels with no external crosslinking agent, based on the evaporation of a solution of CS in a hydro-alcoholic medium.²³ To allow gel formation, the initial polymer concentration had to be above the critical overlap concentration (C^*). Then, the balance between hydrophilic and hydrophobic interactions had to reach a critical value.

This value could be achieved thanks to a homogeneous decrease of the polymer charge density by evaporation of a solution of CS in hydro-alcoholic medium (aqueous acetic acid/1,2-propanediol).²³ (sup sentence) The role of the alcohol was not only to reduce the dielectric constant of the medium but also, possibly, to participate in the formation of hydrophobic junctions between polymer chain segments.²⁴ It was demonstrated that the gelation time is strongly dependent on the DA, which has an influence on hydrophobic interactions, brought by acetyl groups. For high DAs, the low charge density, in connection with the presence of numerous hydrophobic groups, favours the gelation process.²⁴ Later, it was shown that the formation of CS hydrogels could be achieved directly from an aqueous solution of CS when the latter was put in contact with gaseous ammonia²⁵ or with an aqueous NaOH solution.²⁶ These simple techniques to prepare hydrogels without any external crosslinker are promising to fabricate non-toxic materials for biomedical applications. For example, material proposed by Fiamingo et al. showed excellent biological properties for cardiac tissue engineering.²⁶

2.2. CS films

Due to its pH dependent solubility, CS can also form stable films on various surfaces under neutral and basic pH conditions. The ability of CS to form films is related to its macromolecular structure, based on β -(1-4)-linked D-glucosamine repeating units, which gives a semi-rigid character to the main chain and allows formation of a cooperative H bond network.²⁷ The direct evaporation of a CS solution spread on a glass plate is the most simple technique for the preparation of CS films and generally produces a water-soluble film. This kind of hydrogel membrane can find applications in topical drug delivery²⁸ or wound dressing.^{29,30} For such applications, controlled mechanical properties of the films are essential to get conveniently handled systems, easy to apply and remove. The film should be durable, flexible and elastic to withstand mechanical stress exerted by parts of the body. These film properties depend on several parameters such as the CS molecular weight and degree of acetylation, the organic acid used during processing, and the possible presence of plasticizer. Grant et al demonstrated that the larger the molecular weight of CS, the higher the flexibility and the tensile strength of the film.³¹ They attributed this result to the increase of chain entanglement density formed during film formation. Similarly, the DA affects the mechanical properties of the films. Films prepared from high-DA CS are more brittle and difficult to handle than those derived from CS with a lower DA.³² The DA also influences cell adhesion and film biodegradability. The higher the DA of CS, the lower was the cell adhesion on the films.³³ This behaviour was attributed to the fact that at a pH close to 7, protonated amine groups on the CS backbone are still available to allow electrostatic interactions with the negatively charged surface of cell membranes. When the DA decreases, the charge density of CS increases, thus enhancing cell adhesion.³⁴ Moreover, it was shown that the mechanical properties of the films depend on the solvent used to dissolve CS. Films obtained from CS

dissolved in a lactic acid solution exhibited better flexibility but lower tensile strength in comparison to CS dissolved in acetic acid buffer. Lactic acid can be employed as a plasticizer to improve film elasticity.³⁴ Finally, another alternative to improve the elasticity and processability of CS films consists in adding a plasticizer into the initial formulation, such as glycerol, poly(ethylene glycol) (PEG) or poly(propylene glycol) (PPG).³⁵ The expected effect of the plasticizer is to reduce polymer-polymer interactions allowing better mobility of polymer chains.

2.3. Porous hydrogels

CS hydrogels with well-defined and interconnected pores have been developed for biomedical applications. They exhibit fast swelling, fast response to an external stimulus and can potentially incorporate nano- or microparticles useful for drug delivery applications.³⁶ Interconnected pores facilitate blood vessel in-growth and serve as a three-dimensional extracellular matrix for tissue engineering.^{37, 38} These porous scaffolds can be easily processed from CS with no external crosslinking agent, taking advantage of the polysaccharide properties. Depending on the pore sizes, porous hydrogels are qualified as nanoporous (pores size below 10 nm), microporous (pore sizes in the 10 nm - 10 μ m range), and macroporous or superporous (pores size above 10 μ m).³⁹

Several methods have been developed to prepare these hydrogels with a well-defined porous structure. Macroporous hydrogels can be obtained by gas foaming, porogen leaching, cryogelation, freeze-drying, inverse opal hydrogelation (colloidal particles are inserted into the precursor solution and removed by thermal processing, solvent extraction or chemical etching after polymerization), electrospinning or 3D printing.⁴⁰ Otherwise, nanoporous materials with highly interconnected pores and which keep intact the structure of the initial wet material, namely aerogels, can be obtained by the supercritical drying process.⁴¹ In this section, we focused on CS macroporous scaffolds obtained by the freeze-drying technique and cryogelation as well as on nanoporous scaffolds obtained by the supercritical drying process.

2.3.1. Freeze-drying process

Macroporous scaffolds can be formed directly from native CS by freeze-drying a CS solution in acidic media⁴². The scaffold formed can have interconnected pores and pore sizes ranging from several microns to a few hundred microns with porosities up to 90 % depending on the CS concentration and the freeze-drying conditions.^{42, 43} This material with spongy-like characteristics can be named “sponges”. Its porous structure is attributed to phase separation between water and polymer during the freezing process. Ice crystals are formed and subsequently removed after the drying step, affording a highly porous specimen. The porosity depends on the water content, the CS concentration and also on the freezing conditions, (i.e. the temperature, the thermal gradient and the cooling rate).^{42, 44} The lower the freezing temperature is, the

quicker the freezing rate of the CS solution is. At a higher freezing rate, ice crystals have shorter time to grow, and the pores size is thus smaller. However, a decrease in CS concentration leads to an increase in the pore size.^{43, 45} Ikeda et al. measured an average diameter of the pores of 158 μm , 142 μm , and 74 μm for the 1 wt %, 2 wt %, and 4 wt % CS sponges, respectively.⁴³ Nevertheless, the pores tend to become more homogeneous and the pore walls thicker when the concentration of CS is increased (from 1 to 4 wt %). If the concentration is increased up to 10 wt %, the CS solution is highly viscous, leading to the formation of aggregates and consequently, to a decrease of porosity.⁴³ For deeper understanding of the structure formation, Ivan'kova et al. investigated the *in-situ* formation of porous structure of CS sponges by cryo-scanning electron microscopy (cryo-SEM).⁴⁶ This technique allows the direct visualization of the formation of the porous structure after sample freezing, and during the drying process when the cryo-chamber is placed at high vacuum and low temperature. They demonstrated that directly after freezing, a phase separation of the homogeneous CS solution occurs, resulting in the formation of the porous structure. This phenomenon was attributed to strong interactions between the CS chains, which are semi-rigid and have a tendency to form the structured network inside the solution.⁴⁶

When rehydrated in a neutral aqueous medium, these CS sponges exhibited rapid swelling and ultimately dissolved. Similarly to films, if the sponges are obtained directly from CS solution, the dissolution of sponges can be avoided by rehydration of the samples in either dilute aqueous NaOH (0.1 M) or through ethanol gradient. Scaffolds hydrated in NaOH exhibited some shrinkage and distortion, probably due to base-induced changes in crystallinity and associated structural stresses. On the other hand, samples hydrated through an ethanol series exhibited no significant volume or shape modifications.⁴⁷

CS sponges can serve as biocompatible matrices to release bioactive substances at a controlled rate. They have been used as tissue engineering scaffolds to deliver growth factors.⁴³ Ikeda et al. demonstrated that the CS concentration can influence the release kinetics of growth factors from the sponges. They found that the higher the concentration of CS sponge used during processing, the longer the releasing time of the growth factor from the material. After 2 weeks, 50 % of growth factor were still retained inside the sponge for a CS concentration of 4 wt %.⁴³ CS sponges have been also used to locally deliver antibiotics at a controlled rate. In order to avoid drug damage during the freeze-drying process, antibiotic loading was performed by swelling the CS sponge during hydration in a solution containing the drug.⁴⁸

2.3.2. Cryogelation

An alternative to the freeze-drying process to obtain porous CS hydrogels still without using crosslinkers is the cryogelation. This method does not require a drying step and consists in preparing hydrogels below the freezing point of the reaction, when the most part of the solvent (water) forms crystals.³⁷ The soluble

substances (monomers, polymers, initiators) concentrated in a non-frozen microphase will form the gel. After the gelation period, the cryogel is returned to room temperature, and ice crystals of solvent are replaced by interconnected pores. CS cryogels have been prepared by cooling an acidic CS solution and then immersing it in a gelation environment (ethanol/NaOH), at a temperature lower than the freezing point of the CS solution (-20°C). The samples are then washed with a phosphate buffer saline (PBS) solution.⁴⁹ A highly interconnected porous hydrogel with the pores that ranged from 60 to 150 µm and a porosity of 90 % was produced using this technique. This method has advantages to be fast (24 h) and to remove residual acetic acid in one preparation step. Compared with conventional freeze-drying, this method has improved energy efficiency, and is amenable to scale up.⁴⁹ This easily formed sponge-like cryogel, have recently gained significant interest in tissue engineering, facilitating blood vessel in-growth.³⁷

2.3.3. Drying by supercritical fluid

For some applications smaller pore sizes and dried scaffolds which keep intact the porous texture of the wet materials are required. This need is increasing in the use of porous scaffolds as platform for sustain release of encapsulated active compounds.⁵⁰ Aerogels, a special class of nanoporous materials with an interconnected pores structure have the special requisite to serve as drug delivery systems.⁵⁰ Aerogels are obtained from wet gels, using an appropriate drying process, usually a supercritical drying process. Supercritical CO₂ (scCO₂) is the most appropriate fluid for supercritical drying of polysaccharides due to its mild critical point conditions (31 °C, 7.4 MPa). CS based aerogels dedicated to biotechnological and pharmaceutical applications have been recently initiated by Quignard et al.⁴¹ and Maleki et al.⁵¹ The processing steps start with the preparation of a hydrogel from an aqueous solution of CS. In the following step, the water in the pores of the hydrogel must be replaced with an alcohol (i.e. ethanol) due to the low affinity of water to (scCO₂), to prepare an "alcogel" and to make possible the drying by supercritical CO₂ (scCO₂).⁵¹ For CS hydrogels, a sequential soaking in different gradients of water-to-alcohol solvent is required to reduce shrinkage.⁴¹ The last step is the drying step in the supercritical conditions of CO₂. This alternative drying method allows to better retain the structure of the hydrogels, whereas usual freeze-drying leads to cryogels presenting damages with respect to the initial pore structure due to ice crystal growth. Nevertheless, despite different soakings in water/ethanol solutions, a decrease in gel volume is observed (60 %) for CS gels during the preparation of aerogels. The shrinkage takes place essentially during the dehydration step.⁴¹

3. Physically crosslinked CS hydrogels

As developed in the previous section, CS physical hydrogels can be simply formed from CS solubilized in an acidic aqueous medium. In this section, other strategies for the synthesis of physically crosslinked

hydrogels of CS are described. They are based on the use of ionic crosslinkers (metallic ions, small anionic molecules, synthetic or natural anionic polyelectrolytes) or by the chemical modification of CS with functional molecules or macromolecules allowing the self-association of CS chains via hydrophobic or host-guest interactions (Figure 9). These strategies have the advantages to allow tunable gel swelling behaviour and in situ gelation by adjusting the concentration and the nature of the anionic crosslinker (polyelectrolyte or small molecules), or by controlling the concentration and the degree of substitution of CS derivatives.

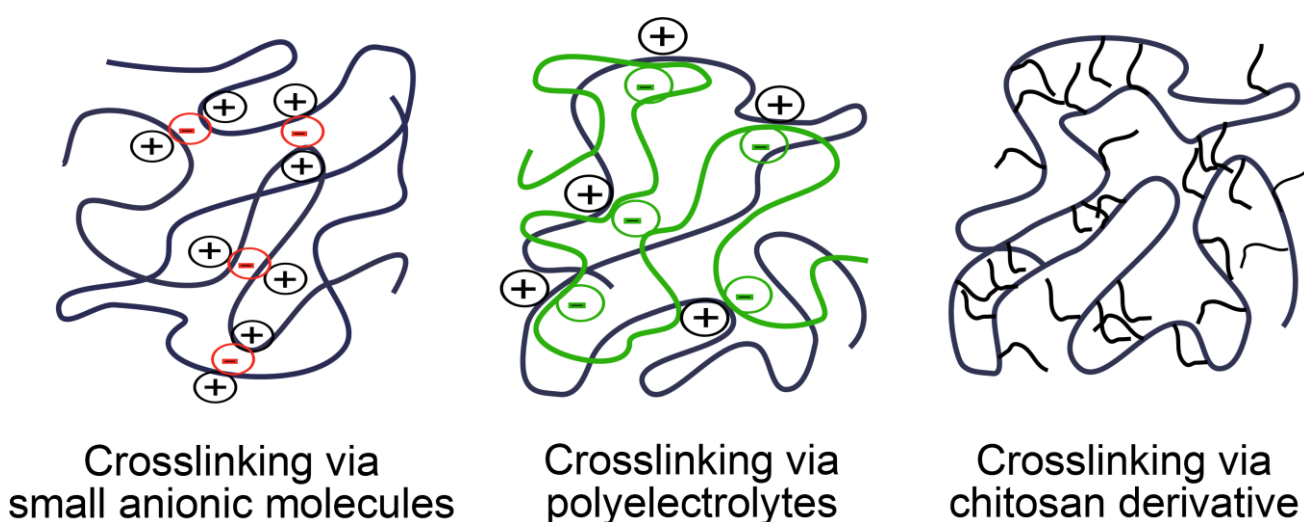


Figure 9: Schematic representation of physical association of CS chains that lead to hydrogel networks.

3.1. Ionic crosslinking

Hydrogels of CS can be obtained by the formation of coordinate-covalent bonds using metallic anions such as Mo(VI)⁵² or Pt(II).⁵³ Among small anionic molecules, phosphate-bearing molecules, such as β -glycerophosphate (β -GP),⁵⁴ tripolyphosphate (TPP),⁵⁵ and citrate⁵⁶ are commonly used as crosslinkers of CS. Sentence moved in page 16 If ionic crosslinking is strong enough, the physical association between the CS chains are maintained at physiological pH. Nevertheless, the ionic interactions occur almost instantaneously, resulting in a poorly homogeneous material. The challenge with these types of crosslinker is therefore to control their diffusion into the CS solution to obtain homogeneously crosslinked materials.

Sacco et al. used an original technique to prepare homogeneous macro-hydrogels crosslinked with TPP.⁵⁵ TPP is often used to crosslink CS in acidic conditions to obtain fibers, nanoparticles, micro/nanogels. These authors developed a technique to slow down the diffusion of TPP through the CS solution, allowing the formation of homogeneous macrogels. This technique, illustrated in Figure 10, consists in casting a CS

solution into a mold closed by two dialysis membranes. During dialysis, TPP ions diffuse slowly through the membrane. Uniform hydrogel structures were obtained by optimizing the formulations (CS and TPP concentrations) based on morphological observations of hydrated and freeze-dried specimens. Using environmental-SEM (E-SEM) and SEM, an inhomogeneous network with highly crosslinked rigid surfaces and a liquid core was observed at low CS concentration (1 wt %), whereas at higher CS concentrations, a homogeneous hydrogel was obtained for all TPP concentrations explored. The authors explained this result by the viscous CS solution which hampered diffusion of the polymer chains toward the gelling zone, preventing the formation of a gradient. The presence of the non-gelling ions (i.e. Na^+) in the bath, allowing the slowing down of the gelation process by screening the strong electrostatic interactions between the polymer and crosslinker, is also an important parameter. From this process, CS hydrogels with uniform polymeric network and lack of cytotoxicity, suitable for biomedical applications such as wound dressing and tissue engineering, could be thus obtained.

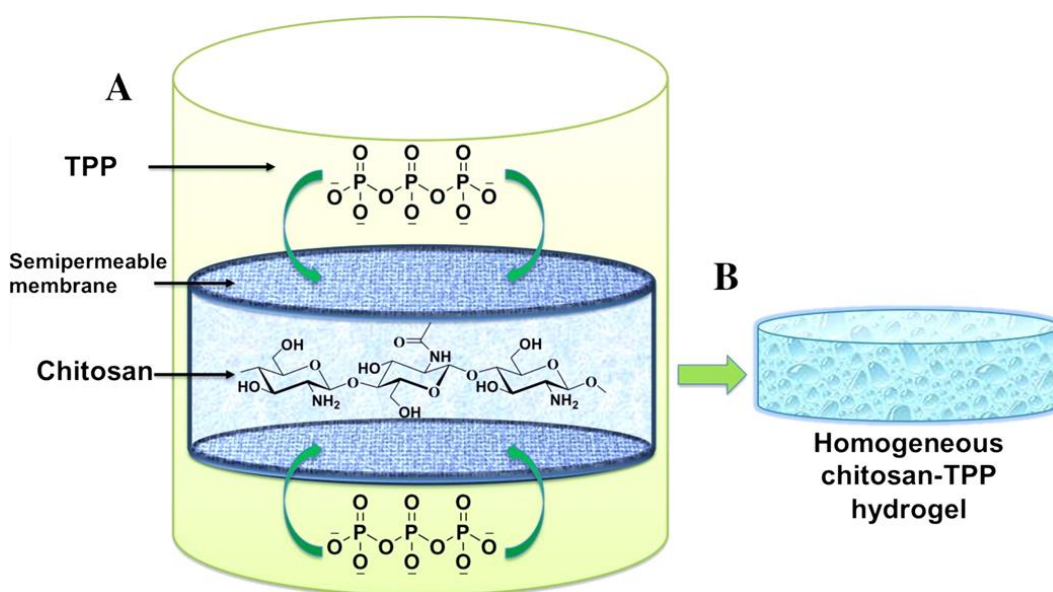


Figure 10 :Experimental set up to develop homogeneous CS-tripolyphosphate hydrogels by exploiting dialysis technique. (A) Enclosed viscous CS solution is placed into an outer TPP solution under stirring condition. During the dialysis TPP ions diffuse through semipermeable membranes and (B) after 24 h viscous solution has turned into a homogeneous hydrogel by ionotropic gelation (with permission from ⁵⁵).

Thermosensitive chitosan hydrogels were obtained by mixing chitosan with β -GP.^{54, 57} In contrast to TPP, β -GP allows neutralization of the chitosan solution without inducing direct precipitation. Subsequent heating to 37 °C induces hydrogel formation, which is particularly interesting as such chitosan/ β -GP mixtures can be injected into the body as a liquid at physiological pH forming a gel *in situ*. It should be noted here that β -GP does not seem to induce ionic crosslinking.⁵⁴ The nature of its interactions with

chitosan is not clearly understood and its chemical structure is very similar to molecules generally used as chitosan crosslinkers. Therefore, these hydrogels are presented in this section. Chenite et al. attributed gel formation to several reasons:⁵⁴ (i) the increase of CS interchain hydrogen bonding as a consequence of the reduction of electrostatic repulsion due to the basic action of the salt, (ii) the CS-glycerol-phosphate electrostatic attractions via the ammonium and the phosphate groups, respectively, and (iii) hydrophobic interactions between the CS chains which should be enhanced by the structuring action of glycerol on water.⁵⁴ Indeed, glycerol may affect the system by its influence on water, allowing temperature-dependent hydration or dehydration of CS chains. Lavertu et al proposed an alternative hypothesis for the gelation mechanism whereby heat induces transfer of protons from CS to β -GP, neutralizing CS, and allowing attractive interchain forces to form a physical gel.⁵⁷ Parameters such as the pH, the β -GP concentration, and the temperature were shown to affect gel formation.⁵⁸ The gelation temperature was found to increase as the degree of acetylation increases, while the molecular weight showed no significant effect on the temperature of gelation. This suggests that the number of amine groups on the CS chains is an important parameter controlling the gelation process.

Negatively charged macromolecules, anionic polysaccharides⁵⁹ (such as alginate⁶⁰ or carboxymethylcellulose^{61, 62}) or synthetic polymers containing carboxylic groups (poly(acrylic acid), poly(methacrylic acid), poly(*N*-acryloylglycine)),^{63, 64} can also give rise to CS hydrogels through polyelectrolyte complex formation (PEC). In polyelectrolyte complexation, the entities reacting with CS being polymers, chain entanglements or additional hydrophobic/hydrophilic interactions can be added to the ionic bridges to increase the elastic properties of the networks. As PEC hydrogels are formed by ionic interactions, they exhibit pH-, and to a minor extent, ion-sensitive swelling. Depending on the polyanion used, these systems are generally considered as biodegradable and biocompatible.^{65, 66} Therefore, CS hydrogels formed by PEC can be used in various applications such as drug delivery, cell culture and enzyme immobilisation or for wound-healing and tissue reconstruction.

3.2. Crosslinking via hydrophobic interactions

Thermally reversible hydrogels are attractive materials for biomedical applications as they can turn from solution to gel *in situ* under physiological conditions and provide the advantage of convenient administration. Besides the strategy based on the addition of β -GP to CS, thermogelling systems of CS can be obtained by grafting thermosensitive polymers such as Pluronic (poly(ethylene oxide)-*b*-poly(propylene oxide)-*b*-poly(ethylene oxide)), of which hydrophobic interactions dominate at high temperature. Park et al. grafted a monocarboxylic acid-terminated Pluronic F127 derivative on CS via an amine-acid coupling reaction to obtain a thermosensitive CS-Pluronic hydrogel.⁶⁷ The physical network is formed through hydrophobic interactions between the grafted Pluronic chains which are generated by heating the solution

of the CS-Pluronic conjugate in PBS (pH 7.4) at 37 °C (Figure 11). This hydrogel showed effective chondrocyte proliferation and promoted extracellular matrix expression compared with alginate hydrogel. These results thus suggested that this thermoreversible hydrogel has potential as an injectable cell delivery carrier for cartilage regeneration.

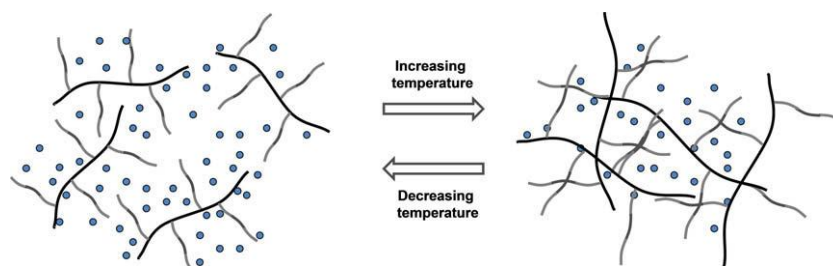


Figure 11 : Thermoreversible hydrogel based on an aqueous pluronic-CS solution (with permission from ⁶⁷).

We could also successfully prepare CS thermosensitive hydrogels by grafting Jeffamine polyetheramine M2005, a statistical copolymer of ethylene oxide (EO) and propylene oxide (PO) (OP/OE = 29/6), on CS by a reductive amination reaction between CS and the copolymer functionalized at one extremity with an aldehyde group. Gel formation was observed by heating solutions of CS-Jeffamine derivatives at 37 °C. Interestingly, the storage modulus (G') of the hydrogels could be tuned in the range 10-500 Pa by varying the degree of substitution (DS, average number of substituting groups per repeating unit) of the derivatives from 0.05 to 0.25.⁶⁸ Bhattarai et al prepared CS-PEG conjugates by a reductive amination reaction between CS and a PEG-aldehyde derivative.⁶⁹ Injectable, thermoreversible hydrogels formed at 37 °C when CS was grafted with a PEG concentration ranging from 45 to 55 wt %. A too low ratio of PEG led to CS derivatives which were not soluble in water whereas too high PEG ratios resulted in non-gelling solutions at 37 °C. These injectable thermosensitive hydrogels were studied for drug release *in vitro* using bovine serum albumin (BSA) as a model protein. After an initial burst release in the first 5 h, a steady linear release of protein from the hydrogel was achieved for a period of ~70 h. To overcome initial burst release, Bhattarai et al. covalently crosslinked the hydrogels with genipin in a fashion suitable for protein encapsulation while maintaining the injectability of the hydrogel.⁶⁹

3.3. Crosslinking via host-guest interactions

Supramolecular chemistry has proved useful for the development of new biomaterials, especially hydrogels. One specific class of supramolecular chemistry is the direct association of guest–host pairs, which involves host macrocycles such as cyclodextrins and guest molecules, of which inclusion is typically driven by molecule size and hydrophobicity. Supramolecular hydrogels based on cyclodextrin (CD)-

mediated host-guest interactions are of particular interest in the biomedical field due to their reversible nature, which makes these systems injectable. We demonstrated the ability to obtain supramolecular hydrogels of CS based on inclusion complex formation between β -cyclodextrin and adamantane (AD) molecules, each grafted along the polysaccharide chain.^{70, 71} AD was selected as a guest molecule as AD derivatives form deep and snug-fitting complexes with the host β -CD molecule, leading to very high association constants ($K_a \sim 10^4$ - 10^5 L/mol)⁷². The covalent grafting of the β -CD and AD molecules on CS was based on a reductive amination reaction performed in homogeneous aqueous solution. When a solution of CS-CD was added to a solution of CS-AD at a total polymer concentration ~ 1.5 -fold higher than the critical overlap concentration (C^*) of the initial polysaccharide, the rapid formation of transparent “gels” could be observed macroscopically. Dynamic rheological measurements demonstrated a viscoelastic behavior for the networks in which inclusion complexes play the role of sticky point between the polysaccharide chains, contrary to the solutions of the native CS which exhibits only a viscous character. Moreover, the values of the storage and loss moduli for the mixture of modified CS samples appeared to be much higher than those obtained for the solution of initial CS, although the concentration of the latter is eight-fold higher than that of modified polymers in the mixture. The effects of different external parameters such as polymer chain concentration, temperature and addition of free competitive host molecules on the viscoelastic properties were intriguing. They were related to a peculiar mechanism of association resulting in a network of double-chain strands connected by fourfold junction points, which benefits from the high energy of the CD/AD complex (Figure 12).^{73, 74}

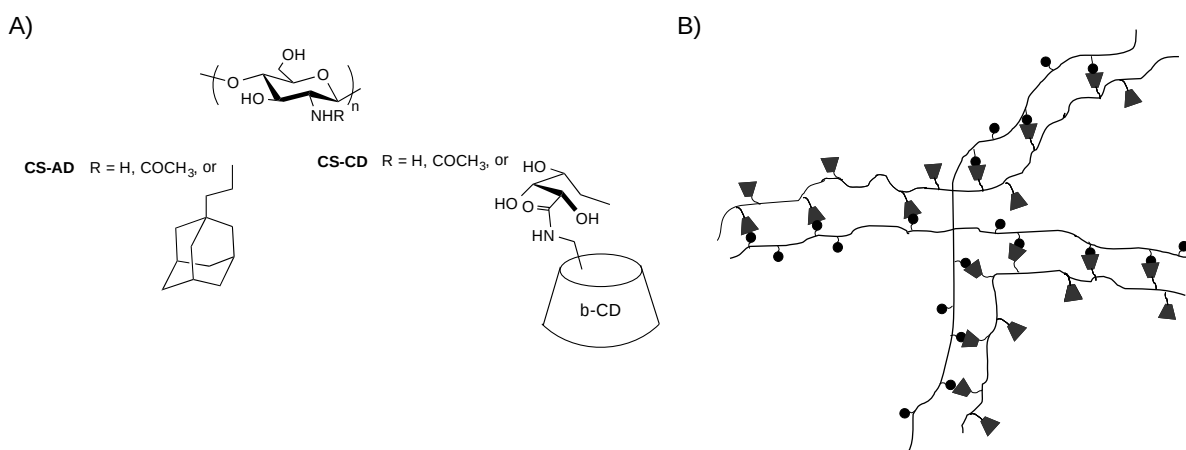


Figure 12: A) Structure of CS modified with cyclodextrine and adamantane, and B) Schematic representation of double-chain strands connected by fourfold junction points constituting the reversible network made of host and guest CS derivatives (adapted from reference ⁷⁴).

Physically crosslinked CS hydrogels are attractive materials for biomedical applications allowing *in situ* gel-formation and tunable hydrogels swelling behavior. The physical gelation provides highly biocompatible systems, as latent reactive functional molecules are often not well tolerated within the body. However, these hydrogels face two major challenges that limit their clinical applications. First, the network junction points are reversible, and in a highly aqueous environment these hydrogels adsorb more water, transform from gel to sol, and lose the designed mechanical properties. Second, the reversible nature of interactions between polysaccharide chains limits the degree of control that can be exerted over which the timescale of gel degradation occurs within the body. To overcome these limitations, CS can be chemically crosslinked.

4. Chemically crosslinked CS hydrogels

As mentioned above, covalently crosslinked hydrogels offer an improved control of the physiological stability and mechanical strength, making them promising candidates for long-term *in vivo* applications. Thanks to the available $-NH_2$ and $-OH$ chemical groups, CS can be covalently crosslinked using various (macro)molecular crosslinkers or easily modified to introduce chemically crosslinkable groups. The resulting chemical hydrogels can be based only on CS or on a mixture of CS and a natural or synthetic polymer to form hybrid hydrogels. Moreover, to widen and improve the potential biomedical applications of CS-based hydrogels, hydrophilic groups such as carboxymethyl or glycol groups can be introduced on CS to render it water-soluble at physiological pH.^{75, 76}

4.1. CS hydrogels

The most common covalent reaction used to crosslink native CS is mediated by its primary amine groups which easily react with aldehydes to form imines (also known as Schiff bases). Small molecules with two aldehyde groups, such as glyoxal or glutaraldehyde, have been extensively used to covalently crosslink CS via Schiff base formation. These crosslinkers allow direct reaction in aqueous media under mild conditions, and without the addition of auxiliary molecules such as toxic reducers. Nevertheless, formaldehyde and especially glutaraldehyde, have high intrinsic toxicity on human tissue, even at low dose.⁷⁷ They therefore have to be totally removed before material use and this step of purification is complex. The use of genipin represents an alternative to glutaraldehyde. It has been estimated to be 5000-10000 times less toxic⁷⁸ and allows to produce hydrogels with mechanical properties similar as those obtained with glutaraldehyde. The reaction mechanism of CS with genipin is presented in Figure 13.

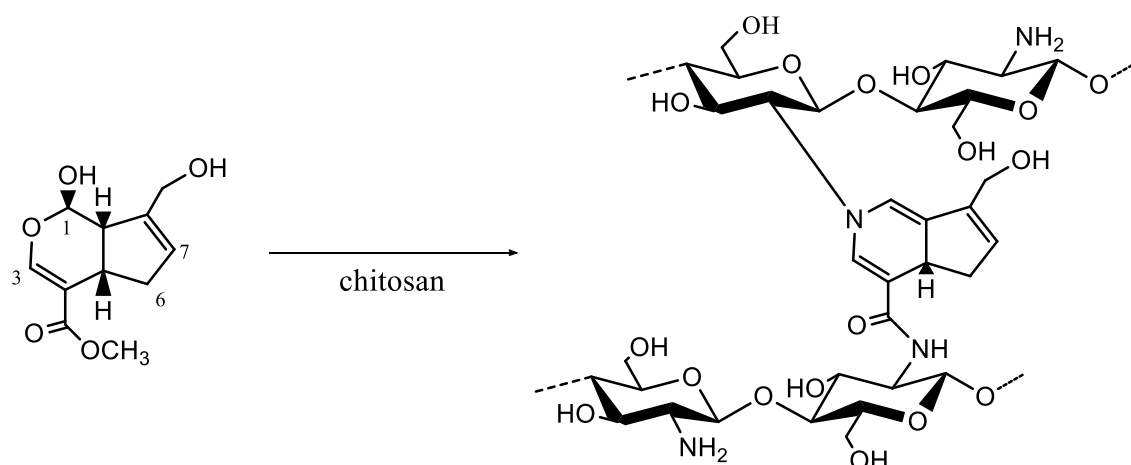


Figure 13 : Crosslinking of CS with genipin (with permission from ⁷⁹).

Under acidic and neutral conditions, which are far more interesting for CS crosslinking, a nucleophilic attack by the amine groups of CS on the olefinic carbon atom at C-3 occurs, followed by the opening of the dihydropyran ring and attack by the secondary amine group on the newly formed aldehyde group. The condensation products are much more stable compared to those obtained with glutaraldehyde.⁷⁹ In the product, short chains of condensed genipin act as crosslinking bridges. The subsequent slower reaction is a nucleophilic substitution of the ester group of genipin to form an amide bond. Simultaneously, polymerization can take place between genipin molecules already linked to the amine groups of CS which could lead to the crosslinking of amine groups by short genipin polymers. The dark-blue coloration that appears in the hydrogels exposed to air is associated with the oxygen radical-induced polymerization of genipin as well as its reaction with amine groups. Nevertheless, despite its biocompatibility, genipin is highly reactive and can negatively interact with drug loaded hydrogels. Also this non-physiological crosslinker hinders enzymatic degradation of CS, which is a limitation when fast degradation of the matrix is required in certain applications.⁸⁰

A strategy to circumvent the release of cytotoxic degradation products is to functionalize CS with crosslinkable groups. CS derivatives reported in this review are schematically represented in Table 1. Crosslinking by disulfide bond formation as a result of air oxidation of thiols offers the possibility to generate soft hydrogels ($G' < 500$ Pa). As an example, Wu et al prepared *N*-acetyl-L-cysteine (NAC)-modified CS using carbodiimide-mediated chemistry to form soft hydrogels (storage modulus, $G' = 120$ Pa) with high swelling (380 %) and macropores (5 to 30 μm).⁸¹ The hydrogel network is shown Table 1. The mechanical and swelling properties could be tuned by varying the number of thiol groups introduced on the CS backbone, the concentration of thiolated CS, and the molecular weight of CS.⁸¹ For drug delivery applications, these CS chemical hydrogels with macropores, high swelling and slow reaction rate (20 min)

have some limitations, as the protein release rate from these gels is rapid (total release within the first hour).⁸¹

The Diels-Alder reaction is a well-established solution-based reaction that has also been utilized for CS hydrogel formation. This efficient and facile reaction occurs under mild reaction conditions and does not require any catalyst, which is advantageous for crosslinking hydrogels in the presence of drugs or cells. The synthesis of hydrogels by a Diels-Alder reaction performed at 75 °C between CS modified with furan groups and a bismaleimide was reported by Montiel-Herrera et al.⁸² The CS-furan derivative and the resulting network are presented on Table 1. The Diels-Alder reaction has the advantage to be reversible by heating up to 100 °C. However, it is slow and long time of gelation (~ 200 min) and weak mechanical properties ($G' < 10$ Pa) were obtained in the case of furan-modified CS crosslinked with bismaleimide.⁸² Though this reaction has been considered as a click reaction according to the main criteria (efficiency, versatility, and selectivity) defined by Sharpless et al.,⁸³ the Diels-Alder reaction, in this case, did not fulfil all the requirements of “click” chemistry.

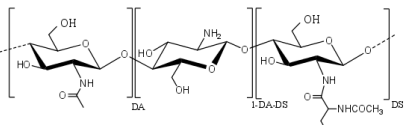
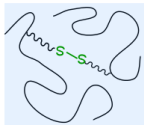
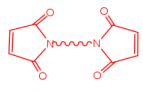
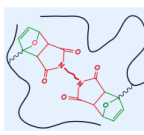
Another strategy to achieve better control over the crosslinking process is to resort to free radical photopolymerization. Photopolymerization has been extensively used for hydrogel formation as it allows opportunities for spatiotemporal control of the process.⁸⁴ The presence of amine groups on the CS backbone allows modification with photopolymerizable molecules, such as functional acrylates, methacrylates, fumarates, and vinyl esters (reactivity: acrylate > vinyl ester > vinyl carbonate > vinyl carbamate > methacrylate > fumarate). The number of photopolymerizable moieties grafted onto the CS backbone must be perfectly controlled. Indeed, these reactive groups must be fully consumed during the photopolymerization to prevent inflammation of surrounding tissues due to the remaining C=C double bonds.⁸⁴

The crosslinking reaction generally occurs under UV irradiation (typically 365 nm or 254 nm), with a sufficient dosage of light, from a solution containing modified CS and a photoinitiator. Water-soluble initiators such as 1-[4-(2-hydroxyethoxy)-phenyl]-2-hydroxy-2-methyl-1-propane-1-one (Irgacure 2959), 2-hydroxy-1-[4-(hydroxyethoxy)-phenyl]-2-hydroxy-2-methyl-1-propane-1-one (Darocur 2959), 1-[4-(2-hydroxyethoxy)-phenyl]-2-hydroxy-2-methyl-1-propane-1-one lithiumphenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate (LAP), and 2,2-Azobis[2-methyl-N-(2-hydroxyethyl)propionamide] (VA-086) are the most commonly used due to their low toxicity and superior initiation efficiency.⁸⁵ Water-soluble CS derivatives with UV-crosslinking moieties have been mainly studied to design hydrogels dedicated to cell encapsulation. A water-soluble and UV-crosslinkable CS derivative, presented in Table 1, was synthesized to design hydrogels for neural tissue engineering.⁸⁶ The synthesis included two steps: i) the synthesis of carboxymethyl CS and ii) the grafting of 2-aminoethyl methacrylate on carboxymethyl groups

via carbodiimide-mediated amidation.⁸⁶ The mixture containing the photocrosslinkable CS and the photoinitiator Irgacure 2959 was exposed to UV light for 3-5 min, resulting in hydrogel formation. A water-soluble CS hydrogel was also prepared by a photocrosslinking reaction using acrylate groups.⁸⁷ CS was functionalized with ethylene glycol acrylate methacrylate (EGAMA) by a Michael addition reaction between the amine groups of the polysaccharide and the acrylate groups of EGAMA. Then, the CS derivative was crosslinked in water, in the presence of Doracur 2959, under UV irradiation (15 min, 10 mW/cm²). The resulting hydrogel was shown to be non-toxic to fibroblast cells (L929) and allowed cell encapsulation at physiological pH. Recently, water-soluble UV crosslinkable and injectable CS derivatives were synthesized for designing patterned cell-laden microgels and rapid transdermal curing hydrogels.⁸⁸ The CS derivatives are synthesized by the chemoselective *N*-acylation of CS amine groups using methacrylic anhydride without any activators. The methacryloyl groups allow the solubilisation of CS in water by reducing intra/intermolecular hydrogen bonds, and provide a crosslinkable CS derivative thanks to C=C double bonds.⁸⁸

Many efforts have been made to limit the potential deleterious effects of UV light irradiation, the cytotoxicity of radicals generated by the dissociation of initiators and the inflammation reaction of the surrounding tissue due to remaining double bonds. The irradiation time, wavelength, light intensity, as well as the nature and concentration of the photoinitiator, are key adjustable elements to reduce damages. Recently Hu et al. reported CS hydrogels crosslinked under visible light instead of UV light irradiation for tissue engineering.⁸⁹ Exposure to visible light causes less damage to cells and creates less reactive radicals than more energetic UV light. The system uses methacrylate glycol CS and three different blue light initiators: camphorquinone (CQ), fluorescein (FR) and riboflavin (RF)⁸⁹. The authors investigated the initiator nature, its concentration and the time of visible light irradiation (blue light 400 – 500 nm at 500 mW cm⁻²) to find a balance between cell viability, appropriate swelling and good mechanical properties. In some conditions (RF initiator at 24 µM and 600 s of visible light irradiation), robust hydrogels could be obtained ($E \sim 25$ kPa), but the cell viability was low (30 %). The best compromise between cell viability and mechanical properties was achieved using riboflavin as a photoinitiator and a time of visible irradiation of 300 s, leading to a compressive modulus of 8.5 kPa and cell viability of 80 %.⁸⁹

Table 1: Example of CS derivatives used to form pure chemical CS hydrogels and schematic representation of the chemical network.

Chitosan derivatives	Reaction conditions & crosslinker	Hydrogel network	Key features of the gels	References
Pure chitosan hydrogels 	$T=37^{\circ}\text{C}$ water		Disulfide bonds formation Low mechanical properties ($G'=567\text{ Pa}$) Gelation time within 20 min	Wu et al. ⁸¹
	$T=75^{\circ}\text{C}$ acetic acid 2 wt% DMSO 2:1 (w/w) bis-maleimide 		Diels-Alder reaction Very low mechanical properties ($G'=10\text{ Pa}$) Gelation time time > 200 min Reversible at $T > 100^{\circ}\text{C}$	Montiel-Herrera al et al. ⁸²
	$T=37^{\circ}\text{C}$ PBS UV irradiation (365 nm 160 W t=30 min) Irgacure 2959		Radical polymerization Low mechanical properties ($G'=400\text{ Pa}$) Gelation after 3 min of UV irradiation	Valmikinathan et al. ⁸⁶

4.2. Hybrid chemical hydrogels

Alternatively, to get better control of the crosslinking density, and maintain the compatibility of the system, native CS or derivatives were crosslinked with functional biocompatible polymers to form hybrid hydrogels (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). Schiff base linkage between amine groups of CS and aldehyde functions of natural polymers allowed the synthesis of highly biodegradable and biocompatible hybrid hydrogels, without the addition of a chemical crosslinking agent. Weng et al. formulated in situ gelling systems from oxidized dextran (Ox-dex) and a *N*-carboxyethyl CS derivative (CECS)^{75, 90} (Table 2). Gel formation was found to be rapid at physiological pH and body temperature (30-600 s). The mechanical properties of the resulting networks could be tuned according by the initial polymer concentration, the ratio of Ox-dex/CEC, the oxidation degree of dextran and the temperature.^{75, 90} With the same idea, to create highly biocompatible and biodegradable hydrogels for cartilage tissue engineering, Tan et al reported hydrogels from water-soluble *N*-succinyl-CS and oxidized hyaluronic acid (Ox-HA).⁹¹ For these hybrid hydrogels, Schiff base formation between the amine and aldehyde groups of polysaccharides resulted in rapid gelation (30 - 600 s) and storage modulus of around 600 Pa (at a concentration of 3 wt% in CS derivative for a ratio $[\text{CHO}]/[\text{NH}_2]$ of 1:1).^{75, 91, 92} Additionally, Weng et al. exploited the disparity of the reaction times between Schiff base formation (30-600 s) and disulfide linkage (20 min) to prepare hydrogels based on thiolated CS (CS-*N*-acetyl-L-cysteine (CS-NAC) conjugate) and Ox-dex.⁹² The Ox-dex/CS-NAC is first crosslinked via Schiff base formation, followed by disulfide bonding. CS-NAC allows the synthesis of hydrogels with a wider range of storage moduli, G' , by varying the thiol concentration.⁹²

Though interesting, this approach suffers from difficulties to quantify accurately the covalent disulfide and imine bonds which limits ability to control the network crosslinking density and thereby, its mechanical properties.

Many studies focused on the development of new crosslinking reactions to form hydrogels with well-defined network structure and improved mechanical properties. In recent years, click chemistry due to its high efficiency, versatility, and selectivity has appeared as a most promising strategy to prepare hydrogels with diverse and complex structures.⁹³⁻⁹⁴ The most frequently click-reactions used to form hydrogels include, the copper catalysed and copper-free alkyne-azide cycloaddition, the Diels-Alder reaction as presented above, and the thiol-ene reaction.

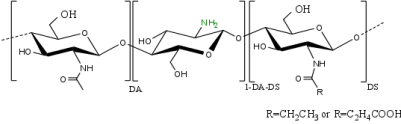
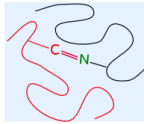
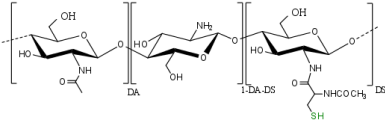
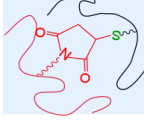
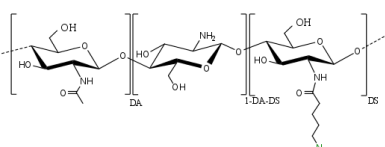
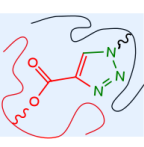
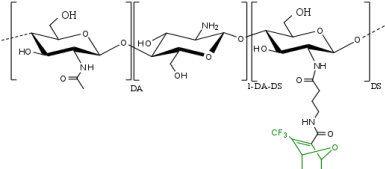
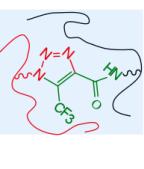
Several studies reported on the functionalization of CS via click chemistry but few work aimed at crosslinking CS via click chemistry to form hydrogels. Click CS hydrogels include networks prepared by thiol-ene reactions,^{76, 95, 96} a copper-free azide-alkyne click reaction,⁹⁷ and the copper-free click reaction based on the triazole ring formation between oxanorbornadiene and azido groups.⁹⁸

Recently, Zhou et al used a thiol-ene Michael addition to prepare hydrogels with high mechanical properties for the repair of severed peripheral nerves.⁹⁶ The hydrogels were synthesized from a water-soluble CS-thiol derivative and a poly(L-lysine)-maleimide conjugate under mild conditions without using any toxic agents or initiators (Table 2). The fast and efficient reaction between maleimide and thiol groups allowed hydrogel formation within 10 s with a storage modulus (G') higher than 2400 Pa ([maleimide]/[thiol] ratio of 1, CS-thiol at 4 wt %, and degree of substitution in maleimide of 0.2).⁹⁶ Similar mechanical properties were obtained for glycol-CS (GC-CS)-based hydrogels prepared by a thiol-ene Michael addition reaction between thiolated GC-CS ((GC-SH)-CS) and a water-soluble oligo(acryloyl carbonate)-*b*-poly(ethylene glycol)-*b*-oligo(acryloyl carbonate) (OAC-PEG-OAC) tri-block copolymer.⁷⁶ It was shown that for a (GC-SH)-CS concentration of 1 wt %, a [SH]/[acrylic] ratio of 1, and a DS of (GC-SH)-CS of 0.14, the storage modulus reached 1,850 Pa. Moreover, storage moduli of 4,300 Pa could be reached by increasing the (GC-SH)-CS to 3 wt % (supp sentence). To get stronger hydrogels with controllable sol-gel transition, the authors combined physical and chemical crosslinking by adding β -GP to the hybrid network.⁹⁹

Truong et al. reported CS click hydrogels with better mechanical properties using a copper-free alkyne-azide cycloaddition to crosslink a water-soluble azide-functionalized CS with a PEG-alkyne derivative (Table 2).⁹⁷ Contrary to the commonly applied copper catalysed alkyne-azide cycloadditions, this reaction does not require elevated temperatures or metal-based catalysts due to the activation of the alkyne by the adjacent electron withdrawing group.⁹⁷ The injectable CS hydrogel exhibited both tunable gelation time

and mechanical properties depending on the temperature of the solution, the degree of substitution of the CS-azide derivative, the [alkyne]/[azide] ratio and the CS-azide concentration. For a 1 wt % solution of CS-azide with a DS of 0.19 and an [alkyne]/[azide] ratio of 0.5, complete gelation was observed after 45 min at 37 °C and the storage modulus (G') reached 44.2 ± 1.2 kPa corresponding to a robust hydrogel.⁹⁷ In addition, with increasing the CS-azide concentration to 3 wt %, the G' value reached 103 kPa. The authors attributed these high mechanical properties to the heterogeneity of the network structure comprising multiple networks able to distribute the mechanical stress across the gel network.⁹⁷ Recently, a hydrogel entirely made of polysaccharides, namely CS and hyaluronic acid, was developed for tissue engineering via a metal-free click reaction.⁹⁸ For this reaction, CS and hyaluronic acid were modified with oxanorboradiene (OB-CS, DS = 0.58) (Table 2) and 11-azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amine (HA-AA, DS = 0.47), respectively. The formation of the network, presented in Table 2, results from the triazole ring formation between oxanorboradiene and azido groups.⁹⁸ Compared to the CS/PEG-based hydrogel developed by Dove et al.⁹⁷ this system exhibits faster gelation at 37 °C (27 min) but lower G' moduli (~ 2 kPa) when polymer solutions are used at a concentration of 2 wt %. All these crosslinking strategies offer the possibility to tailor the hydrogel swelling and the mesh size (i.e mechanical properties), by changing the DS and the concentration of the modified polymers, and/or by changing the ratio between the crosslinkable groups, as a function of the targeted applications.

Table 2: Example of CS derivatives used to form hybrid chemical CS hydrogels and schematic representation of the chemical network.

	Chitosan derivatives	Reaction conditions & crosslinker	Hydrogel network	Key features of the gels	References
Hybrid chitosan hydrogels		$T = 37^{\circ}\text{C}$ water oxidized dextran or oxidized hyaluronic acid ⁹¹		Schiff base formation Low mechanical properties ($G' = 200$ Pa) Gelation time within 60 s	Weng et al. ^{75,90}
		$T = 37^{\circ}\text{C}$ PBS Poly(lysine)-maleimide		Michael addition Modest mechanical properties ($G' = 2,500$ Pa) Rapid gelation within 3 min	Zhou et al. ⁹⁶
		$T = 37^{\circ}\text{C}$ water 3-arm PEG-alkyne		Copper-free azide-alkyne cycloaddition High mechanical properties ($G' > 10,000$ Pa) Gelation time within 45 min	Truong et al. ⁹⁷
		$T = 37^{\circ}\text{C}$ water HA-N ₃ (HA-AA) N ₃		Copper-free diene-alkyne cycloaddition High mechanical properties ($G' > 10,000$ Pa) Gelation time within 27 min	Fan et al. ⁹⁸

5. Interpenetrating Polymer Network (IPN) CS hydrogels

Before describing CS-based IPN hydrogels, we will discuss the structure and potential of these emerging systems.

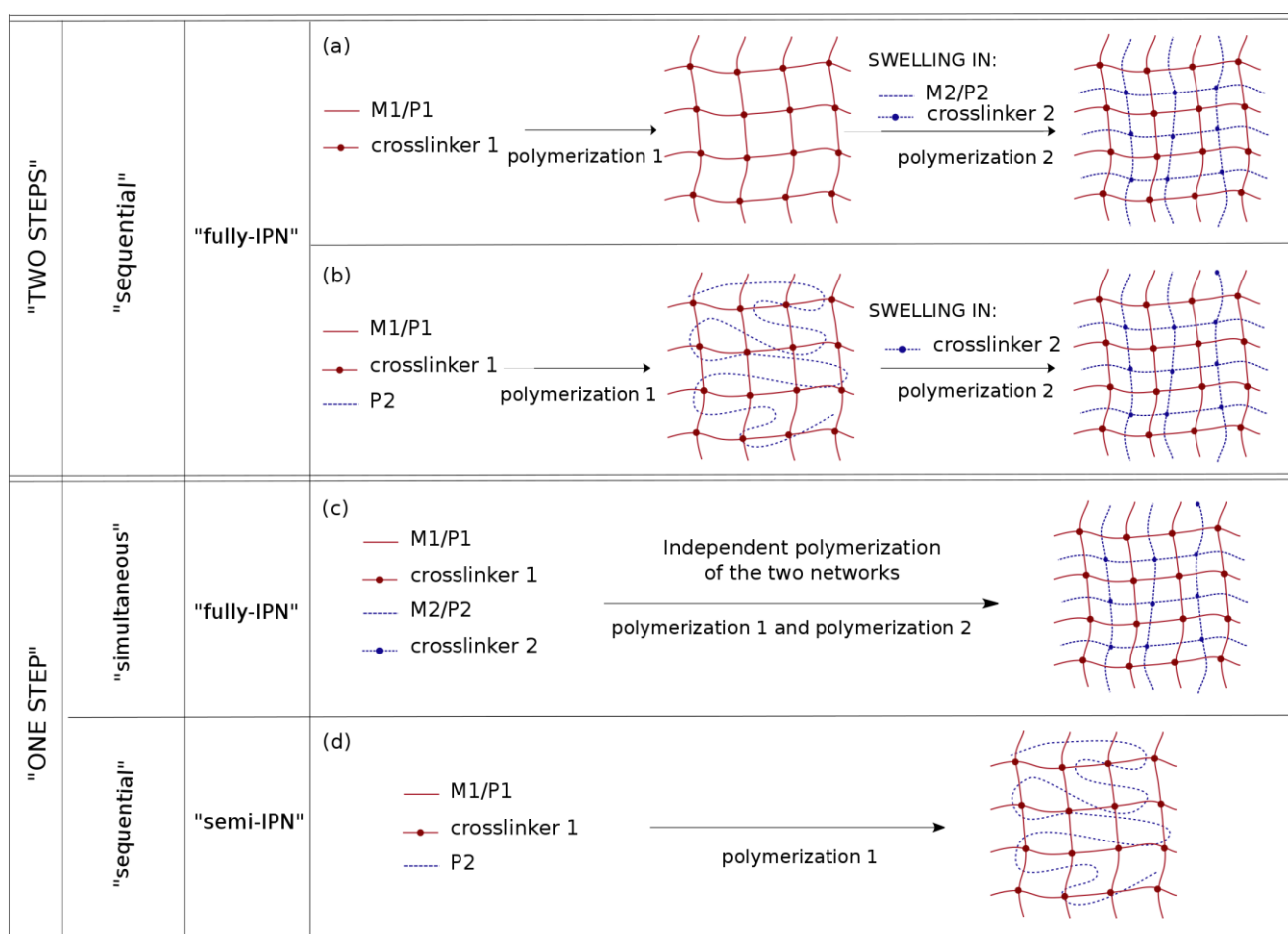
IPN networks are defined as the combination of two or more separately crosslinked networks, composed of two different polymers that do not share covalent bonds. Crosslinking can be either physical or chemical.^{10, 11}

The complex network most often shows physico-chemical properties that can remarkably differ from the single macromolecular network. Its physical properties can be easily tailored by the type of the polymers used, their concentration, their crosslinking density and the type of crosslinking reactions used to form the hydrogels.

IPN hydrogels can be classified according to different settings. One possibility is to classify IPN hydrogels according to the number of preparation steps. Chen et al.¹⁰⁰ distinguished (i) the two-step fabrication, considered as the classical method and the first developed technique and (ii) the one-step preparation (Table 3). In the two-step preparation, the two networks are synthesized sequentially. The process consists in creating a first polymer network with large swelling and then, in immersing it into the solution of the 2nd

precursor (monomer or polymer) (Table 3-(a)). Thanks to large swelling, the second precursor will diffuse and be polymerized/crosslinked into the 1st gel network. Polyelectrolytes are usually used for the synthesis of the first network. This fabrication technique can have some limitations. As it is difficult to control diffusion of the 2nd components (especially in the case where one of the components is a linear polymer) into the first network, hydrogels may have high degree of heterogeneity. Moreover, this technique is time consuming and requires a large excess of the 2nd network components to permit their efficient diffusion into the first network. An alternative to reduce heterogeneity and the amount of 2nd precursor added, is to entrap the second pre-formed polymer into the first network and add a crosslinker to form the 2nd network during the swelling step (Table 3-(b)). If a crosslinker is introduced in the 2nd step, a fully-IPN is formed ¹⁰. In the one-step fabrication process, precursors of the two networks are mixed together and react simultaneously leading to fully-IPN (Table 3-(c)). Semi-IPN, can also be obtained with only one crosslinked network entrapping chains of a 2nd polymer (Table 3-(d)). This one-step technique has the advantages of being simple, rapid, resulting in a homogeneous hydrogel structure. Polymers must be carefully selected to resist to the crosslinking reactions involved to form the two networks.

Table 3 : IPN classification with M corresponding to monomer and P to polymer (adapted with permission from ¹⁰).



Among the polymers that have been used to prepare IPNs, polysaccharides have been of particular interest as they are naturally occurring, abundant renewable source, and they can be chemically modified by crosslinkable groups as developed above for CS.¹¹ There are various possibilities to combine and crosslink CS in IPN hydrogels. CS mixed with synthetic polymers are the most common IPN developed systems.¹⁰¹⁻¹⁰³ More recently, CS has been combined with other biopolymers such as collagen, alginate and gelatin to design promising systems with high biocompatibility.¹⁰⁴⁻¹⁰⁷ These IPN hydrogels, combining natural or synthetic biocompatible polymers, were successfully used for biomedical and pharmaceutical applications to take advantage of synergistic improvement in properties offered by both polymers. Semi- and fully CS IPN hydrogels with improved stimuli responsive behavior, cell biocompatibility and tunable properties have been designed.¹¹

5.1. Semi-IPN CS hydrogels

Various studies have been conducted to develop semi-IPN hydrogels based on CS to obtain materials with pH/temperature sensitivity and controlled degradability for drug delivery applications^{105, 108, 109}. Better antibacterial activity, coupled with high mechanical strength, may also be provided by CS semi-IPN hydrogels for targeted wound dressing applications.^{110, 111} Semi-IPNs have been carried out by crosslinking

CS in the presence of a synthetic polymer^{112, 113} or, more frequently, by crosslinking the synthetic polymer network in the presence of CS^{101, 114-116}

Thermosensitive synthetic polymers that exhibit a temperature-dependent phase transition (Lower Critical Solution Temperature, LCST) have been combined with CS to form thermally responsive IPN hydrogels^{110, 114}. The most extensively used thermosensitive polymer is poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) of which the LCST is near body temperature (32 °C).¹¹⁷ A Semi-IPN based on CS and PNIPAAm was synthesized by free radical polymerization of NIPAAm in the presence of CS to obtain an IPN system combining the thermosensitive properties of PNIPAAm and the pH sensitive properties of CS.¹¹⁸ Besides PNIPAAm, other thermosensitive synthetic polymers such as Pluronic⁶⁷ or poly(dimethyl-aminoethyl methacrylate) (poly(DMAEMA))¹¹⁵ have been mixed with CS to form semi-IPN networks. (sup sentence)

Natural and synthetic polyelectrolytes can also exhibit a sol/gel transition in response to pH changes and have been mixed with CS to form pH-sensitive hydrogels. The sol/gel transition is due to hydrogen bonding or electrostatic repulsions of the polymer chains and is dependent on the pK_a of the ionizable component.¹¹ These pH sensitive polymers affect the swelling or de-swelling of the matrix according to the pH value. Synthetic polymers such as poly(acrylic acid) and poly(methacrylic acid) are most commonly used to fabricate anionic pH sensitive hydrogels,^{101, 119} while poly(DMAEMA) is used for the design of cationic hydrogels.¹¹⁵ Also natural polyelectrolytes such as alginate^{105, 109} or cellulose derivatives¹²⁰ have been used to form pH responsive semi-IPN networks with high compatibility and degradability. CS/alginate semi-IPN hydrogels were designed for drug delivery applications.^{105, 109} Chen et al. developed a pH-sensitive semi-IPN by crosslinking *N,O*-carboxymethyl CS with genipin in the presence of alginate¹⁰⁹. The resulting system, exhibiting swelling dependence on both pH and polymer concentration, according to ionization of carboxylic acid groups, allowed to control the release of the entrapped model protein. Similarly, Yang et al. developed PEGylated carboxymethyl-CS (PEG-CMCS) /alginate semi-IPN hydrogel beads for improved oral protein delivery.¹⁰⁵ The modified CS, entangled into the calcium-crosslinked alginate hydrogel, improved drug loading capacity and pH dependence of swelling, allowing for sustained or accelerated drug delivery as a function of the pH in the body. In this study, the water-soluble CS derivative (PEG-CMCS) was added to the alginate solution before calcium crosslinking. The PEGylated CS contributes to structure densification at the pH of gastric fluid (pH = 1.3), attributed to strong hydrogen bond formation between the protonated carboxyl groups and hydroxyl groups of CMC and alginate, inducing slow protein release.¹⁰⁵ On the other hand, hydrogel degradation in the intestinal fluid (pH = 6.8) and at colonic pH (pH = 7.4) resulted in 90 % of protein release in the final stage of digestion as shown in Figure 14. Such PEG-CMCS/alginate semi-IPN hydrogels thus hold great promise for the design of pH-responsive drug delivery systems.¹⁰⁵

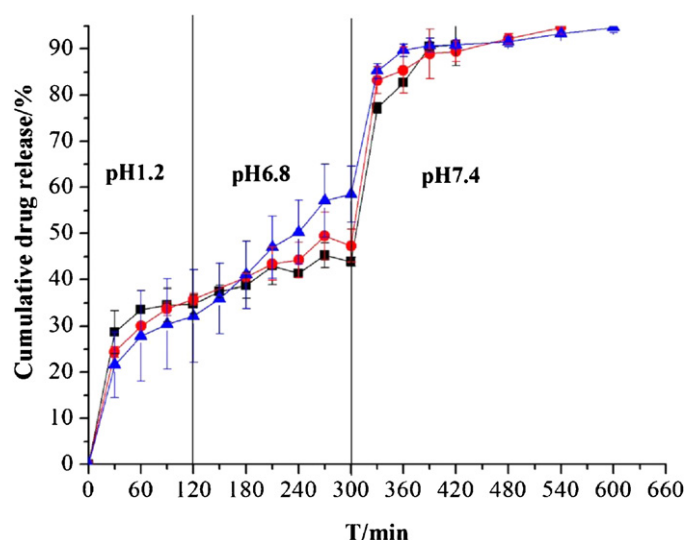


Figure 14: Cumulative release profile of BSA from pH-sensitive hydrogels prepared from CMC/alginate, PEG /CMC/alginate and PEGylated CMC/alginate: CMC/alginate = 0.5/1 (wt %) (square), mPEG/CMC/alginate = 0.5/0.5/1 (wt %) (circle), PEG-CMCS/alginate = 1/1 (wt %) (triangle) (with permission from ¹⁰⁵).

5.2. Fully-IPN CS hydrogels

CS-based fully-IPNs have been less investigated due to their complex structure. Nevertheless, fully-IPNs provide interesting mechanical properties and sophisticated networks for biomedical applications. Some studies reported IPNs composed of gelatin and CS where CS was crosslinked with classic common crosslinkers such as glutaraldehyde or genipin.^{106, 108} CS reinforced the weak mechanical properties of the physically crosslinked gelatin network and prevented its rapid dissolution in aqueous media. An original system, synthesized in a simple one-pot procedure with rapid gelation and without using any initiator or toxic components, was proposed by Truong et al.¹⁰³ The two polymer networks were simultaneously crosslinked via click chemistry (Figure 15). The first network was obtained by crosslinking norbornene-functionalized CS with a linear poly(ethylene glycol) (PEG)-ditetrazine through a Diels-Alder cycloaddition. The second network resulted from a nucleophilic thiol-yne addition reaction between 4-arm PEG-tetraalkyne and a linear PEG-bis(thiol). The first network formed the loose network while the second one form the dense network. The reactions resulted in complete and quick gelation (within 3 min). The IPN hydrogel displayed a 7-fold higher compressive stress (15.56 ± 0.51 MPa) than the simple dense network (2.49 ± 0.77 MPa) and could undergo cyclic compression tests at 95 % compression without hysteresis. High elasticity and compressive stress values make this hydrogel suitable for applications as matrices for the repair of tissues subjected to compressive loading. The two network components play a crucial role in the stabilization and solubility of CS at physiological pH.

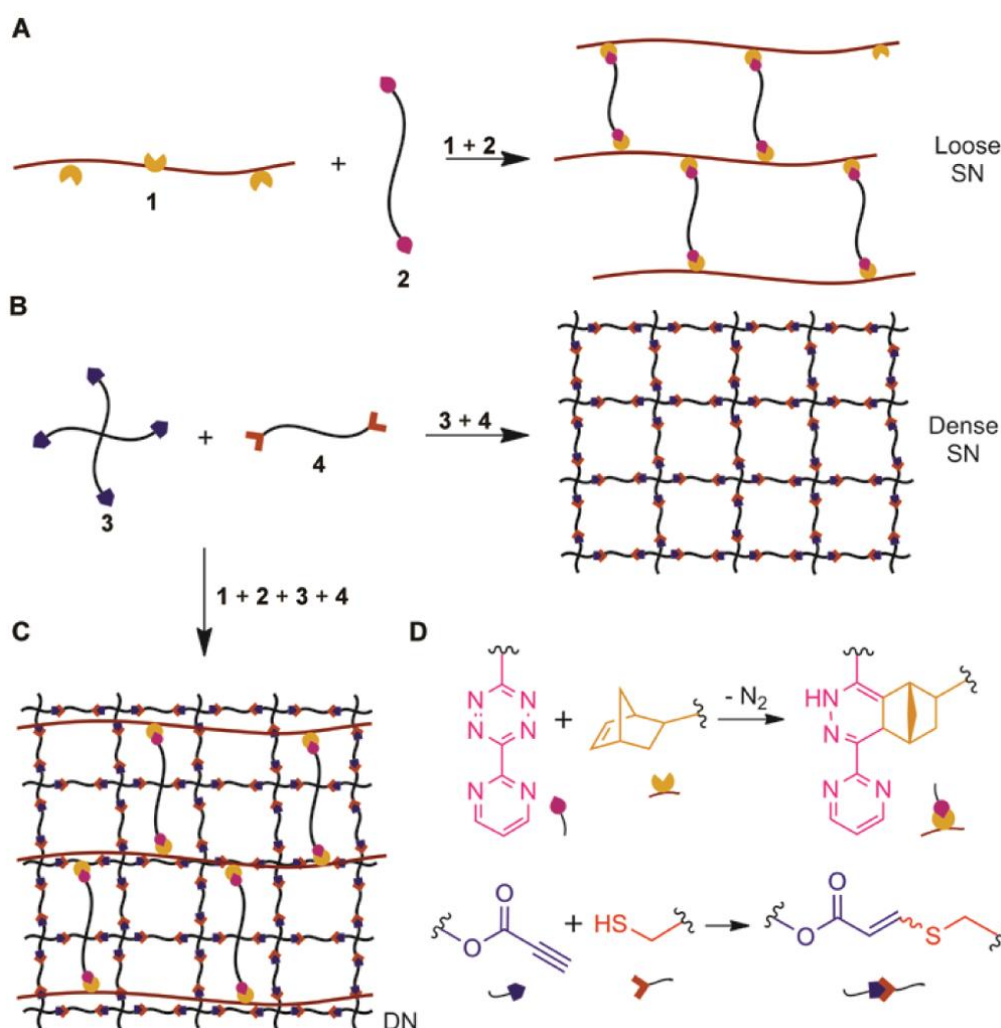


Figure 15 : Synthesis of a fully IPN hydrogel by simultaneously combining two click reactions (A) Loose network formed by norbornene-tetrazine addition (B) Dense network formed by nucleophilic thiol-yne addition (C) DN gel formed by mixing all 4 components (D) Tetrazine-norbornene and nucleophilic thiol-yne addition chemistry used for crosslinking (with permission from ¹⁰³). **1**: Norbornene-functionalized CS; **2**: poly(ethylene glycol) (PEG)-ditetrazine; **3**: 4-arm PEG-tetraalkyne; **4**: PEG-bis(thiol).

5.3. Macroporous CS IPN

In the first part of the review, simple porous hydrogels obtained from native CS were reported. Here, a special part was dedicated to macroporous IPN CS hydrogels. These porous systems have been obtained by cryogelation or freeze-drying process, as previously described.^{101, 102, 114, 121, 122} The IPN structure enhanced the mechanical properties, while the macroporous structure facilitated blood vessels in-growth or diffusion of molecules/particles.^{36, 123}

Dragan et al. designed a macroporous fully-IPN by cryogelation, in a two-step process for controlled drug delivery (Figure 16).¹⁰² The first polymer network was prepared by free radical cryo-polymerization of methacrylic monomers (acrylic acid with acrylamide (AAm) or hydroxymethacrylate (HEMA)) in the presence of a redox initiator at $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 1 day. The resulting hydrogel was washed with water and then freeze-dried. Cryogelation allows to control the pores size, the polymer network being the negative replica of ice crystal.¹⁰² The macroporous structure of this first network allowed rapid sorption of the components of the 2nd network, namely CS and PEG diglycidyl ether (PEGDGE) (Figure 16). While the first network offers pH sensitivity and possibility to control the pores size, and the hydrogel swelling, by changing the comonomer concentration or nature (AAm or HEMA), the second CS-based network leads to a better control of drug release by providing a decrease of the pores size and facilitating the protein release from the IPN.¹⁰²

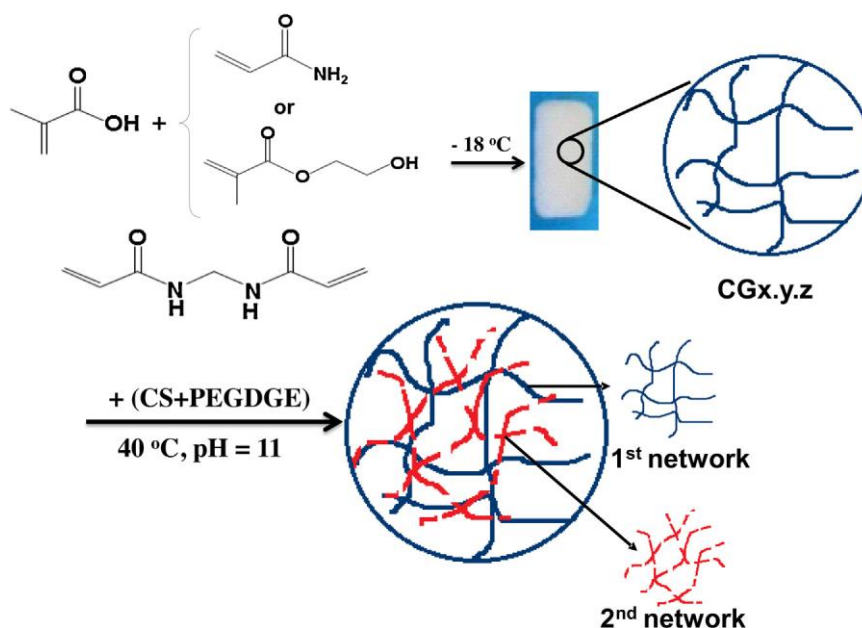


Figure 16 : Schematic representation of macroporous fully-IPN prepared by cryogelation for drug controlled delivery. The first network crosslinked by radical polymerization, consists of acrylic acid and AAm or HEMA. The second network composed by CS and PEGDGE was generated by an amine/epoxy addition (with permission from Dragan,2015 ¹⁰²).

Zhang et al. designed macroporous crosslinked IPNs with antibacterial and hemostatic performance, by the freeze-drying process.¹²² The materials were fabricated by freeze-drying a mixture of CS (or CS-organic rectorite) which demonstrated excellent antibacterial properties and sodium alginate, followed by soaking in CaCl_2 to allow alginate crosslinking. The semi-IPN obtained was washed in distilled water and lyophilized again. The SEM images of the freeze-dried matrix showed dense pores with large size and uniform

distribution. The incorporation of OREC into the crosslinked matrix improved the hemostatic capacity.¹²² Kim et al. adopted a slightly different strategy to prepare highly hydrophilic IPN hydrogels composed of CS and poloxamer.¹¹⁴ A methacrylate grafted poloxamer macromer was synthesized and mixed with an acidic CS solution and a photoinitiator. The hydrogel was then processed under UV irradiation followed by freeze drying and neutralization of CS in aqueous NaOH solution. The Young's modulus of the IPN increased with the addition of crosslinked poloxamer compared to the single CS network.¹¹⁴ The authors considered this spongy-like IPN as a semi-IPN, but the physically crosslinked network formed by CS after its neutralization in NaOH solution could provide a fully-IPN.

6. Nanoparticle–hydrogel Composites

The innovative idea behind the formation of inorganic/organic composites is the design of materials with superior mechanical properties and new biological functions.¹²⁴ The objective of this section is to focus the attention on the synergies resulting from the combination of nanoparticles (NPs) and CS-based hydrogels. The challenge of developing such materials is to obtain a uniform distribution of nanoparticles inside the hydrogel matrix. Three main approaches have been used to engineer homogeneous nanoparticles-hydrogel systems (Figure 17): a) hydrogel formation in a nanoparticle suspension, b) physical incorporation of nanoparticles into the pre-formed hydrogel matrix, and c) crosslinking using nanoparticles to form hydrogels. The widely used and the simplest approach to fabricate homogeneous nanoparticle-CS hydrogel composites lies in the incorporation of pre-formed nanoparticles in the solution, before the gelation step.

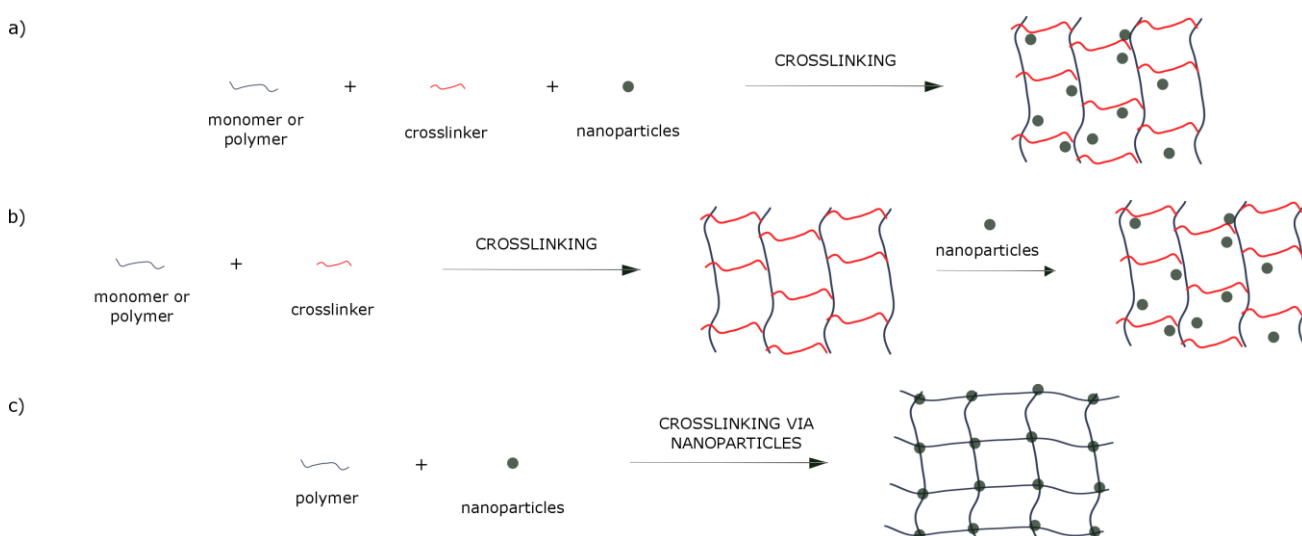


Figure 17 : Three main approaches used to obtain hydrogel-nanoparticle conjugates with uniform distribution: a) hydrogel formation in a nanoparticle suspension, b) physically embedding the nanoparticles into hydrogel matrix after gelation, c) cross-linking using nanoparticles to form hydrogels.

Composite hydrogels loaded with inorganic NPs have been mostly investigated as a strategy for improving the mechanical strength of hydrogel-based materials. This is an alternative strategy to highly crosslinked hydrogels which are generally stiff materials with limited extensibility, poor swelling capability as well as slow molecular diffusion.^{6, 94} Therefore, with the aim to design CS hydrogels with excellent mechanical strength and high elasticity for tissue engineering and drug delivery applications, a large scope of inorganic NPs have been incorporated into hydrogels, such as silica NPs,¹²⁵ metal NPs,^{126, 127} hydroxyapatite (HAp) NPs,^{44, 126, 128} graphene oxide NPs^{129, 130} and clay NPs.¹³¹ Han et al. exploited the multifunctional groups of graphene oxide (GO) NPs to prepare supramolecular hydrogels of CS.¹³⁰ They found that at high GO content, hydrogel showed self-healing properties. Yet, because the material is formed by noncovalent interaction between CS and GO sheets, it has poor mechanical properties. Thus, to overcome this problem, Huang et al. combined self-assembled GO with a chemically crosslinked network based on CS-*graft*-poly(acrylic acid) (CS-*g*-PAA), to design a novel porous hydrogel with enhanced mechanical performance¹³² (Figure 18).

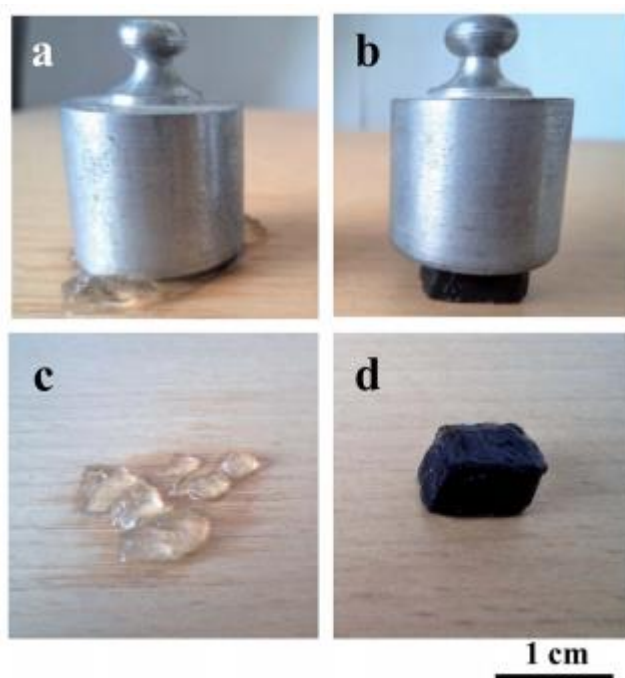


Figure 18: Photographs of pure hydrogel based on CS-*graft*-poly(acrylic acid) (CS-*g*-PAA) (a and c) and composite hydrogel based on graphene oxide (GO) mixed with (CS-*g*-PAA) (b and d) during and after compressed conditions. The weight of load is 100 g (with permission from Huang et al.¹³²).

Besides enhancing the gel mechanical properties, NPs can serve to improve bioactivity of materials. Jayakumar et al. prepared a flexible and microporous CS bandage blended with ZnO NPs.¹²⁷ The CS hydrogel was physically crosslinked by increasing the pH of a CS solution to neutral values and the ZnO NPs were added after gel formation. The composite material was then frozen at -20°C and freeze-dried. The composite bandages showed increased flexibility with increasing of ZnO content from 0.005 wt % to 0.01 wt % and enhanced swelling and antibacterial activity.¹²⁷ In addition to Zn, which also possesses excellent antimicrobial properties, Dhivya et al. added HAp NPs, a mineral component of natural bone, to reinforce CS hydrogels for bone tissue repair applications.¹²⁸ Zn and HAp NPs were added before the formation of CS hydrogels by addition of β -GP. The incorporation of HAp NPs confers to hydrogels higher swelling properties, enabling better probability of cell infiltration. This higher swelling was attributed to the hydrophilicity offered by the –OH groups of HAp NPs. The degradability which ensures the total release of bioactive ingredients was not affected by the presence of HAp NPs. Moreover, with HAp NPs, this injectable hydrogel was found to be osteoconductive, promoting bone healing.

NPs composite hydrogels have also opened novel perspectives to improve the efficacy and safety of the therapeutic treatments. In these systems, consisting of hydrogels in which NPs loaded with drug molecules are embedded, the hydrogel network provides an additional diffusive barrier for drug release, offering potential for the generation of novel drug release profiles.² Different organic nanocarriers such as liposomes, micelles, emulsions, which are widely used as drug delivery systems, have been incorporated into CS hydrogels to take advantage of their drug releasing ability.

Liposomes, the most extensively studied and understood pharmaceutical nanocarriers, have been mostly encapsulated into CS hydrogels.^{8, 133-140} Liposomes are safe vehicles, with the capability of encapsulating a wide range of hydrophilic or hydrophobic drugs, good biocompatibility, low toxicity, lack of immune system activation and targeted delivery of drug to the desire biological site.¹⁴¹ In 2002, Leroux et al. were the first ones to describe encapsulation of liposomes within CS hydrogels.¹³³ They reported liposome encapsulation within physically crosslinked and thermosensitive CS/ β -glycerophosphate hydrogels. Liposome-hydrogels systems demonstrated prolonged hydrophilic drug release within 2 weeks versus 24 h in the absence of liposomes.¹³³ Since 2002, many researches focused on the development of liposome-CS hydrogel systems with a tunable drug release rate according to the physico-chemical properties of liposomes and hydrogels. Among the liposome attributes that can affect the release kinetics, liposomal composition,^{136, 138, 139} vesicle size,¹³⁶ and surface charge^{136, 139} have been studied to control drug delivery over long periods of time. Hydrogel crosslinking density (i.e swelling) is also an investigated parameter which affects the liposome release.¹³⁸ Others nanocarriers, such as microemulsions (ME)¹⁴² were embedded into CS matrix for the sustained release of drugs.

Different strategies are used to investigate the kinetic of release of encapsulated drugs-in-NPs- in hydrogels. Some researches focus on directly measuring the escaped drug from the hydrogel, regardless if the drug is free or still loaded into NPs whereas others were focusing on demonstrating the release of drug still loaded intact NPs. Billard et al. incorporated liposomes into physically crosslinked CS hydrogel with gaseous ammonia.¹⁴⁰ The expected delayed-drug release from this hybrid system was proved using a model water-soluble molecule (carboxyfluorescein, CFR) encapsulated in liposomes. With this model, they are not distinguishing either released CFR is free or still encapsulated into the liposomes. But an interesting comparative study of CFR release between CFR loaded liposomes or CFR directly introduced in the CS solution demonstrated the efficiency of this hybrid system as system for sustain-drug release. Images obtained by fluorescence microscopy and cryo-scanning electron microscopy confirmed the presence of liposomes inside the hydrogels¹⁴⁰. Hurler et al. integrated dye loaded liposomes into GC-CS hydrogels and studied only the release of dye out of liposomes and into the hydrogel.¹³⁶ To do this, and to evaluate the influence of drug lipophilicity on its release kinetic, they synthesized two pH sensitive rhodamine derivatives to be used as dyes model compounds with different lipophilicities. The rhodamine dyes are not fluorescent within liposomes at pH 7.4. However, when the dyes start to diffuse out of the liposomes into the CS hydrogels at pH 4, they become fluorescent. The authors focused their work on liposome characteristics affecting release of rhodamine into CS hydrogels. They demonstrated that the liposome size has a minor effect on the release of dye, whereas the surface charge and dye lipophilicity affect the release to a greater extent. The more hydrophilic dye initially diffuses faster into the CS hydrogel than its less hydrophilic counterpart, and an increased release from negatively charged liposomes is observed. The authors attributed this increased release rate by the destabilisation of the liposomal membrane due to electrostatic interactions between positively charged CS chains and negatively charged liposome membranes.¹³⁶ Alternatively, Ciobanu and co-workers checked if the drug is released in an encapsulated form from their liposome-CS/gelatin hydrogels.¹³⁸ They used calcein, a small fluorescent molecule as drug model, and they differentiated two categories of calcein: i) encapsulated in liposomes which is not spectrophotometrically detectable (concentration in liposomes higher than self-quenching threshold) and ii) free calcein. The amount of loaded calcein is measurable by breaking the liposomes with a surfactant. This interesting drug model permits better understanding of calcein release from complex systems. The *in vitro* release profile of calcein after loading into two types of liposomes (Multilamellar vesicles (MLVs), diameter $\sim 1.2 \mu\text{m}$) and small unilamellar vesicles (SUVs), diameter $\sim 0.112 \mu\text{m}$), dispersed in hydrogels with different types of crosslinking was studied.¹³⁸ The authors demonstrated that intact liposomes are released from hydrogels matrix even after 3 weeks, especially MLV composed of multiple lipid layers. Nevertheless, most of the calcein detected is in a free form and provides from liposome destabilization due to resistance of the network applied from the polymer network and the mesh size.

We can hypothesize that previously described systems, able to release intact liposomes, have a great potential for wound dressing or drug delivery applications, as the drug still encapsulated into the NPs, is protected from the environment and can be vectorised to the biologically targeted organs. Rouini and co-workers prepared radiolabelled liposomes integrated into CS/ β -GP hydrogel.¹³⁹ They investigated the effects of liposome composition (acyl chain length: C14, C16, C18) and surface charges, on their release behaviour from in situ gelling CS/ β -GP. Release studies are performed *in vivo* after using free radiolabelled liposomes or liposomes embedded into CS hydrogels. The authors found that the length of alacyl chains does not impact the release of liposomes. However, a prolonged release is observed when a negatively charged liposome is entrapped into CS hydrogels. This prolonged release is attributed to electrostatic interactions between polymer matrix and phospholipids. Interestingly, they demonstrated that liposomal hydrogel provided sustained dry dosage, not only locally but also systemically.

7. Conclusion

The unique physico-chemical properties of CS offer many ways of processing it in the form of sponges, films, and hydrogel networks with specific features such as injectability, stimuli-responsiveness. The modifications of CS via its amino- or hydroxyl groups and the existence of well-established crosslinking methods have enabled a good control over the mechanical and biological properties of the hydrogel matrices. Advanced click reactions have considerably expanded the design of CS-based hydrogels with tunable mechanical properties and gelation time, opening new routes to *in situ*-forming hydrogels. The high coupling efficiency, bio-orthogonality and mild conditions of these click reactions gave rise to highly biocompatible hydrogels. These various crosslinking strategies and combinations with other biocompatible polymers provided opportunities to design complex systems such as interpenetrating networks (IPN). The latter systems take advantage of different and synergistic effects of CS and the other polymer, resulting in the formation of hydrogels with physico-chemical properties that remarkably differ from the single macromolecular network. The well-developed crosslinking strategies have also enabled the controlled incorporation of inorganic or organic nanoparticles for improving the strength and/or the biological properties of hydrogels. Such composite hydrogels have been proved to be useful for incorporating drugs inside nanoparticles and modulate their release rates.

Taken together, the current advancements in the development of CS hydrogels illustrate their potential for a variety of applications in tissue engineering and drug delivery. Their mechanical and biological properties can be modulated by an appropriate network design and/or by the incorporation of nanoparticles.

References

- 1 R. Langer and D. A. Tirrell, *Nature* **428**:487-492 (2004).
- 2 S. Merino, C. Martín, K. Kostarelos, M. Prato and E. Vázquez, *ACS Nano* **9**:4686-4697 (2015).
- 3 K. Y. Lee and D. J. Mooney, *Chem Rev* **101**:(2001).
- 4 S. Kirchhof, A. M. Goepferich and F. P. Brandl, *Eur J Pharm Biopharm* **95**, Part B:227-238 (2015).
- 5 E. Caló and V. V. Khutoryanskiy, *Eur Polym J* **65**:252-267 (2015).
- 6 A. S. Hoffman, *Adv Drug Deliv Rev* **54**:3-12 (2002).
- 7 F. Brandl, F. Sommer and A. Goepferich, *Biomaterials* **28**:134-146 (2007).
- 8 S. Grijalvo, J. Mayr, R. Eritja and D. D. Diaz, *Biomater Sci* **4**:555-574 (2016).
- 9 X. Jia and K. L. Kiick, *Macromol Biosci* **9**:140-156 (2009).
- 10 E. S. Dragan, *Chem Eng J* **243**:572-590 (2014).
- 11 P. Matricardi, C. Di Meo, T. Coviello, W. E. Hennink and F. Alhaique, *Adv Drug Deliv Rev* **65**:1172-1187 (2013).
- 12 R. Jayakumar, M. Prabakaran, P. T. Sudheesh Kumar, S. V. Nair and H. Tamura, *Biotechnol Adv* **29**:322-337 (2011).
- 13 P. Baldrick, *Regul Toxicol Pharmacol* **56**:290-299 (2010).
- 14 J. Zhang, W. Xia, P. Liu, Q. Cheng, T. Tahirou, W. Gu and B. Li, *Mar Drugs* **8**:1962-1987 (2010).
- 15 M. A. Brown, M. R. Daya and J. A. Worley, *Emerg Med J* **37**:1-7 (2009).
- 16 H. Y. Zhou, L. J. Jiang, P. P. Cao, J. B. Li and X. G. Chen, *Carbohydr Polym* **117**:524-536 (2015).
- 17 F. Ahmadi, Z. Oveisi, M. Samani and Z. Amoozgar, *Res Pharm Sci* **10**:1-16 (2015).
- 18 M. Rodríguez-Vázquez, B. Vega-Ruiz, R. Ramos-Zúñiga, D. A. Saldaña-Koppel and L. F. Quiñones-Olvera, *Biomed Res Int* **2015**:(2015).
- 19 L. Casettari and L. Illum, *J Control Release* **190**:189-200 (2014).
- 20 M. N. V. R. Kumar, R. A. A. Muzzarelli, C. Muzzarelli, H. Sashiwa and A. J. Domb, *Chem Rev* **104**:6017-6084 (2004).
- 21 M. Dash, F. Chiellini, R. M. Ottenbrite and E. Chiellini, *Prog Polym Sci (Oxford)* **36**:981-1014 (2011).
- 22 M. Rinaudo, *Prog Polym Sci (Oxford)* **31**:603-632 (2006).
- 23 A. Montembault, C. Viton and A. Domard, *Biomaterials* **26**:1633-1643 (2005).
- 24 O. E. Philippova, E. V. Volkov, N. L. Sitnikova, A. R. Khokhlov, J. Desbrieres and M. Rinaudo, *Biomacromolecules* **2**:483-490 (2001).
- 25 A. Montembault, C. Viton and A. Domard, *Biomacromolecules* **6**:653-662 (2005).
- 26 A. Fiamingo, A. Montembault, S.-E. Boitard, H. Naemetalla, O. Agbulut, T. Delair, S. P. Campana-Filho, P. Menasché and L. David, *Biomacromolecules* **17**:1662-1672 (2016).
- 27 M. Rinaudo, R. Auzely, C. Vallin and I. Mullagaliev, *Biomacromolecules* **6**:2396-2407 (2005).
- 28 K. Kumar, N. Dhawan, H. Sharma, S. Vaidya and B. Vaidya, *Artif Cells Nanomed Biotechnol* **42**:274-283 (2014).
- 29 N. L. B. M. Yusof, A. Wee, L. Y. Lim and E. Khor, *J Biomed Mater Res A* **66A**:224-232 (2003).
- 30 C. Clasen, T. Wilhelms and W. M. Kulicke, *Biomacromolecules* **7**:3210-3222 (2006).
- 31 S. Grant, H. S. Blair and G. McKay, *Die Makromolekulare Chemie* **190**:2279-2286 (1989).
- 32 K. Tomihata and Y. Ikada, *Biomaterials* **18**:567-575 (1997).

- 33 C. Chatelet, O. Damour and A. Domard, *Biomaterials* **22**:261-268 (2001).
- 34 K. Peh, T. Khan and H. Ch'ng, *J Pharm Pharm Sci* **3**:303-311 (2000).
- 35 N. E. Suyatma, L. Tighzert, A. Copinet and V. Coma, *J Agric Food Chem* **53**:3950-3957 (2005).
- 36 V. I. Lozinsky, I. Y. Galaev, F. M. Plieva, I. N. Savina, H. Jungvid and B. Mattiasson, *Trends Biotechnol* **21**:445-451 (2003).
- 37 T. M. A. Henderson, K. Ladewig, D. N. Haylock, K. M. McLean and A. J. O'Connor, *J Mater Chem B* **1**:2682-2695 (2013).
- 38 F. Khan, M. Tanaka and S. R. Ahmad, *J Mater Chem B* **3**:8224-8249 (2015).
- 39 H. Omidian, C. Gavrilas, W. Han, G. Li and J. G. Rocca, Very-pure superporous hydrogels having outstanding swelling properties. Google Patents (2008).
- 40 S. A. Bencherif, T. M. Braschler and P. Renaud, *J Periodontal Implant Sci* **43**:251-261 (2013).
- 41 F. Quignard, R. Valentin and F. Di Renzo, *New J Chem* **32**:1300-1310 (2008).
- 42 S. V. Madhally and H. W. T. Matthew, *Biomaterials* **20**:(1999).
- 43 T. Ikeda, K. Ikeda, K. Yamamoto, H. Ishizaki, Y. Yoshizawa, K. Yanagiguchi, S. Yamada and Y. Hayashi, *Biomed Res Int* **2014**:8 (2014).
- 44 D. Tsiourvas, A. Sapalidis and T. Papadopoulos, *Mat Today Com* **7**:59-66 (2016).
- 45 B. Yang, X. Li, S. Shi, X. Kong, G. Guo, M. Huang, F. Luo, Y. Wei, X. Zhao and Z. Qian, *Carbohydr Polym* **80**:860-865 (2010).
- 46 E. M. Ivan'kova, I. P. Dobrovolskaya, P. V. Popryadukhin, A. Kryukov, V. E. Yudin and P. Morganti, *Polym Test* **52**:41-45 (2016).
- 47 T. M. Freyman, I. V. Yannas and L. J. Gibson, *Prog Mater Sci* **46**:273-282 (2001).
- 48 S. P. Noel, H. S. Courtney, J. D. Bumgardner and W. O. Haggard, *Clin Orthop Relat Res* **468**:2074-2080 (2010).
- 49 C.-Y. Hsieh, S.-P. Tsai, M.-H. Ho, D.-M. Wang, C.-E. Liu, C.-H. Hsieh, H.-C. Tseng and H.-J. Hsieh, *Carbohydr Polym* **67**:124-132 (2007).
- 50 C. A. García-González, M. Alnaief and I. Smirnova, *Carbohydr Polym* **86**:1425-1438 (2011).
- 51 H. Maleki, L. Durães, C. A. García-González, P. del Gaudio, A. Portugal and M. Mahmoudi, *Adv Colloid Interface Sci* **8**:1-27 (2016)
- 52 K. I. Draget, K. M. Vårum, E. Moen, H. Gynnild and O. Smidsrød, *Biomaterials* **13**:635-638 (1992).
- 53 H. P. Brack, S. A. Tirmizi and W. M. Risen, *Polymer* **38**:2351-2362 (1997).
- 54 M. Chenite, D. Buschmann, D. Wang, C. Chaput and N. Kandani, *Carbohydr Polym* **46**:(2001).
- 55 P. Sacco, M. Borgogna, A. Travan, E. Marsich, S. Paoletti, F. Asaro, M. Grassi and I. Donati, *Biomacromolecules* **15**:3396-3405 (2014).
- 56 P. S. Adusumilli and S. M. Bolton, *Drug Dev Ind Pharm* **17**:1931-1945 (1991).
- 57 M. Lavertu, D. Filion and M. D. Buschmann, *Biomacromolecules* **79**:(2008).
- 58 A. Chenite, C. Chaput, D. Wang, C. Combes, M. D. Buschmann, C. D. Hoemann, J. C. Leroux, B. L. Atkinson, F. Binette and A. Selmani, *Biomaterials* **21**:2155-2161 (2000).
- 59 Y. Luo and Q. Wang, *Int J Biol Macromol* **64**:353-367 (2014).
- 60 Y. Ren, H. Xie, X. Liu, J. Bao, W. Yu and X. Ma, *Int J Biol Macromol* **84**:135-141 (2016).
- 61 M. S. Belluzo, L. F. Medina, A. M. Cortizo and M. S. Cortizo, *Ultrason Sonochem* **30**:1-8 (2016).
- 62 A. I. Suvorova, I. S. Tyukova, T. S. Borisova and L. V. Pletneva, *Vysokomolekularnye Soedineniya SerA SerB SerC - Kratkie Soobshcheniya* **47**:2117 (2005).

- 63 G. Gicheva, D. Paneva, N. Manolova, M. Naydenov and I. Rashkov, *J Bioact Compat Polym* **27**:148-160 (2012).
- 64 E. Guzmán, J. A. Cavallo, R. Chuliá-Jordán, C. Gómez, M. C. Strumia, F. Ortega and R. G. Rubio, *Langmuir* **27**:6836-6845 (2011).
- 65 F. Chellat, M. Tabrizian, S. Dumitriu, E. Chornet, P. Magny, C. H. Rivard and L. Yahia, *J Biomed Mater Res* **51**:107-116 (2000).
- 66 V. F. Sechriest, Y. J. Miao, C. Niyibizi, A. Westerhausen-Larson, H. W. Matthew, C. H. Evans, F. H. Fu and J. K. Suh, *J Biomed Mater Res* **49**:534-541 (2000).
- 67 K. M. Park, S. Y. Lee, Y. K. Joung, J. S. Na, M. C. Lee and K. D. Park, *Acta Biomater Acta Biomaterialia* **5**:1956-1965 (2009).
- 68 R. Auzely-Velty and C. Creuzet, Procédé de préparation de dérivés (poly(oxyde d'éthylène) poly(oxyde de propylène)) thermosensibles utiles pour fonctionnaliser le chitosane. WO2009034130 A1 Patent (2009).
- 69 N. Bhattarai, H. R. Ramay, J. Gunn, F. A. Matsen and M. Zhang, *J Control Release* **103**:609-624 (2005).
- 70 R. Auzély-Velty and M. Rinaudo, *Macromolecules* **35**:7955-7962 (2002).
- 71 A. Charlot, R. Auzély-Velty and M. Rinaudo, *J Phys Chem B* **107**:8248-8254 (2003).
- 72 M. V. Rekharsky and Y. Inoue, *Chem Rev* **98**:1875-1918 (1998).
- 73 A. Semenov, A. Charlot, R. Auzély-Velty and M. Rinaudo, *Rheol Acta* **46**:541-568 (2007).
- 74 A. Charlot and R. Auzély-Velty, *Macromolecules* **40**:9555-9563 (2007).
- 75 L. Weng, X. Chen and W. Chen, *Biomacromolecules* **8**:1109-1115 (2007).
- 76 Y. Yu, C. Deng, F. Meng, Q. Shi, J. Feijen and Z. Zhong, *J Biomed Mater Res A* **99 A**:316-326 (2011).
- 77 H.-W. Leung, *Ecotoxicol Environ Saf* **49**:26-39 (2001).
- 78 H. W. Sung, R. N. Huang, L. L. H. Huang and C. C. Tsai, *J Biomater Sci Polym Ed* **10**:63-78 (1999).
- 79 R. A. A. Muzzarelli, *Carbohydr Polym* **77**:1-9 (2009).
- 80 L.-P. Yan, Y.-J. Wang, L. Ren, G. Wu, S. G. Caridade, J.-B. Fan, L.-Y. Wang, P.-H. Ji, J. M. Oliveira, J. T. Oliveira, J. F. Mano and R. L. Reis, *J Biomed Mater Res A* **95A**:465-475 (2010).
- 81 Z. M. Wu, X. G. Zhang, C. Zheng, C. X. Li, S. M. Zhang, R. N. Dong and D. M. Yu, *Eur J Pharm Sci* **37**:198-206 (2009).
- 82 M. Montiel-Herrera, A. Gandini, F. M. Goycoolea, N. E. Jacobsen, J. Lizardi-Mendoza, M. T. Recillas-Mota and W. M. Argüelles-Monal, *Iran Polym J* **24**:349-357 (2015).
- 83 H. C. Kolb, M. G. Finn and K. B. Sharpless, *Angew Chem Int Ed Engl* **40**:2004-2021 (2001).
- 84 R. F. Pereira and P. J. Bártolo, *J Appl Polym Sci* **132**:n/a-n/a (2015).
- 85 A. D. Rouillard, C. M. Berglund, J. Y. Lee, W. J. Polacheck, Y. Tsui, L. J. Bonassar and B. J. Kirby, *Tissue Eng Part C Methods* **17**:173-179 (2011).
- 86 C. M. Valmikinathan, V. J. Mukhatyar, A. Jain, L. Karumbaiah, M. Dasari and R. V. Bellamkonda, *Soft Matter* **8**:1964-1976 (2012).
- 87 Y. Zhou, G. Ma, S. Shi, D. Yang and J. Nie, *Int J Biol Macromol* **48**:408-413 (2011).
- 88 B. Li, L. Wang, F. Xu, X. Gang, U. Demirci, D. Wei, Y. Li, Y. Feng, D. Jia and Y. Zhou, *Acta Biomater* **22**:59-69 (2015).
- 89 J. Hu, Y. Hou, H. Park, B. Choi, S. Hou, A. Chung and M. Lee, *Acta Biomater* **8**:1730-1738 (2012).
- 90 L. Weng, A. Romanov, J. Rooney and W. Chen, *Biomaterials* **29**:3905-3913 (2008).
- 91 H. Tan, C. R. Chu, K. A. Payne and K. G. Marra, *Biomaterials* **30**:2499-2506 (2009).
- 92 H. Zhang, A. Qadeer and W. Chen, *Biomacromolecules* **12**:1428-1437 (2011).

- 93 Y. Jiang, J. Chen, C. Deng, E. J. Suuronen and Z. Zhong, *Biomaterials* **35**:4969-4985 (2014).
- 94 H. K. Lau and K. L. Kiick, *Biomacromolecules* **16**:28-42 (2015).
- 95 C. Chen, L. Wang, L. Deng, R. Hu and A. Dong, *J Biomed Mater Res A* **101 A**:684-693 (2013).
- 96 Y. Zhou, J. Zhao, X. Sun, S. Li, X. Hou and X. Yuan, *Biomacromolecules* **17**:622-630 (2016).
- 97 V. X. Truong, M. P. Ablett, H. T. J. Gilbert, J. Bowen, S. M. Richardson, J. A. Hoyland and A. P. Dove, *Biomater Sci* **2**:167-175 (2014).
- 98 M. Fan, Y. Ma, J. Mao, Z. Zhang and H. Tan, *Acta Biomater* **20**:60-68 (2015).
- 99 W. Zhao, L. Yu, X. Zhong, Y. Zhang and J. Sun, *J Macromol Sci B* **34**:231-237 (1995).
- 100 Q. Chen, H. Chen, L. Zhu and J. Zheng, *J Mat Chem B* **3**:3654-3676 (2015).
- 101 E. S. Dragan, M. M. Lazar, M. V. Dinu and F. Doroftei, *Chemical Engineering Journal* **204–206**:198-209 (2012).
- 102 E. S. Dragan, A. I. Cocarta and M. Gierszewska, *Colloids Surf B Biointerfaces* **139**:33-41 (2016).
- 103 V. X. Truong, M. P. Ablett, S. M. Richardson, J. A. Hoyland and A. P. Dove, *JACS* **137**:1618-1622 (2015).
- 104 L. Cui, J. Jia, Y. Guo, Y. Liu and P. Zhu, *Carbohydr Polym* **99**:31-38 (2014).
- 105 J. Yang, J. Chen, D. Pan, Y. Wan and Z. Wang, *Carbohydr Polym* **92**:719-725 (2013).
- 106 X. Huang, Y. Zhang, X. Zhang, L. Xu, X. Chen and S. Wei, *Mater Sci Eng C* **33**:4816-4824 (2013).
- 107 L. Ma, C. Gao, Z. Mao, J. Zhou, J. Shen, X. Hu and C. Han, *Biomaterials* **24**:4833-4841 (2003).
- 108 A. Al-Kahtani Ahmed, H. S. Bhojya Naik and B. S. Sherigara, *Carbohydr Res* **344**:699-706 (2009).
- 109 S. C. Chen, Y. C. Wu, F. L. Mi, Y. H. Lin, L. C. Yu and H. W. Sung, *J Control Release* **96**:285-300 (2004).
- 110 I. Y. Kim, M. K. Yoo, J. H. Seo, S. S. Park, H. S. Na, H. C. Lee, S. K. Kim and C. S. Cho, *Int J Pharm* **341**:35-43 (2007).
- 111 X. Meng, F. Tian, J. Yang, C.-N. He, N. Xing and F. Li, *J Mater Sci Mater Med* **21**:1751-1759 (2010).
- 112 S. Chen, M. Liu, S. Jin and Y. Chen, *J Appl Polym Sci* **98**:1720-1726 (2005).
- 113 N. Rodkate, U. Wichai, B. Boontha and M. Rutnakornpituk, *Carbohydr Polym* **81**:617-625 (2010).
- 114 I.-Y. Kim, M.-K. Yoo, B.-C. Kim, S.-K. Kim, H.-C. Lee and C.-S. Cho, *Int J Biol Macromol* **38**:51-58 (2006).
- 115 B. Guo, J. Yuan, L. Yao and Q. Gao, *Colloid Polym Sci* **285**:665-671 (2007).
- 116 I. M. El-Sherbiny, R. J. Lins, E. M. Abdel-Bary and D. R. K. Harding, *Eur Polym J* **41**:2584-2591 (2005).
- 117 L. Klouda and A. G. Mikos, *Eur J Pharm Biopharm* **68**:34-45 (2008).
- 118 M. Fernández-Gutiérrez, S. Fusco, L. Mayol, J. San Román, A. Borzacchiello and L. Ambrosio, *J Mater Sci Mater Med* **27**:1-8 (2016).
- 119 L. Yin, L. Fei, F. Cui, C. Tang and C. Yin, *Biomaterials* **28**:1258-1266 (2007).
- 120 C. Alvarez-Lorenzo, B. Blanco-Fernandez, A. M. Puga and A. Concheiro, *Adv Drug Deliv Rev* **65**:1148-1171 (2013).
- 121 E. Jain, A. Damania, A. K. Shakya, A. Kumar, S. K. Sarin and A. Kumar, *Colloids Surf B Biointerfaces* **136**:761-771 (2015).
- 122 H. Zhang, X. Lv, X. Zhang, H. Wang, H. Deng, Y. Li, X. Xu, R. Huang and X. Li, *RSC Adv* **5**:50523-50531 (2015).

- 123 Z. Jingjing, W. Justin, Z. Hui, L. Jianhao, G. Zigang and Z. Xuenong, *Biomed Mat* **11**:035014 (2016).
- 124 S. Utech and A. R. Boccaccini, *J Mat Sci* **51**:271-310 (2016).
- 125 J. Lewandowska-Łańcucka, S. Fiejdasz, L. Rodzik, M. Koziel and M. Nowakowska, *Biomed Mat (Bristol)* **10**:(2015).
- 126 A. Tripathi, S. Saravanan, S. Pattnaik, A. Moorthi, N. C. Partridge and N. Selvamurugan, *Int J Biol Macromol* **50**:(2012).
- 127 P. T. Sudheesh Kumar, V.-K. Lakshmanan, T. V. Anilkumar, C. Ramya, P. Reshmi, A. G. Unnikrishnan, S. V. Nair and R. Jayakumar, *ACS Appl Mater Interfaces* **4**:2618-2629 (2012).
- 128 S. Dhivya, S. Saravanan, T. P. Sastry and N. Selvamurugan, *J Nanobiotechnology* **13**:1-13 (2015).
- 129 X. Yang, Y. Tu, L. Li, S. Shang and X.-m. Tao, *ACS Appl Mater Interfaces* **2**:1707-1713 (2010).
- 130 D. Han and L. Yan, *ACS Sustain Chem Eng* **2**:296-300 (2014).
- 131 A. El Kadib and M. Bousmina, *Chem Eur J* **18**:8264-8277 (2012).
- 132 Y. Huang, M. Zeng, Z. Feng, D. Yin, Q. Xu and L. Fan, *RSC Advances* **6**:3561-3570 (2016).
- 133 E. Ruel-Gariépy, G. Leclair, P. Hildgen, A. Gupta and J. C. Leroux, *J Control Release* **82**:373-383 (2002).
- 134 S. Mourtas, S. Fotopoulou, S. Duraj, V. Sfika, C. Tsakiroglou and S. G. Antimisariis, *Colloids Surf B Biointerfaces* **55**:212-221 (2007).
- 135 J.-H. Lee, H. Oh, U. Baxa, S. R. Raghavan and R. Blumenthal, *Biomacromolecules* **13**:3388-3394 (2012).
- 136 J. Hurler, S. Žakelj, J. Mravljak, S. Pajk, A. Kristl, R. Schubert and N. Škalko-Basnet, *Int J of Pharm* **456**:49-57 (2013).
- 137 W. Gao, D. Vecchio, J. Li, J. Zhu, Q. Zhang, V. Fu, J. Li, S. Thamphiwatana, D. Lu and L. Zhang, *ACS Nano* **8**:2900-2907 (2014).
- 138 B. C. Ciobanu, A. N. Cadinoiu, M. Popa, J. Desbrières and C. A. Peptu, *Mater Sci Eng C* **43**:383-391 (2014).
- 139 A. Alinaghi, M. R. Rouini, F. Johari Daha and H. R. Moghimi, *Intern J Pharm* **459**:30-39 (2014).
- 140 A. Billard, L. Pourchet, S. Malaise, P. Alcouffe, A. Montembault and C. Ladaviere, *Carbohydr Polym* **115**:651-657 (2015).
- 141 C. Chen, D. Han, C. Cai and X. Tang, *J Control Release* **142**:299-311 (2010).
- 142 K. Delmar and H. Bianco-Peled, *Carbohydr Polym* **136**:570-580 (2016).

1.3.3.3 Les hydrogels « clics »

Nous avons choisi d'utiliser la chimie clic pour mettre en forme les hydrogels à partir des polysaccharides sélectionnés. Plus précisément, la chimie clic thiol-ène, ainsi que la chimie thiol-yne, moins étudiée, ont été utilisées. Ces 2 réactions sont présentées dans les paragraphes suivants.

Etat de l'art : les hydrogels réticulés par chimie clic

Durant les 10 dernières années, différentes stratégies de réticulation ont été étudiées pour former des hydrogels pour les applications de « drug delivery ». Les hydrogels physiques réticulés par interactions ioniques ou interactions hydrophiles/hydrophobes, présentent une excellente biocompatibilité mais possèdent des propriétés mécaniques limitées et une faible stabilité sur le long terme, qui rendent difficile le contrôle de la libération d'un principe actif encapsulé [10]. Contrairement aux gels physiques, les gels chimiques présentent une excellente stabilité et de meilleures propriétés mécaniques mais requièrent généralement la présence d'enzyme ou d'initiateurs potentiellement toxiques pour initier la réaction de réticulation. Récemment, les hydrogels réticulés par chimie clic se sont développés, présentant de nombreux avantages, comme celui de pouvoir être préparés facilement, rapidement, dans des conditions douces et avec des propriétés mécaniques adaptées (modules d'Young élevés) et modulables. Ces hydrogels, très prometteurs, ont un fort potentiel pour être utilisés comme plateforme de délivrance contrôlée de principes actifs.

Le concept de chimie clic a été introduit en 2001 par Barry Sharpless [46]. Il regroupe les réactions chimiques conduisant à la formation de nouveaux produits en liant de petites unités élémentaires par la formation de liaison hétéroatomiques (C-X-C). Les critères que doivent respecter une réaction pour être qualifiée de chimie clic selon K. B. Sharpless sont résumés Figure 1-19. Ces réactions doivent notamment avoir de hauts rendements et présenter des conditions de réaction simple [46]. Plusieurs classes de réactions chimiques remplissent ces critères et sont considérées comme réactions de chimie clic, comme la cycloaddition alcyne-azoture (addition 1,3-dipolaire) catalysée au cuivre, décrite par Sharpless en 2002. C'est la chimie clic la plus populaire et la plus largement utilisée en bioconjugaison, car la réaction se fait rapidement avec un rendement élevé et une excellente régiosélectivité et bioorthogonalité [47]. Néanmoins, l'utilisation de catalyseurs toxiques comme le cuivre reste un frein à l'utilisation de cette réaction pour des applications biomédicales. D'autres réactions ne nécessitant pas l'utilisation de catalyseurs potentiellement toxiques ont été étudiées, comme les cycloadditions contraintes alcyne-azoture pour lesquelles il a été démontré qu'un cyclooctyne pouvait réagir très rapidement avec un azoture (SPAAC = « strain-promoted azide-alkyne cycloaddition »), les cycloadditions de Diels-Alder, certaines substitutions nucléophiles (ouverture d'hétérocycles électrophiles), additions nucléophiles sur

simples ou doubles liaisons C-C (époxylation, dihydroxylation, aziridination, additions de Michael, photopolymérisation) ou réaction radicalaire thiol-ène [47] [48].

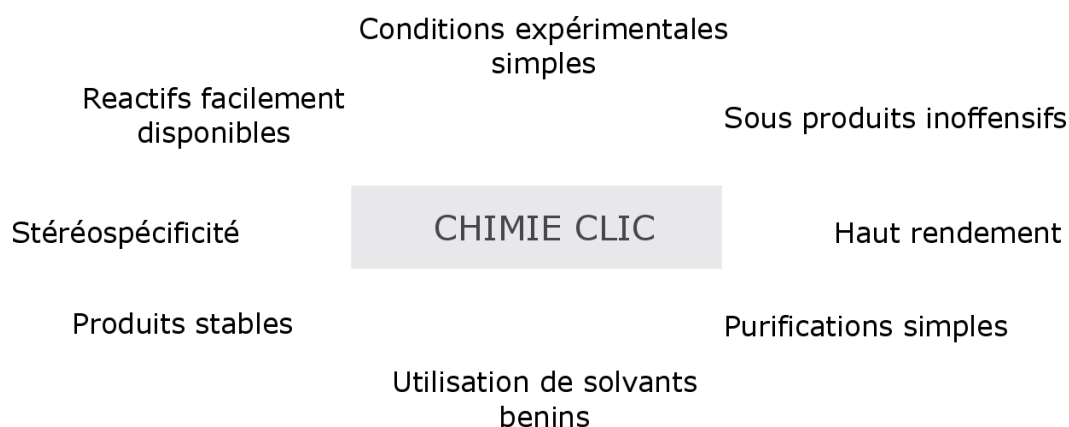
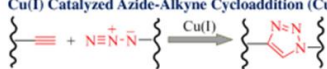
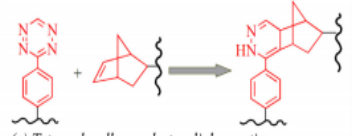
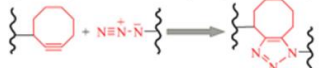
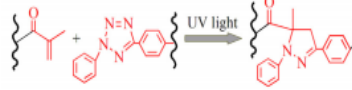
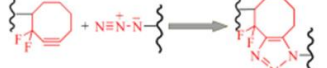
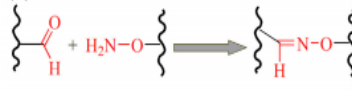
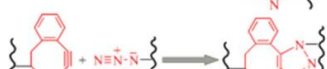
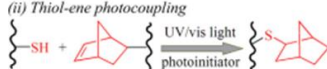
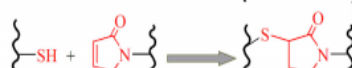
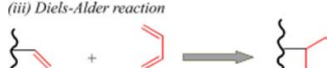
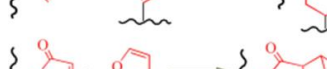
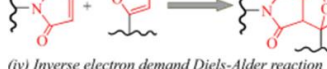
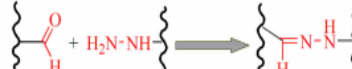


Figure 1-19: Critères définissant une réaction de chimie clic [46].

Depuis le premier hydrogel « clic » décrit en 2006 par Hilborn et al, formé par du PVA-alcyne et du PEG azoture catalysé au sulfate de cuivre [49], beaucoup de travaux de recherche dans le domaine de la santé se sont portés sur la réticulation d'hydrogels par chimies clics ou pseudo clics. Le **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** ci-dessous est une synthèse des différentes chimies clic utilisées pour former des hydrogels. Le PEG ainsi que les polysaccharides, facilement fonctionnalisables, ont été largement utilisés pour préparer ce type de gel. La réticulation par réaction azoture-alcyne catalysée au cuivre a été la plus largement utilisée [50] [51]. Bien que ces hydrogels possèdent des propriétés intéressantes, le cuivre, catalyseur toxique utilisé dans cette réaction, est difficile à éliminer et limite donc les applications *in vivo* de ces gels.

Tableau 1-1 : Résumé des chimies clics utilisées pour mettre en forme des hydrogels [47].

Click Reactions	Features		
Cu(I) Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition (CuAAC) 	✓ bioorthogonality ✗ toxic copper catalyst		✓ no catalyst ✓ fast gelation ✗ N₂ as a byproduct
Copper-Free Click Reaction (i) Strain-promoted azide-alkyne cycloaddition (SPAAC) 	✓ no catalyst ✓ bioorthogonality ✗ difficult synthesis of cyclooctynes		✓ no catalyst ✓ spatiotemporal control ✓ fast gelation ✗ N₂ as a byproduct
			✓ no toxic catalyst ✗ cross-reactivity with amines
		Pseudo-Click Reaction (i) Thiol-Michael addition 	✓ no toxic catalyst ✗ cross-reactivity with thiols ✗ easy oxidation
(ii) Thiol-ene photocoupling 	✓ spatiotemporal control ✓ fast gelation ✗ potential toxicity from photoinitiators and radicals ✗ cross-reactivity with thiols		
	✓ no catalyst ✓ accelerated by H₂O ✓ thermoreversible ✗ slow gelation		
(iii) Diels-Alder reaction 			(R = H, CH₃)
		(ii) Aldehyde-hydrazide coupling 	✓ no toxic catalyst ✗ cross-reactivity with amines
(iv) Inverse electron demand Diels-Alder reaction 			

Récemment de nouvelles réactions clics ne nécessitant pas de catalyseurs ont permis de former des hydrogels avec d'excellentes propriétés mécaniques. Ito et al. ont ainsi préparé des hydrogels d'acide hyaluronique (HA) par SPAAC, à partir de HA-azoture et HA-cyclooctyne [52]. La réaction se fait sans catalyseur dans des conditions physiologiques et le gel formé présente une excellente biocompatibilité après avoir été implanté en sous cutané. Le principal inconvénient de cette réaction SPAAC est qu'elle nécessite des cyclooctynes dont la synthèse comprend plus de 10 étapes, ce qui limite donc son utilisation à grande échelle.

Les réactions de Diels-Alder (DA), réversibles à haute température via la réaction de rétro Diels-Alder, offrent la possibilité de fabriquer des gels dont la libération de principe actif dépend d'un stimulus extérieur, la température. Koheler et al. utilisent cette réaction de DA réversible pour libérer des peptides, covalentement attachés au PEG, par simple augmentation de la température [26]. Ce système déjà décrit paragraphe 1.2.3 a également toute sa place ici puisque la réaction utilisée pour réticuler le PEG est une réaction thiol-maléimide, considérée comme étant une réaction pseudo- clic, car non biorthogonale. Le schéma descriptif du gel est présenté Figure 1-20. A 37°C, 40% de la drogue est libérée alors qu'en augmentant la température jusqu'à 80°C, la totalité du PA est libéré. Des hydrogels ont été également réticulés directement par réaction de Diels-Alder. Shoichet et al. ont rapporté la fabrication d'hydrogels

innovants à partir de HA (acide hyaluronique)-furane et de PEG bis maléimide [52, 53]. La porosité et les propriétés mécaniques de ces gels sont ajustables en fonction de la concentration en HA et du degré de substitution en furane. Le module de cisaillement varie entre 275 Pa et 680 Pa en fonction de la concentration en polymère et/ou du degré de substitution en furane. Néanmoins, l'inconvénient de la réaction de Diels Alder est qu'elle conduit à des hydrogels avec de faibles propriétés mécaniques (module d'Young < 700 Pa) avec des temps de gélification élevés (> 60 min) [52, 53].

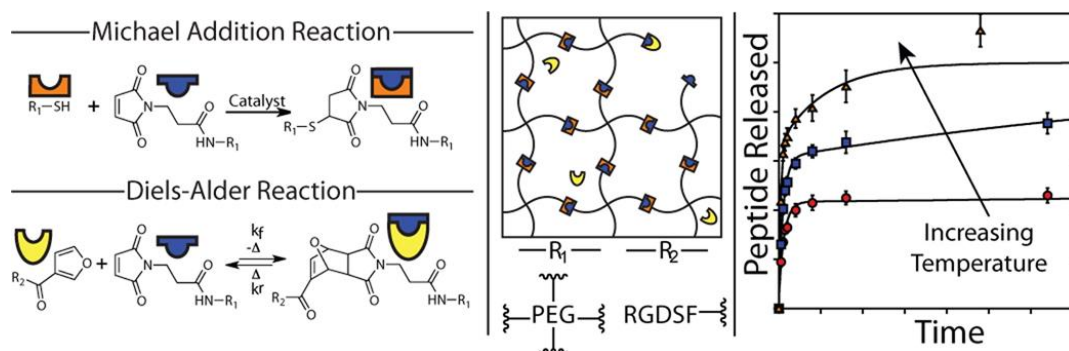


Figure 1-20 : Schéma descriptif des gels de PEG. Le gel est formé par addition de Michael entre un PEG-SH et un PEG-maléimide. Le PEG-maléimide est mis en excès pour que la drogue puisse être covalamment attachée au réseau hydrogel via la réaction de Diels-Alder. Pour étudier le mécanisme de libération, un peptide-furane fluorescent est utilisé comme modèle. Différents profils de libération sont obtenus en fonction de la température [26].

Parmi les réactions clics, la réaction photo- clic thiol-ène, spatialement et temporellement contrôlable, est aussi utilisée pour former des gels. Les propriétés mécaniques des gels réticulés avec cette réaction sont supérieures à celles des gels obtenus avec la réaction de Diels-Alder. Lee et al. ont fabriqué des gels de CMC/PEG sensible au pH par réaction photo- clic thiol-norbornène (NB) [45]. Le schéma représentatif du gel est présenté Figure 1-21. Le tétra-PEG et la CMC ont été préalablement fonctionnalisés avec un groupement norbornène et thiol, respectivement. Les gels formés présentent une augmentation du module de cisaillement (≈ 600 Pa à ≈ 3000) et une diminution du taux de gonflement (de ≈ 60 à 32) lorsque la quantité en CMC-SH augmente. Des études de libération d'une protéine, la BSA, ont été menées à différents pH et taux de réticulation du gel (i.e quantité de CMC-SH). Les résultats montrent que dans des conditions de pH acides (pH=4), le « burst release » est réduit ce qui est justifié par le faible taux de gonflement du gel CMC/PEG (groupements acides protonnés). L'augmentation de la quantité de CMC-SH dans le réseau espace les chaînes de PEG et conduit ainsi à une augmentation du taux de gonflement et à une libération plus rapide de la protéine modèle [45].

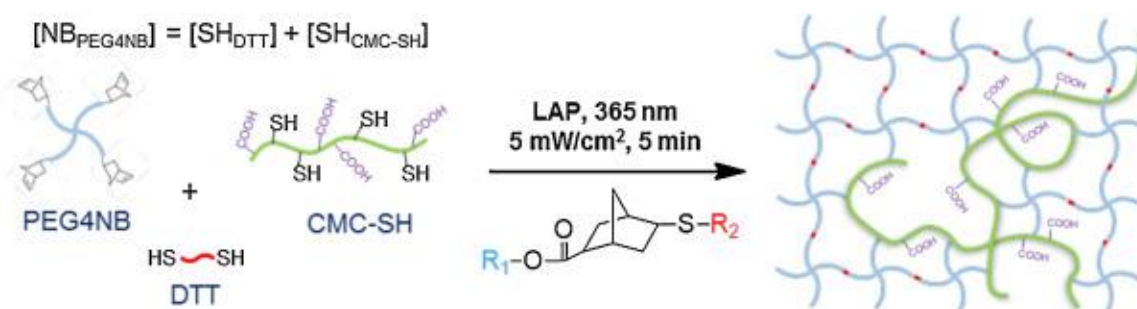


Figure 1-21 : Représentation schématique du réseau hydrogel CMC/PEG réticulé par réaction photo clic thiol-norbornène. Le DTT est ajouté pour égaliser le rapport stoechiométrique [norbornène]/[thiol]. Le LAP (arylphosphinate de lithium) est utilisé comme photo-amorceur [45].

Selon la même stratégie, l'équipe SMP du CERMAV développe depuis 2012 des hydrogels de HA/PEG réticulés par photo-polymérisation thiol-ène. Plus de détails sur les mécanismes de cette réaction seront donnés dans la section qui suit. Le gel est formé à partir de HA-penténoate et de PEG-bis(thiol) [54]. La réaction thiol-ène permet de former un gel en moins de 5 min avec d'excellentes propriétés mécaniques (jusqu'à 20 kPa). Ces propriétés dépendent de la concentration en HA, de son degré de substitution en groupement penténoate et de la quantité d'agent réticulant ajouté à la formulation.

La chimie clic thiol-ène

La chimie thiol-ène est la réaction d'une molécule ou d'un macromère contenant un alcène avec une autre, contenant un thiol. Cette réaction est fréquemment utilisée pour réticuler des chaînes de polymères et former des hydrogels pour des applications biomédicales, car elle se fait dans des conditions douces (température ambiante, solutions tampons), elle est rapide et non toxique pour les cellules et autres molécules biologiques [55].

Il existe 2 mécanismes de réaction différents associés à la chimie thiol-ène : la réaction thiol-ène radicalaire et l'addition de Michael (Figure 1-22). Selon les réactifs utilisés et les conditions réactionnelles, c'est l'un ou l'autre des mécanismes qui l'emporte [55]. L'addition de Michael est réalisée à température ambiante, en solution aqueuse. Généralement, pour que l'addition se fasse, une base est nécessaire pour arracher l'hydrogène au thiol et ainsi créer un anion thiolate nucléophile. Le thiolate attaque ensuite le site électrophile de l'alcène et crée un intermédiaire qui fini par arracher le proton de la base (BH^+), créant le produit de l'addition de Michael et régénérant la base. Cette réaction peut aussi se faire sans catalyseur basique (Figure 1-22a). Dans ce cas, l'alcène électrophile est généralement un groupement acrylate, maléimide ou vinyl sulfone [47]. Cette réaction, pouvant se faire sans initiateur et sans UVs, est très prometteuse pour le développement d'hydrogels pour des applications de « drug delivery » [56]. Cette réaction est qualifiée de pseudo- clic, car elle ne remplit pas tous les critères d'une chimie clic. Elle est

notamment relativement lente. De plus, elle n'est pas orthogonale car les groupements thiols sont très réactifs [47].

La réaction thiol-ène radicalaire se fait plus rapidement que l'addition de Michael, et offre une plus grande densité et uniformité de réticulation. Elle a l'avantage de pouvoir être contrôlée temporellement et spatialement [27]. La réaction se fait en milieu aqueux et la présence d'un initiateur est nécessaire pour générer le premier radical thiyl. Cet initiateur peut être activé par une source de lumière, une source de chaleur ou bien une réaction d'oxydo-réduction [27]. Après l'étape d'initiation, le radical généré attaque le thiol, pour former un radical thiyl. Ce radical thiyl réagit avec la double liaison C=C de l'alcène pour former une liaison thiol-ène (Figure 3-12b). Le radical thiyl est ensuite régénéré.

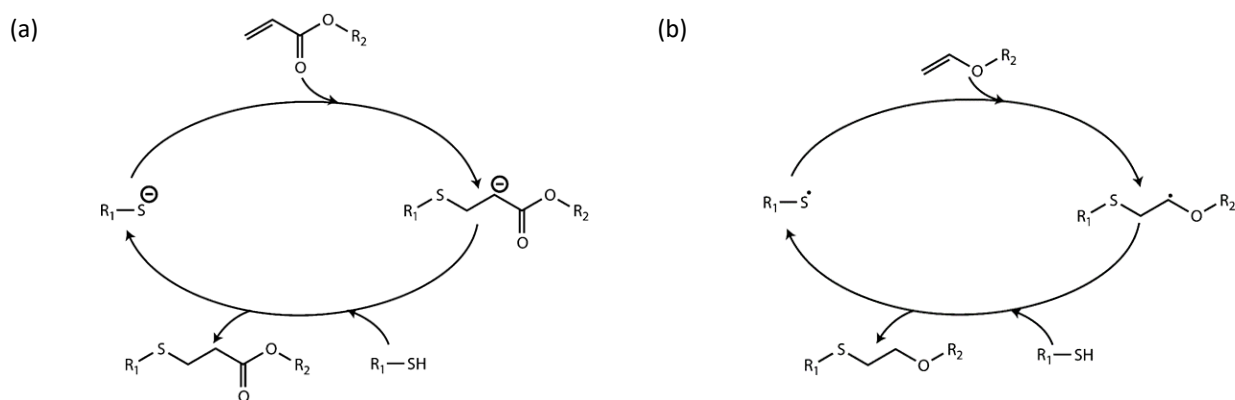


Figure 1-22 : Mécanismes réactionnels de la chimie thiol-ène : (a) addition de Michael (b) réaction d'addition radicalaire [27].

La réaction thiol-ène initiée par une source de lumière est la plus fréquemment utilisée pour réticuler les chaînes de polymères et former des hydrogels à visée thérapeutique. L'hydrogel est ainsi formé à l'endroit et à l'instant souhaité, avec une densité de réticulation dépendante du temps et de la puissance d'irradiation. Contrairement à l'addition de Michael, et bien que les thiols soient réactifs, l'addition radicalaire est qualifiée de réaction clic car elle offre un meilleur contrôle de la réaction, et une plus forte densité de réticulation. Néanmoins, les UVs génèrent des radicaux extrêmement réactifs qui peuvent dégrader le PA encapsulé dans l'hydrogel. Des travaux récents rapportent des hydrogels de chitosane - méthacrylate réticulés sous lumière visible moins énergétique donc moins destructrice [57]. Les propriétés mécaniques des gels obtenus sous lumière visible (~25 kPa) restent cependant inférieures à celles des mêmes gels de chitosane-méthacrylate obtenus après réticulation sous irradiation UV (200 kPa). D'autres travaux rapportent l'utilisation de la lumière visible pour initier la réaction radicalaire thiol-ène [58].

Dans la première partie de ces travaux de thèse, la chimie radicalaire thiol-ène a été utilisée pour former des hydrogels « bulk » et des films à partir de CMC et de CS modifiés par des groupements alcène, car elle a l'avantage d'être rapide, spatialement et temporellement contrôlable. Cette chimie thiol-ène est déjà

utilisée au laboratoire du CERMAV pour former des hydrogels de HA, de CMC ou de chitosane, ou pour greffer des copolymères sur ces polysaccharides.

La chimie clic thiol-yne

La réaction thiol-yne est la réaction d'une molécule ou d'une macromolécule contenant un alcyne (-YNE), avec un autre contenant un groupement thiol (-SH). Contrairement à la thiol-ène qui peut conduire à 2 produits différents (Markovnikov et anti-Markovnikov), la thiol-yne peut conduire à 6 produits différents [59]. Ces produits sont présentés Figure 1-23 et sont obtenus après une mono- ou double- addition.

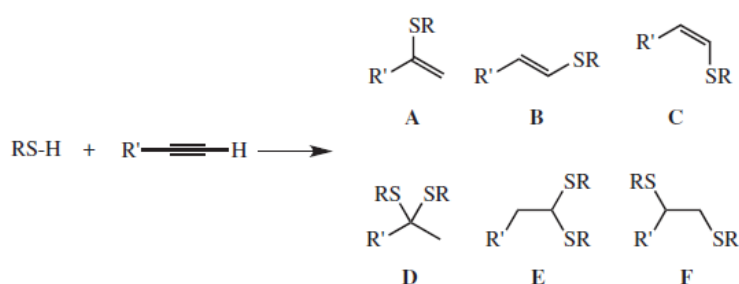


Figure 1-23 : Représentation des différents produits obtenus après une mono- ou double hydrothiolation d'un groupement terminal alcyne [59].

Tout comme la réaction thiol-ène, la réaction thiol-yne peut se faire selon 2 mécanismes : par réaction radicalaire initiée sous irradiation UV en présence d'un photo-amorceur, ou thermiquement, ou par addition nucléophile [60].

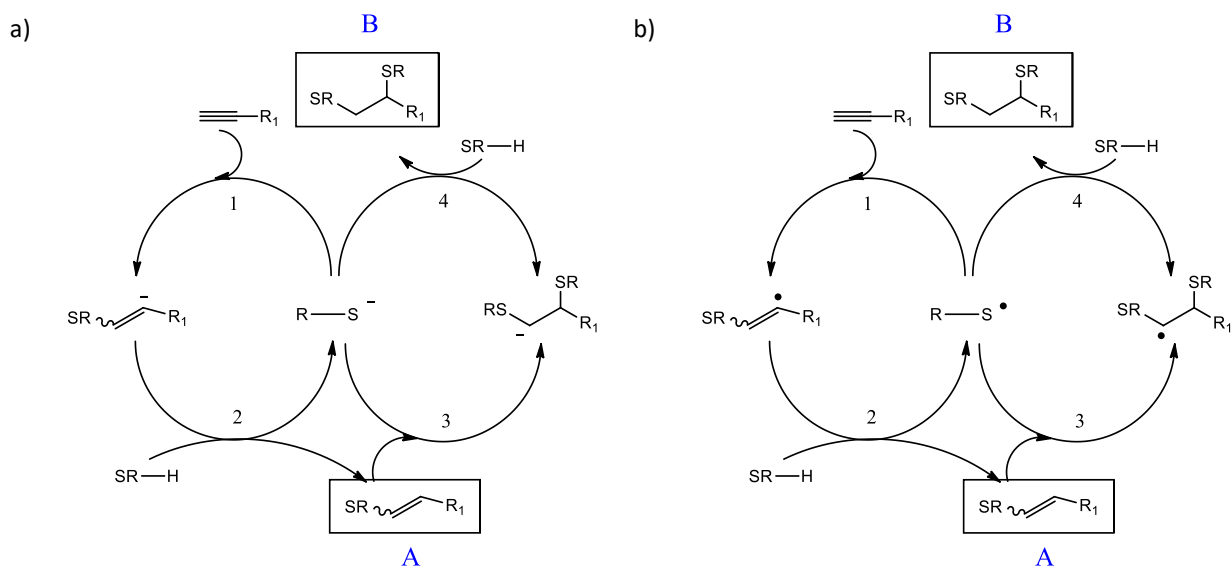


Figure 1-24: Mécanismes réactionnels de la chimie thiol-yne : (a) addition de Michael (b) réaction d'addition radicalaire (adapté de [59]).

Malgré son potentiel de chimie clic, la réaction thiol-yne reste bien moins utilisée que la réaction thiol-ène [60]. Peu de travaux se sont portés sur l'étude de cette réaction thiol-yne par addition nucléophile, facilitée lorsque l'addition du thiolate se fait sur un ester-alcyne ou un cycle contraint (cyclo-octyne) qui permet d'avoir une triple liaison $C\equiv C$ déficiente en électrons. Truong et al. ont été les premiers à étudier le mécanisme réactionnel de cette réaction en fonction de la base utilisée et de la polarité du solvant [61]. Par exemple, ils ont démontré que dans un solvant non polaire comme le chloroforme ou le benzène, le produit dominant est un isomère trans, tandis que dans un solvant polaire le produit cis est dominant. Ils ont également rapporté l'efficacité de la réaction thiol-yne dans un tampon phosphate à pH 7.4 sans utiliser de catalyseur, en utilisant un bispropiolate comme composé alcyne [61].

Cette réaction pouvant se faire sans initiateur et sans UVs a été utilisée pour former des hydrogels. L'équipe ayant étudié le mécanisme réactionnel de la Thiol-yne (Truong et al.) a développé des hydrogels double réseau de CS-PEG dont un est réticulé par chimie thiol-yne dans le PBS à pH 7.4 [62]. Le premier réseau est constitué de CS-norbornène réticulé avec un PEG-tétrazine et le second réseau est constitué uniquement de PEG réticulé par chimie thiol-yne à partir d'un tétraPEG-alcyne et d'un PEG-bis-thiol [62]. Le réseau réticulé par chimie thiol-yne a été analysé séparément en rhéologie pour une solution en tétraPEG-alcyne à 126 mg/mL et un ratio [thiol]/[alcyne] de 1. La gélification de la solution commence 3 min après avoir mélangé les 2 PEGs fonctionnalisés. Au bout de 10 min la réaction de réticulation est terminée, le module G' atteint un plateau.

Dans la seconde partie de ces travaux de thèse la réaction thiol-yne par addition nucléophile a été utilisée pour réticuler les chaînes polymères et former des hydrogels. Cette chimie permet de s'affranchir des problèmes liés à la génération de radicaux thiyls de la réaction radicalaire thiol-ène (cytocompatibilité, dégradation des principes actifs).

1.4 Conclusion

Les systèmes pour la délivrance locale et prolongée de principes actifs (PA) sont en constante évolution depuis ces 30 dernières années, afin d'améliorer l'efficacité thérapeutique de l'actif encapsulé, et de rendre le traitement moins contraignant pour le patient. Les hydrogels se sont avérés être d'excellents candidats pour servir de plateforme à la délivrance de PA. Avec le développement d'hydrogels plus sophistiqués, comme les hydrogels hybrides, les hydrogels double réseaux, et les hydrogels clics, les possibilités de moduler leur porosité et ainsi la cinétique de libération du PA encapsulé sont infinies. Dans cet état de l'art, des exemples de ces systèmes sophistiqués préparés à partir de chitosane ont été plus particulièrement présentés.

Ces travaux de thèse ont pour objectif de développer de nouveaux DDS capables de délivrer de façon locale, et prolongée un PA hydrophobe. Pour retarder la libération du PA et pouvoir encapsuler un principe actif hydrophobe, notre stratégie a été de d'explorer la double encapsulation, en solubilisant le PA hydrophobe dans des nanoparticules lipidiques (LNPs), elles mêmes intégrées dans les hydrogels. En s'appuyant sur l'état de l'art rapporté dans ce chapitre, nous avons préparé des hydrogels hybrides à partir de 2 polysaccharides, la CMC, et le chitosane, mélangé avec du PEG et réticulés par chimie clic. Ces systèmes sont originaux de part leur mise en forme et les chimies développées pour les réticuler.

Des hydrogels hybrides de CMC/PEG, intégrant des LNPs, ont d'abord été préparés et réticulés par chimie radicalaire thiol-ène. Les nouvelles propriétés de l'hydrogel composite ainsi que la stabilité des LNPs dans ce matériau ont été étudiées. Le design du système a permis de moduler la cinétique de libération des LNPs depuis les gels (chapitre 2). Un fluorophore encapsulé dans le cœur des LNPs sert de modèle pour étudier la cinétique de libération du principe actif depuis ces systèmes.

A partir des résultats de l'étude approfondie des hydrogels composites de CMC/PEG + LNPs, de nouveaux systèmes plus faciles à manipuler ont été développés. De part ses propriétés biologiques et les multiples mises en forme possibles qu'il offre, le chitosane a été utilisé pour préparer des films et des éponges hybrides. Les films de chitosane seront décrits dans le chapitre 3. Les propriétés des éponges ainsi que la stabilité des LNPs dans ce matériau seront étudiées dans le chapitre 4.

Références

- [1] K. Park, Controlled drug delivery systems: Past forward and future back, *Journal of Controlled Release*, 190 (2014) 3-8.
- [2] A.C. Anselmo, S. Mitragotri, An overview of clinical and commercial impact of drug delivery systems, *Journal of Controlled Release*, 190 (2014) 15-28.
- [3] X. Huang, C.S. Brazel, On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems, *Journal of Controlled Release*, 73 (2001) 121-136.
- [4] Y. Brudno, D.J. Mooney, On-demand drug delivery from local depots, *Journal of Controlled Release*, 219 (2015) 8-17.
- [5] L. Kleinberg, Polifeprosan 20, 3.85% carmustine slow-release wafer in malignant glioma: evidence for role in era of standard adjuvant temozolomide, *Core Evidence*, 7 (2012) 115-130.
- [6] R.J.J. Groenewegen, Drug delivery system for two or more active substances, in, Google Patents, 1999.
- [7] S.S. Venkatraman, S. Li, R.M. Gale, J. Stepic, O.W.W. Van, Transdermal patch for administering fentanyl, in, Google Patents, 2002.
- [8] K.T. Savjani, A.K. Gajjar, J.K. Savjani, Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques, *ISRN Pharmaceutics*, 2012 (2012) 195727.
- [9] B.V. Slaughter, S.S. Khurshid, O.Z. Fisher, A. Khademhosseini, N.A. Peppas, Hydrogels in Regenerative Medicine, *Advanced Materials*, 21 (2009) 3307-3329.
- [10] T.R. Hoare, D.S. Kohane, Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges, *Polymer*, 49 (2008) 1993-2007.
- [11] C. Elvira, J.F. Mano, J. San Román, R.L. Reis, Starch-based biodegradable hydrogels with potential biomedical applications as drug delivery systems, *Biomaterials*, 23 (2002) 1955-1966.
- [12] S. Chaterji, I.K. Kwon, K. Park, Smart Polymeric Gels: Redefining the Limits of Biomedical Devices, *Progress in Polymer Science*, 32 (2007) 1083-1122.
- [13] S.-k. Ahn, R.M. Kasi, S.-C. Kim, N. Sharma, Y. Zhou, Stimuli-responsive polymer gels, *Soft Matter*, 4 (2008) 1151-1157.
- [14] X. Yang, G. Zhang, D. Zhang, Stimuli responsive gels based on low molecular weight gelators, *Journal of Materials Chemistry*, 22 (2012) 38-50.
- [15] Z.-Q. Cao, G.-J. Wang, Multi-Stimuli-Responsive Polymer Materials: Particles, Films, and Bulk Gels, *The Chemical Record*, 16 (2016) 1398-1435.
- [16] C.-C. Lin, A.T. Metters, Hydrogels in controlled release formulations: Network design and mathematical modeling, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58 (2006) 1379-1408.
- [17] N. Bhattarai, J. Gunn, M. Zhang, Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62 (2010) 83-99.
- [18] E.B. Denkbaş, R.M. Ottenbrite, Perspectives on: Chitosan drug delivery systems based on their geometries, *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 21 (2006) 351-368.
- [19] N.A. Peppas, P. Bures, W. Leobandung, H. Ichikawa, Hydrogels in pharmaceutical formulations, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50 (2000) 27-46.
- [20] N.A. Peppas, J.J. Sahlin, Hydrogels as mucoadhesive and bioadhesive materials: a review, *Biomaterials*, 17 (1996) 1553-1561.
- [21] N. Salamat-Miller, M. Chittchang, T.P. Johnston, The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57 (2005) 1666-1691.
- [22] N.A. Peppas, A.R. Khare, Modern Hydrogel Delivery Systems Preparation, structure and diffusional behavior of hydrogels in controlled release, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 11 (1993) 1-35.

- [23] P.B. Malafaya, G.A. Silva, R.L. Reis, Natural–origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59 (2007) 207-233.
- [24] S.W. Kim, Y.H. Bae, T. Okano, Hydrogels: Swelling, Drug Loading, and Release, *Pharmaceutical Research: An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*, 9 (1992) 283-290.
- [25] C. Yang, P.D. Mariner, J.N. Nahreini, K.S. Anseth, Cell-mediated delivery of glucocorticoids from thiol-ene hydrogels, *Journal of Controlled Release*, 162 (2012) 612-618.
- [26] K.C. Koehler, K.S. Anseth, C.N. Bowman, Diels-alder mediated controlled release from a poly(ethylene glycol) based hydrogel, *Biomacromolecules*, 14 (2013) 538-547.
- [27] C.E. Hoyle, C.N. Bowman, Thiol–Ene Click Chemistry, *Angewandte Chemie International Edition*, 49 (2010) 1540-1573.
- [28] R. Langer, N. Peppas, Chemical and Physical Structure of Polymers as Carriers for Controlled Release of Bioactive Agents: A Review, *Journal of Macromolecular Science, Part C*, 23 (1983) 61-126.
- [29] B. Amsden, Solute Diffusion within Hydrogels. Mechanisms and Models, *Macromolecules*, 31 (1998) 8382-8395.
- [30] L. Masaro, X.X. Zhu, Physical models of diffusion for polymer solutions, gels and solids, *Progress in Polymer Science*, 24 (1999) 731-775.
- [31] J. Siepmann, H. Kranz, R. Bodmeier, N.A. Peppas, HPMC-matrices for controlled drug delivery: A new model combining diffusion, swelling, and dissolution mechanisms and predicting the release kinetics, *Pharm Res*, 16 (1999) 1748-1756.
- [32] S. Grijalvo, J. Mayr, R. Eritja, D.D. Diaz, Biodegradable liposome-encapsulated hydrogels for biomedical applications: a marriage of convenience, *Biomaterials Science*, 4 (2016) 555-574.
- [33] E. Josef, K. Barat, I. Barsht, M. Zilberman, H. Bianco-Peled, Composite hydrogels as a vehicle for releasing drugs with a wide range of hydrophobicities, *Acta Biomaterialia*, 9 (2013) 8815-8822.
- [34] R. Raj, P. Mongia, A. Ram, N.K. Jain, Enhanced skin delivery of aceclofenac via hydrogel-based solid lipid nanoparticles, *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 44 (2016) 1434-1439.
- [35] F.H. Nasr, S. Khoei, M.M. Dehghan, S.S. Chaleshtori, A. Shafiee, Preparation and Evaluation of Contact Lenses Embedded with Polycaprolactone-Based Nanoparticles for Ocular Drug Delivery, *Biomacromolecules*, 17 (2016) 485-495.
- [36] L. Xiao, Z. Tong, Y. Chen, D.J. Pochan, C.R. Sabanayagam, X. Jia, Hyaluronic Acid-Based Hydrogels Containing Covalently Integrated Drug Depots: Implication for Controlling Inflammation in Mechanically Stressed Tissues, *Biomacromolecules*, 14 (2013) 3808-3819.
- [37] A. Billard, L. Pourchet, S. Malaise, P. Alcouffe, A. Montembault, C. Ladaviere, Liposome-loaded chitosan physical hydrogel: Toward a promising delayed-release biosystem, *Carbohydrate Polymers*, 115 (2015) 651-657.
- [38] N. El Kechai, E. Mamelie, Y. Nguyen, N. Huang, V. Nicolas, P. Chaminade, S. Yen-Nicolaÿ, C. Gueutin, B. Granger, E. Ferrary, F. Agnely, A. Bochot, Hyaluronic acid liposomal gel sustains delivery of a corticoid to the inner ear, *Journal of Controlled Release*, 226 (2016) 248-257.
- [39] G. D'Ayala, M. Malinconico, P. Laurienzo, Marine Derived Polysaccharides for Biomedical Applications: Chemical Modification Approaches, *Molecules*, 13 (2008) 2069.
- [40] A. Basu, K.R. Kunduru, E. Abtew, A.J. Domb, Polysaccharide-Based Conjugates for Biomedical Applications, *Bioconjugate Chemistry*, 26 (2015) 1396-1412.
- [41] A.B.M. Fakrul Alam, M.I.H. Mondal, Utilization of cellulosic wastes in textile and garment industries. I. Synthesis and grafting characterization of carboxymethyl cellulose from knitted rag, *Journal of Applied Polymer Science*, 128 (2013) 1206-1212.

- [42] N. Devi, T.K. Maji, Preparation and Evaluation of Gelatin/Sodium Carboxymethyl Cellulose Polyelectrolyte Complex Microparticles for Controlled Delivery of Isoniazid, *AAPS PharmSciTech*, 10 (2009) 1412.
- [43] S.-F. Ng, N. Jumaat, Carboxymethyl cellulose wafers containing antimicrobials: A modern drug delivery system for wound infections, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 51 (2014) 173-179.
- [44] A. Salama, M. El-Sakhawy, S. Kamel, Carboxymethyl cellulose based hybrid material for sustained release of protein drugs, *International Journal of Biological Macromolecules*.
- [45] S. Lee, Y.H. Park, C.S. Ki, Fabrication of PEG–carboxymethylcellulose hydrogel by thiol-norbornene photo-click chemistry, *International Journal of Biological Macromolecules*, 83 (2016) 1-8.
- [46] H.C. Kolb, M.G. Finn, K.B. Sharpless, Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions, *Angewandte Chemie International Edition*, 40 (2001) 2004-2021.
- [47] Y. Jiang, J. Chen, C. Deng, E.J. Suuronen, Z. Zhong, Click hydrogels, microgels and nanogels: Emerging platforms for drug delivery and tissue engineering, *Biomaterials*, 35 (2014) 4969-4985.
- [48] H.K. Lau, K.L. Kiick, Opportunities for Multicomponent Hybrid Hydrogels in Biomedical Applications, *Biomacromolecules*, 16 (2015) 28-42.
- [49] D.A. Ossipov, J. Hilborn, Poly(vinyl alcohol)-Based Hydrogels Formed by “Click Chemistry”, *Macromolecules*, 39 (2006) 1709-1718.
- [50] V. Crescenzi, L. Cornelio, C. Di Meo, S. Nardecchia, R. Lamanna, Novel Hydrogels via Click Chemistry: Synthesis and Potential Biomedical Applications, *Biomacromolecules*, 8 (2007) 1844-1850.
- [51] G. Testa, C. Di Meo, S. Nardecchia, D. Capitani, L. Mannina, R. Lamanna, A. Barbetta, M. Dentini, Influence of dialkyne structure on the properties of new click-gels based on hyaluronic acid, *International Journal of Pharmaceutics*, 378 (2009) 86-92.
- [52] C.M. Nimmo, S.C. Owen, M.S. Shoichet, Diels–Alder Click Cross-Linked Hyaluronic Acid Hydrogels for Tissue Engineering, *Biomacromolecules*, 12 (2011) 824-830.
- [53] S.C. Owen, S.A. Fisher, R.Y. Tam, C.M. Nimmo, M.S. Shoichet, Hyaluronic acid click hydrogels emulate the extracellular matrix, *Langmuir*, 29 (2013) 7393-7400.
- [54] J. Mergy, A. Fournier, E. Hachet, R. Auzély-Velty, Modification of polysaccharides via thiol-ene chemistry: A versatile route to functional biomaterials, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 50 (2012) 4019-4028.
- [55] P.M. Kharkar, M.S. Rehmann, K.M. Skeens, E. Maverakis, A.M. Kloxin, Thiol–ene Click Hydrogels for Therapeutic Delivery, *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2 (2016) 165-179.
- [56] O. Yom-Tov, D. Seliktar, H. Bianco-Peled, PEG-Thiol based hydrogels with controllable properties, *European Polymer Journal*, 74 (2016) 1-12.
- [57] J. Hu, Y. Hou, H. Park, B. Choi, S. Hou, A. Chung, M. Lee, Visible light crosslinkable chitosan hydrogels for tissue engineering, *Acta Biomaterialia*, 8 (2012) 1730-1738.
- [58] H. Shih, C.-C. Lin, Visible-Light-Mediated Thiol-Ene Hydrogelation Using Eosin-Y as the Only Photoinitiator, *Macromolecular Rapid Communications*, 34 (2013) 269-273.
- [59] A.B. Lowe, Thiol-yne ‘click’/coupling chemistry and recent applications in polymer and materials synthesis and modification, *Polymer*, 55 (2014) 5517-5549.
- [60] P.D. Halphen, T.C. Owen, Carboxyalthioacrylates, *The Journal of Organic Chemistry*, 38 (1973) 3507-3510.
- [61] V.X. Truong, A.P. Dove, Organocatalytic, regioselective nucleophilic "click" addition of thiols to propiolic acid esters for polymer-polymer coupling, *Angewandte Chemie - International Edition*, 52 (2013) 4132-4136.

[62] V.X. Truong, M.P. Ablett, S.M. Richardson, J.A. Hoyland, A.P. Dove, Simultaneous Orthogonal Dual-Click Approach to Tough, in-Situ-Forming Hydrogels for Cell Encapsulation, *Journal of the American Chemical Society*, 137 (2015) 1618-1622.

Chapitre 2

Les hydrogels de carboxyméthylcellulose/PEG

Chapitre 2 Les hydrogels de carboxyméthylcellulose/PEG

2.1	Contexte	73
2.1.1	Objectifs.....	73
2.1.2	APPROCHE : les hydrogels composites de carboxyméthylcellulose (CMC)/PEG	73
2.2	Résultats	74
2.2.1	Caractérisation de la carboxyméthylcellulose (CMC)	74
2.2.1.1	Détermination de la masse molaire moyenne (Mw).....	74
2.2.1.2	Détermination du degré de substitution (DS) de la CMC en groupements carboxyméthyles.....	75
2.2.2	Article	76
2.2.3	Résultats complémentaires.....	122
2.2.3.1	Etude complémentaire sur les propriétés mécaniques des hydrogels	122
2.2.3.2	Lyophilisation des hydrogels et analyse de leur morphologie	132
2.2.3.3	Analyse des propriétés mécaniques des gels après lyophilisation.....	133
2.3	Conclusion.....	134
	Références.....	135

2.1 Contexte

2.1.1 Objectifs

L'objectif des travaux présentés dans ce chapitre est de former un hydrogel à partir de polymères naturels, capable de délivrer localement et de façon prolongée un principe actif lipophile (PA). Avec le développement croissant des PA hydrophobes, cet hydrogel assurera la délivrance de ces molécules très peu solubles en milieu aqueux, sans nuire à leur activité. Il doit être capable de libérer progressivement le PA encapsulé durant plusieurs jours, pour ainsi éviter d'administrer une trop forte dose au patient et augmenter le temps d'utilisation du système avant d'avoir à le remplacer. Ce système pourra être implanté (implant sous cutané, implant vaginal) ou directement appliqué sur la peau, tel un patch, pour délivrer par voie transdermique le PA encapsulé. Pour servir de patch ou d'implants, des contraintes mécaniques sont également à respecter. Le système doit avoir des propriétés mécaniques suffisantes pour être facilement manipulé et pour suivre les mouvements du corps [1].

2.1.2 APPROCHE : les hydrogels composites de carboxyméthylcellulose (CMC)/PEG

Le nouveau système est composé de nanoparticules lipidiques (LNPs), présentées dans le chapitre 1, dispersées dans une matrice d'hydrogel, préparée à partir de carboxyméthylcellulose (CMC) et de poly(éthylène glycol) (PEG). La libération passive des LNPs pourra être modulée en fonction du design du système composite (propriétés de la matrice et des particules).

Afin d'obtenir un meilleur contrôle des propriétés mécaniques de la matrice, les hydrogels sont réticulés chimiquement. La chimie clic radicalaire thiol-ène, développée au CERMAV, permet de réticuler les chaînes de polymères sous UV, en présence d'un photo-amorceur (Figure 2-1). Pour permettre la réticulation, la CMC utilisée pour former ces gels a été préalablement modifiée par des groupements alcène (CMC-p). Un poly(éthylène glycol)-bis-thiol ($\text{PEG}-(\text{SH})_2$) est utilisé comme agent réticulant. Cette approche offre la possibilité de moduler les propriétés mécaniques de ces gels en fonction du degré de substitution en groupements -ENE de la CMC, de la quantité de $\text{PEG}-(\text{SH})_2$ ajoutée et de la concentration en CMC-p initiale.

Ainsi, différents gels de densité de réticulation variable ont été sélectionnés pour y intégrer les LNPs de diamètre 50 nm (F50) ou 120 nm (F120) et de charge variable (négatives LNP(-), neutres LNP(N) ou positives LNP(+)). Pour former le système composite, les LNPs sont ajoutées avant l'étape de réticulation sous UV, comme décrit Figure 2-1.

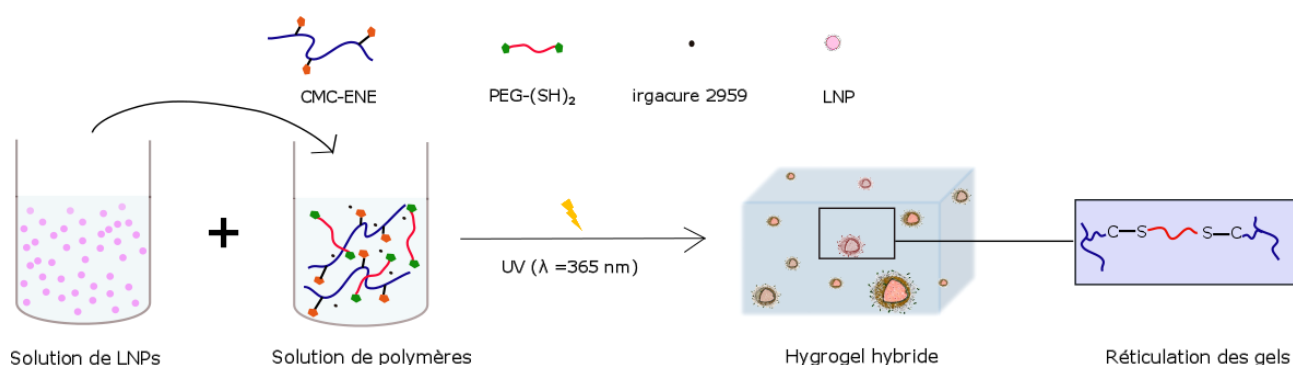


Figure 2-1: Formation des gels composites de CMC-p/PEG-(SH)₂ : la CMC contenant des groupements pentenoate (CMC-p) et le PEG-bis(thiol) (PEG-SH) sont réticulés sous UV par chimie thiol-ène. Les nanoparticules lipidiques (LNPs) sont ajoutées à la solution de polymère avant l'étape de réticulation.

Dans cette étude, les nouvelles propriétés des hydrogels composites ont été évaluées. Un fluorophore, encapsulé dans le cœur des LNPs a permis d'étudier leur libération depuis les hydrogels par spectroscopie de fluorescence, en fonction des propriétés du gel et des LNPs. Les résultats de cette étude ont été soumis pour publication et sont présentés ci-après. Des résultats complémentaires sur les propriétés mécaniques des gels et sur leur morphologie à l'état déshydraté complètent ce travail.

2.2 Résultats

2.2.1 Caractérisation de la carboxyméthylcellulose (CMC)

La description des caractérisations et les protocoles détaillés sont présentés au chapitre 5 matériels et méthodes.

2.2.1.1 Détermination de la masse molaire moyenne (Mw)

La masse molaire de la CMC a été déterminée par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) équipée d'un détecteur de diffusion de la lumière multi-angle et d'un réfractomètre différentiel (éluant : nitrate de sodium (NaNO₃) 0,1 M).

Tableau 2-1: Masse molaire moyenne en masse (Mw) calculée par SEC

Référence de la CMC	Concentration [g/L]	Mw [g/mol]	Indice de Polydispersité (I)
Hercule Blanose lot 7 LF PHARM	2	70 000	2,7

La masse molaire calculée par SEC, de 70 000 g/mol présentée dans le Tableau 2-1 est inférieure à celle donnée par le fournisseur (90 500 g/mol).

2.2.1.2 Détermination du degré de substitution (DS) de la CMC en groupements carboxyméthyles

Des dosages potentiométriques et conductimétriques par la soude (0.1 M) ont été réalisés simultanément afin d'estimer le nombre de groupements carboxyméthyles présents pour une unité de répétition de cellulose. Pour effectuer ces dosages, la CMC sous forme de sel de Na est passée sur une colonne de résine amberlite acide (SO₃H) afin de convertir les groupements carboxylates en acide carboxylique.

Les courbes des dosages potentiométrique et conductimétrique de la CMC sont présentées Figure 2-2.

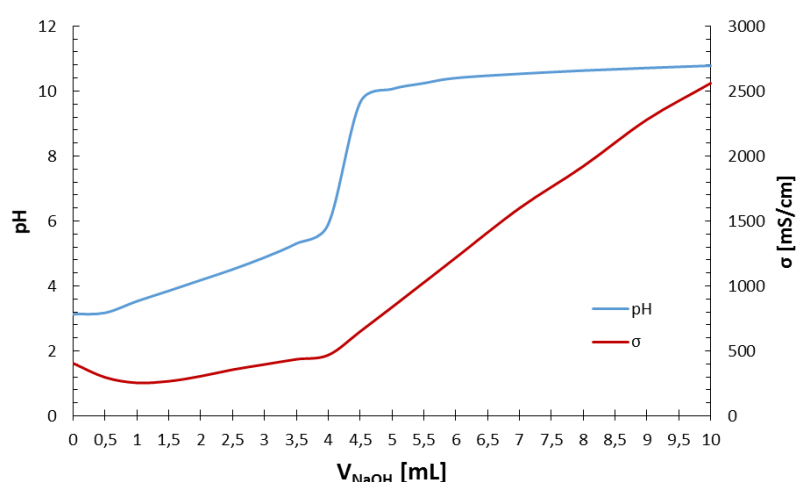


Figure 2-2: Titration potentiométrique et conductimétrique de la carboxyméthylcellulose (n=4) par NaOH 0.1 M

La réaction de dosage est la suivante : $\text{O-CH}_2\text{-COOH(aq)} + \text{HO}^-(\text{aq}) \rightarrow \text{O-CH}_2\text{-COO}^-(\text{aq}) + \text{H}_2\text{O(aq)}$. Une rupture de pente est observée pour les 2 dosages autour de $V_{\text{NaOH}}=4$ mL. Graphiquement, $V_{\text{eq-dosage conductimétrique}}=4,1$ mL et $V_{\text{eq-dosage potentiométrique}}=4,2$ mL.

Le DS en carboxyméthylcellulose est calculé à partir des volumes équivalents (V_{eq}), mesuré depuis les courbes de pH et de conductivité.

A l'équivalence :

$$n_{\text{OCH}_2\text{COOH}} = C_{\text{NaOH}} V_{\text{eq}} \quad (1)$$

$$\text{Or,} \quad n_{\text{OCH}_2\text{COOH}} = \frac{m_{\text{CMC}}}{Mw_{\text{CMC}}} DS \quad (2)$$

$$\text{On en déduit donc :} \quad DS = \frac{C_{\text{NaOH}} V_{\text{eq}} Mw_{\text{CMC}}}{m_{\text{CMC}}} \quad (3)$$

Les DS calculés par les 2 dosages sont comparés au DS donné par le fournisseur dans le Tableau 2-2. Ces DS expérimentaux sont très proches du DS indiqué par le fournisseur.

Tableau 2-2 : Comparaison des DS en groupements carboxyméthyles de la CMC obtenus par dosage potentiométrique ou conductimétrique

DS- fournisseur	DS- dosage conductimétrique	DS- dosage potentiométrique
0,7	0,71 ± 0,05	0,74 ± 0,08

2.2.2 Article

Une fois la CMC caractérisée, différents hydrogels de CMC/PEG réticulés par chimie thiol-ène, ont été préparés. Les hydrogels avec et sans particules ont d’abord été caractérisés par rhéologie (mesures des modules en cisaillement G' et G'' et en compression (E)) puis par leur taux de gonflement. Les cinétiques de libération des particules depuis les gels ont été étudiées puis confrontées à un modèle mathématique développé par le Pr Véronique Larreta-Garde de l’université de Cergy-Pontoise.

Time-controllable lipophilic-drug release system designed by loading lipid nanoparticles into polysaccharide hydrogels

Lisa Racine^{a,b}, Aynur Guliyeva^b, Irène Wang^c, Véronique Larreta-Garde^d, Rachel Auzély-Velty^{b,*} and Isabelle Texier^{a,*}

^a Univ. Grenoble Alpes, F-38000 Grenoble France, and CEA LETI MINATEC Campus, F-38054 Grenoble France. E-mail: isabelle.texier-nogues@cea.fr

^b Univ. Grenoble Alpes, CERMAV-CNRS, F-38000 Grenoble France. E-mail: rachel.auzely@cermav.cnrs.fr

^c Univ. Grenoble Alpes, CNRS, LIPhy, F-38000 Grenoble France

^d Laboratoire ERRMECe UFR Sciences et Techniques Université de Cergy-Pontoise, 2 avenue Adolphe Chauvin BP222- 95302 Pontoise cedex, France

Abstract

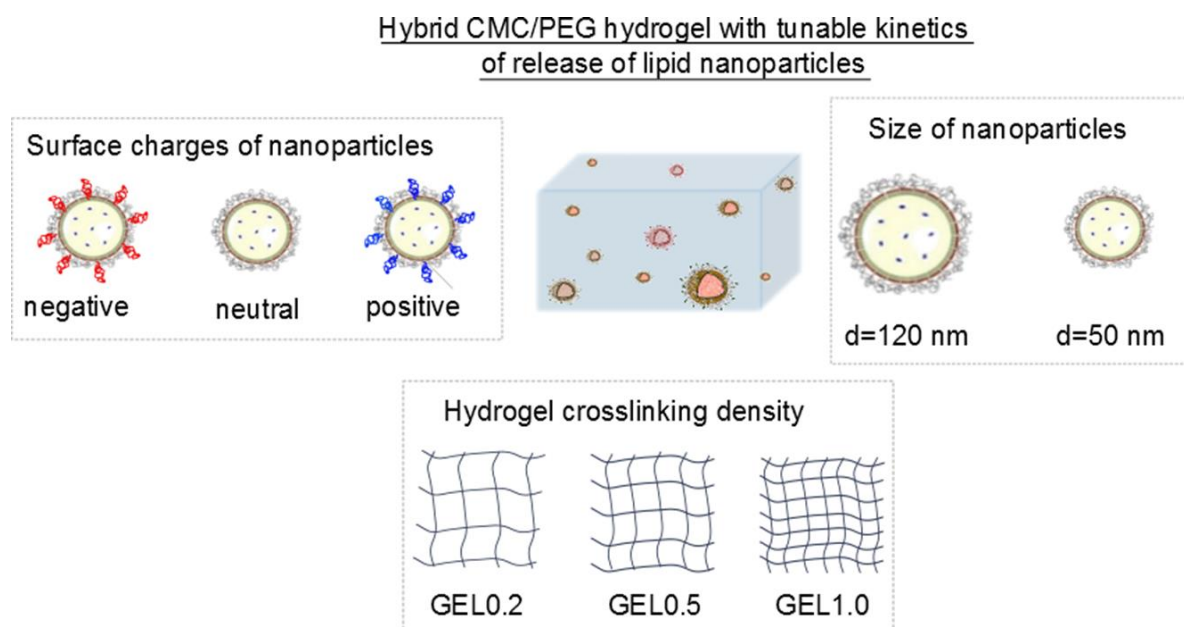
A hybrid hydrogel composed of lipid nanoparticles (LNPs) entrapped within chemically cross-linked carboxymethylcellulose (CMC) was developed to achieve localized and sustained release of hydrophobic drugs. The analysis of LNP stability as well as the hydrogel swelling and mechanical properties confirmed the successful incorporation of particles up to a concentration of 50 %w/w CMC. The initial LNP release rate could be prolonged by increasing the particle diameter from 50 nm to 120 nm, while the amount of long-term release could be adjusted by tailoring the particle

surface charge or the crosslinking density of the polymer. After 30 days, 58% of dye initially encapsulated into 50 nm diameter negatively charged LNPs escaped from the matrix while only 17% of dye were released from materials loaded with positively charged particles. A mathematical diffusion model based on Fick's second law was efficient to predict the diffusion of the particles from the hydrogels.

Keywords

Carboxymethylcellulose hydrogels – lipid nanoparticles – hybrid material – medical device – drug delivery

Graphical abstract



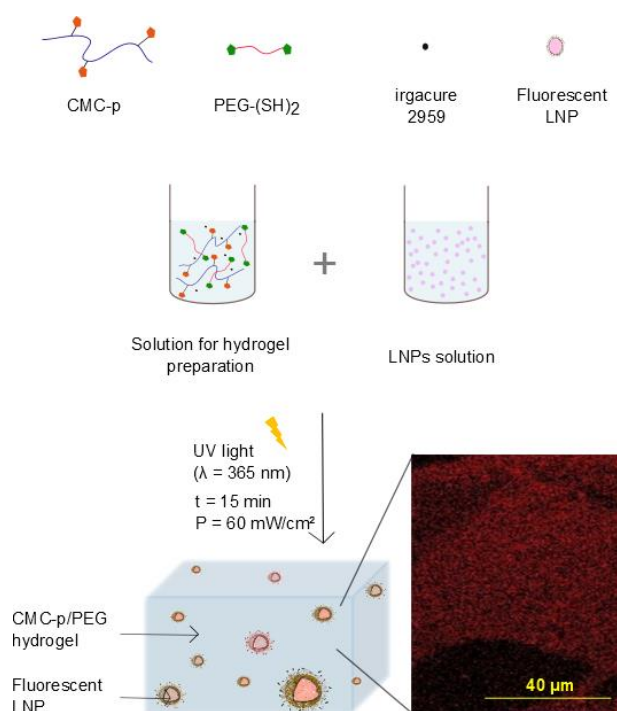
I. Introduction

The unique physical properties of hydrogels have sparked particular interest in their use in drug delivery applications. These hydrophilic polymer networks, with inherent biocompatibility attributed to their soft, flexible nature and high water content, have the benefit of delivering therapeutics at a controlled rate to specific sites in the body with minimized irritation to the surrounding tissues.¹ Their degree of porosity and swelling ability involved in passive drug diffusion can be modulated by the nature of polymer, its concentration as well as by the degree of crosslinking.²⁻⁵ Thus, the high tunability in the physical, chemical, and biological properties of hydrogels allows for proper design of release devices in a variety of applications including sustained, targeted, or stealth drug delivery.¹ However, the large pore sizes and high water content of most hydrogels may cause rapid and uncontrolled release of water-soluble small molecules. Loading hydrophobic drugs into hydrogels presents another difficulty because of the incompatibility between the hydrophilic polymer network and hydrophobic drug molecules. Poorly water-soluble hydrophobic drugs tend to precipitate or to be simply released from the hydrogel in a rapid burst.⁶ To overcome these limitations, particle-based drug delivery systems (microspheres, nanoparticles, liposomes) have been entrapped within hydrogels to form composite hydrogel networks (also called hybrid hydrogels).⁶⁻¹² These composite materials can take different forms such as wound dressings or injectable depots, offering high bioavailability of drug at the site of action and low therapeutic levels in other sensitive regions. Physically crosslinked hydrogels are commonly used as the particle entrapment matrix.^{9, 12} In this respect, many studies focused on liposomes embedded in hydrogels based on biopolymers, taking advantage of their unique physico-chemical and/or biological properties.¹¹ It was thus shown that the liposome characteristics such as lipid composition, surface charge and particle size can have a significant effect on the release of the liposome-associated active compound.^{13, 14} A few studies also focused on the impact of the crosslinking density of chemically crosslinked hydrogels, which directly affects their mechanical and swelling properties.¹⁵⁻¹⁷ *In vitro*

release studies demonstrated longer sustained delivery of drug from the highest crosslinked hydrogels.¹⁵⁻¹⁷ These results indicate that via the appropriate design of network structure and nanoparticle carriers, drug delivery systems can be engineered to provide a tailored drug release rate with sustained delivery.

Our group previously developed solid lipid nanoparticles (further noted as LNPs) with viscous non-crystalline lipid core as promising nanocarriers for the *in vivo* transport of lipophilic molecules¹⁸ and therapeutic agents.^{19, 20} The nanoparticles formulated with FDA approved ingredients display high biocompatibility, blood clearance of ≈ 40 minutes, accumulate significantly in various tumor models as well as in inflamed area, and are easily metabolized by the hepatic pathway.²¹ The particle diameter and surface charge can be easily tailored according to the formulation composition, especially the surfactant nature and the lipid/surfactant ratio.^{22, 23}

In this work, chemically cross-linked hydrogels were designed and loaded with LNPs to provide novel tailored and localized release systems for hydrophobic drugs (Scheme 1). The hydrogels were based on a negatively-charged polysaccharide often used in the biomedical field, namely carboxymethylcellulose (CMC), chemically crosslinked with poly(ethylene glycol) (PEG). The main objective of this study was to analyse the effects of the hydrogel mechanical properties, which were intimately linked to the crosslinking density, as well as of the LNP characteristics, on the particle release profiles. Herein, LNPs loaded with a fluorescent hydrophobic dye as a model drug and possessing different surface chemistries and diameters (between 50 and 120 nm) were loaded in the CMC/PEG-based hydrogels. The relationship between the observed release and the composite network properties were investigated using a mathematical diffusion model based on Fick's second law. It was thus determined that these hydrogel platforms acted as reservoirs of LNPs allowing to modulate drug release profiles in a controlled and predictable manner.



Scheme 1. Preparation of LNP-loaded hybrid hydrogel.

II. Experimental section

1. Materials

Suppocire NB® was kindly donated by Gattefossé (Saint-Priest, France) and Hostaphat® CC100 (anionic surfactant) by Clariant (Choisy-le-Roi, France). Myrj®-s40 (poly(ethyleneglycol)40 stearate) and super-refined soybean oil were gifts from CRODA (Chocques, France). Lipoid®-s75 was purchased from Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany), and 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonio-propane (DOTAP) from Avanti Polar (USA). 1,1'-Dioctadecyl-3,3',3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI) was obtained from Life Technologies (Saint-Aubin, France). The sample of carboxymethylcellulose (CMC, marketed under the name Blanose®, grade 7LF PH, DS = 0.7, Mw of 70 kg/mol) was kindly provided by Hercules (France). The weight-average molecular weight of CMC was determined by size exclusion chromatography using a Waters GPC Alliance

chromatograph (USA) equipped with a differential refractometer and a light scattering detector (MALLS) from Wyatt (USA). The solution was injected at a concentration of 1×10^{-3} g/mL in 0.1 M NaNO_3 . 1-[4-(2-Hydroxyethoxy)-phenyl]-2-hydroxy-2-methyl-1-propane-1-one (Irgacure 2959) was kindly provided by Ciba Specialty Chemicals (Basel, Switzerland). Poly(ethyleneglycol)-bis(thiol) (PEG-(SH)₂, Mw = 3,400 g/mol) was purchased from Creative PEGWorks (USA). 4-pentenoic anhydride, N,N-dimethylformamide (DMF), phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4) and other chemical products were purchased from Sigma-Aldrich-Fluka (L'Isle d'Abeau, France).

2. Synthesis of lipid nanoparticles (LNPs)

Dye-loaded LNPs having 50 nm or 120 nm diameters and different surface charges (“neutral”, positive, negative) were prepared according to protocols described previously.^{18, 22, 23} Briefly, an oily mixture was prepared by mixing refined soybean oil, Suppocire NC™, Lipoid S75™, DiI fluorophore dispersed in ethanol, and eventually DOTAP or Hostaphat® CC100. After homogenization at 50°C and complete evaporation of ethanol, the continuous aqueous phase, composed of Myrjs40™ and of aqueous medium, was introduced. The vial was placed in a 50°C water bath and the mixture was sonicated for 5 min using a VCX750 ultrasonic processor (power output 190 W, 3-mm probe diameter, Sonics). The obtained emulsions were dialyzed overnight at room temperature (about 20°C) against 1,000 times their volume in 1X PBS (12–14,000 Da MW cut off membranes, ZelluTrans). Finally, the concentration of the emulsion was adjusted to 100 mg/mL (10% w/w) of lipids in 1X PBS (lipids include oil + Suppocire + Lipoid + Myrjs40 + DOTAP + Hostaphat CC 100), and filtered through a 0.22 µm (F50) or a 0.45 µm (F120) Millipore cellulose membrane. The emulsions were characterized in terms of size and polydispersity index, using Dynamic Light Scattering (Zeta Sizer Nano ZS, Malvern Instrument). For this purpose, the emulsions were diluted to achieve 2 mg/ml of lipids in 0.1X PBS and were transferred in Zeta Sizer Nano

cells (Malvern Instrument) before each measurement, performed in triplicate. Zeta potential measurements were performed in NaCl 0.154 mM. The diameter (~50 and ~120 nm for Z-average diameter of particles measured on a scattered light intensity basis, LNPs respectively referred to as F50 and F120) and surface charge (neutral (N), positive (+) and negative (-)) of the synthesized particles are summarized in Table 1. Their exact composition is detailed in Table S1 (ESI).

Table 1 Physical properties of LNPs loaded with DiI.

Sample code	Diameter analysis (light intensity basis)		Diameter analysis (particle number basis)		Zeta [mV]
	Z-average [nm]	Polydispersity	Diameter [nm]	Peak width [nm]	
F50(-)	58 ± 6	0.14 ± 0.03	35 ± 3	11 ± 1	-20.0 ± 0.8
F50(+)	65 ± 4	0.14 ± 0.02	38 ± 1	11 ± 1	+23.7 ± 0.2
F50(N)	52 ± 2	0.12 ± 0.01	35 ± 5	8.9 ± 1	-6.8 ± 0.5
F120(N)	119 ± 5	0.11 ± 0.01	85 ± 3	29 ± 5	-5.0 ± 0.4

3. Synthesis of pentenoate-modified CMC

CMC (0.5 g) was dissolved in 25 mL of deionized water and stirred at 4 °C overnight. 17 mL of DMF were added and the solution was stirred for 2 hours at 4 °C. 1.65 mL (1.78 g, 4 eq.) of 4-pentenoic anhydride were dissolved in 1.5 mL DMF and the resulting solution was added dropwise to the CMC solution at 4 °C under stirring. The pH was maintained at 8-9 by regular addition of 1 M NaOH. The mixture was then reacted for 4 hours while maintaining the pH between 8 and 9 at 4 °C and kept under stirring at 4 °C overnight. The modified polymer solution was then purified by ultrafiltration (ultra-membrane Amicon YM100, MWCO 10 kDa) using deionized water. The

CMC-pentenoate conjugate was finally isolated after freeze-drying as a white powder (0.465 g). The grafting of pentenoate groups on CMC was confirmed by ^1H NMR spectroscopy using a Bruker AVANCE III HD spectrometer operating at 400 MHz (^1H). The ^1H NMR spectrum of CMC-pentenoate (6 mg/mL in deuterium oxide) was recorded at 80 °C by applying a 45° tip angle for the excitation pulse, and a 10 s recycle delay for 16 scans. The degree of substitution (DS) of the sample, determined by the integration of the anomeric protons signals of CMC at 4.5 ppm and of the pentenoate proton signals at 5.7, 4.9, 2.4 and 2.2 ppm, was found to be 0.2 (Fig. S1, ESI).

4. Preparation of CMC/PEG hydrogels with and without LNPs

CMC-pentenoate (30 mg) was crosslinked in 1 mL of PBS with PEG-(SH)₂ under UV light irradiation using Irgacure 2959 (0.1 % (w/v)) as a photoinitiator in the absence and in the presence of LNPs (either neutral, anionic or cationic with 120 nm or 50 nm diameter). For this purpose, different molar ratios ($R = [\text{SH}]/[=]$, i.e. number of thiols of PEG-(SH)₂ over the number of alkene groups of CMC-pentenoate) were used, leading to GEL0.2 ($R = 0.2$), GEL0.5 ($R = 0.5$), and GEL1.0 ($R = 1$). The hydrogel-nanoparticle hybrid materials were prepared with nanoparticle/CMC payloads of 10 % and 50 % (w/w) (respectively, 3 and 15 mg of particles for 30 mg of CMC). The hydrogel pieces used for the compression rheology, the swelling and the release kinetics experiments were prepared from 140 μL of the different mixtures poured into cylindrical PTE molds (5 mm high, 6 mm diameter) and exposed to UV light ($\lambda = 365$ nm, $t = 15$ min at power = 60 mW/cm²). The different gel compositions that were explored are summarized in Table S2 (ESI).

5. Fluorescence confocal microscopy

The DiI-labelled LNPs entrapped in hydrogels were visualized by confocal laser microscopy (Leica DMiRE2 microscope using TCS SP2 laser scanning system). The thin pieces of hydrogels were obtained by microtome after being embedded in OCT (optimal cutting temperature) product. They

were analyzed at a 63x magnification with a 543 nm excitation laser. Control hydrogels without labelled LNPs were also prepared and analyzed.

6. Swelling experiments

The equilibrium swelling ratios Q of the empty hydrogels and of the hydrogel-nanoparticle scaffolds (6 mm diameter and 5 mm initial thickness) were measured in PBS. Q was determined as follows:

$$Q = \frac{w_{\text{swollen}}}{w_{\text{dry}}} \quad (1)$$

where w_{swollen} is the gel mass after swelling and w_{dry} is the dry gel mass measured after desiccating the sample for 4 days.

7. Oscillatory rheology experiments

An AR2000Ex rheometer (TA Instruments, Inc.) fitted with a UV-curing cell ($\lambda = 365$ nm) and an aluminum plate (diameter 20 mm) was used for the *in situ* measurement of the mechanical properties of the CMC/PEG gels. Following the deposition of 300 μL of solution, the gap between the flat quartz plate and the aluminum plate was initially 0.8 mm (measuring at room temperature). It was controlled during the experiments by maintaining the normal force at 0 ± 0.1 N. On each CMC/PEG hydrogel, oscillatory time sweep and frequency sweep experiments were performed. All the dynamic rheological data were checked as a function of strain amplitude to ensure that the measurements were performed in the linear viscoelastic region. In the oscillatory time sweep experiments, the storage modulus (G') and the loss modulus (G'') were measured for a period of 35 min at a fixed frequency of 1 Hz and a fixed deformation of 3.5 %. Typically, after deposition of the solution of CMC/PEG in PBS between the plates and equilibration for 1.5 min, the solution was illuminated ($\lambda = 365$ nm) for 35 min at a fixed light power of 20 mW/cm^2 leading to gelation. All measurements were done in duplicates.

8. Uniaxial compression experiments

Compression measurements were carried out using an AR2000Ex rheometer (TA instrument). The hydrogel, in the form of a cylinder (6 mm diameter and 5 mm initial thickness) was placed on the rheometer plate and put in contact with the 20 mm diameter plane/plane geometry until an initial normal force of 0.03 N was reached. Measurements were performed at a compression speed of 10 $\mu\text{m/s}$. The load and displacement data were collected during each experiment. The normal stress σ_{nominal} was calculated as the normal force divided by the surface area of the material whereas the displacement data were expressed as an extension ratio, $\lambda' = h/h_0$, where h is the deformed height and h_0 is the initial gap. To take into account the effect of the area change during deformation, the true stress was adopted as $\sigma_{\text{true}} = \sigma_{\text{nominal}} \times \lambda'$.²⁴ The Young modulus E of the materials could be calculated as the slopes of $\sigma_{\text{true}} = f(\lambda')$ in the linear response of gel. All compression tests were performed on fresh samples in quadruplicate.

9. In Vitro Cytotoxicity Study

In accordance with the International Organization for Standardization 10993, NIH-3T3 murine fibroblast cells were chosen to perform classical WST-1 cytotoxic assay, based on the measurement of the metabolic activity of cell mitochondria. NIH3T3 cells (ATCC) were grown in DMEM with 10 % new born calf serum (NCS) and 1% Pen Strep (PS) (Invitrogen). Two tests were performed: we evaluated the direct cytotoxicity of the materials, as well as the cytotoxicity of the medium after contact with the gels. 5×10^4 cells/well were incubated for 24 hours at 37 °C. In parallel, pieces of 30 mg of GEL0.5 with or without 50% of F50 or F120 were placed into 1 mL of medium (DMEM, 10% NBCS, 1% PS) for 24 hours at 37°C. Media around gels were removed after 24 hours, put in contact with culture medium and incubated at 37°C for 24 h (indirect “release” experiments). Pieces of gels (30 mg) were also seeded with culture medium at 37°C for 24 h (direct contact, “material” experiments), then removed for the assay. The metabolic activity of cell mitochondria reflecting

the density of living cells in the medium was assessed 24 hours after incubation using WST-1 assay (soluble formazan derivative reagent). WST-1 reagent (Roche) was added (10 %) to the culture medium and kept in the incubator at 37° C for 2 hours. Cells in medium and cells incubated with a solution of H₂O₂ 10 mM were respectively used as negative and positive controls of cytotoxicity. Absorbance was then recorded at 450 nm (soluble formazan titration) and 690 nm (background subtraction) using a microplate reader (Infinite M1000, Tecan). The absorbance difference (450 nm – 690 nm) was directly proportional to the metabolic activity of cell mitochondria, reflecting the density of living cells. The percentage of living cell density was determined using the following equation:

$$\text{Density of living cells (\%)} = ((AS-APC)/(ANC-APC) \times 100) \quad (2)$$

in which AS, APC and ANC represented absorbances of the sample, the positive control (cells with H₂O₂ 10 mM) and the negative control (only cells) respectively. For each sample, the reported density of living cells $\pm$ standard deviation was the mean of three tests.

10. In vitro release studies

The release kinetics of LNPs (either “neutral”, anionic or cationic and with diameter of 50 nm (F50) or 120 nm (F120)) from the CMC/PEG hydrogels was assessed by fluorescence measurement. The hybrid hydrogels containing fluorescently labelled LNPs were cut into 4 pieces of about 30 mg each and were accurately weighted. Each piece was immersed in 1 mL PBS and stored in the dark, at ambient temperature. At the desired time point, the gel piece was taken and immersed in 1 mL of 0.1 M NaOH for 15 minutes to dissolve the hydrogel crosslinked via ester bonds and release the LNPs entrapped inside the material. 900 μ L of the solution was then transferred in a quartz micro-cuvette for fluorescence and nanoparticle size analysis. The amount of LNPs released from the material was quantified by fluorescence using the DiI fluorophore encapsulated in the nanoparticle

core. Fluorescence titration was made using a Perkin Elmer LS50B fluorimeter using 520 nm excitation and a calibration curve allowed for the quantification of the amount of released particles. Data were normalized by the exact weight of the piece of material, and expressed in % of released LNPs by subtracting the fluorescence intensity of LNPs remaining in the hydrogel matrix measured after a given time t from that of LNPs initially incorporated in the hydrogel matrix. It was previously checked that the NaOH treatment to dissolve the gel did not damage the particle fluorescent properties, whereas direct titration of the particles in the PBS release medium could not be reliable due to the very diluted particle concentration (ESI, Fig. S3 and S4). Nanoparticle size and polydispersity index were also checked by Dynamic Light Scattering (Zeta Sizer Nano ZS, Malvern Instrument) of the dispersion after filtration on 0.22 μm (F50) or 0.45 μm (F120) cellulose filters (Millipore).

11. Elaboration of the kinetic model

The diffusion of nanoparticles from the gels to the outside medium was modeled with the Fick's second law except that diffusion modulation was allocated to steric hindrance. Taking into account the geometry of the samples (0.6 cm in diameter, 0.125 cm in height), diffusion was calculated within a single dimension (taken as the x -axis). On first approximation, the developed solution for diffusion from a position located at $x = 0$, where the initial concentration is $C_{(0)}$ is:²⁵

$$C_{(x,t)} = C_{(0)} \left(1 - 2 \left(\frac{x}{2\sqrt{Dt\pi}} \right) \right) \quad (3)$$

where D is the diffusion coefficient of the nanoparticle calculated using the Stokes-Einstein relation:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r} \quad (4)$$

This general model considers the diffusion of a molecule (radius r) in a given medium (of viscosity η), usually a liquid phase. It was thus adapted to the diffusion of large objects (nanoparticles) from

an elastic solid phase (gel) to the surrounding medium. We hypothesised that the diffusion of entrapped nanoparticles was regulated by the physical presence of the tight network; we defined this limitation by χ .²⁵ χ was evaluated relatively to the occupancy rate of the gel volume by the nanoparticles. We considered a quasi-substitutional diffusion, limited to the positions of the gel network not occupied by nanoparticles. To calculate the occupied volume, an identical density was assumed for all components and χ was simply evaluated as the relative length occupied by the nanoparticles ($\sqrt[3]{\text{occupied volume}}$). The theoretical diffusion value ($C(x,t)$) in equation (3) was thus modified to:

$$C(x,t \text{ gel}) = C(x,t) (1 - \chi) \quad (5)$$

When electrostatic interactions between LNPs and negatively charged CMC modulated the diffusion, their effect was taken into account. A factor of $\chi/2$, previously used for modeling the diffusion of moderately charged molecules ($-25 \text{ mV} < \zeta < +25 \text{ mV}$) from a charged gel was added to the χ value if the LNPs were positively charged or subtracted if the LNPs were negatively charged.²⁶ Results were expressed as the evolution of the fraction of included nanoparticles reaching the edge of the gel over time. The half-height of the gel was considered as the diffusion distance (x value equal to 0.62 mm).

12. Fluorescence Correlation Spectroscopy

Free DiI-labelled LNPs (F120) diluted in PBS were first analyzed by FCS as a control. Then PBS supernatant of F120 loaded GEL0.5 was analyzed at day 7. FCS measurements were performed on a home-built setup based on an inverted microscope stand (Olympus IX70, Olympus, Hamburg, Germany). The FCS excitation source was a solid-state laser emitting up to 20 mW of 488 nm-wavelength continuous-wave light (85-BCD-020, CVI Melles Griot, Albuquerque, NM). The beam was sent into a single-mode fiber in order to spatially clean its wavefront, then was collimated and reflected by a dichroic mirror (PB 505, Olympus) towards a water immersion objective lens (Plan-

apo 60 $\times$, NA=1.2, Olympus). The fluorescence emission was transmitted by the dichroic mirror and sent onto a beam splitter: each half of the signal was collected by a multimode fiber of 100 μm core diameter connected to an avalanche photodiode (APD) (SPCM-AQR-13, Perkin Elmer, Waltham, MA). The fibers cores acted as pinholes to ensure confocal detection and had the size of the imaged Airy disk of the fluorescence light. Only the cross-correlation function between the signals detected by the two APDs was used to avoid artefacts due to detector afterpulsing. These correlation functions were computed by a hardware correlator (Flex99R-12/E, Correlator.com). All measurements were performed at 25 $^{\circ}\text{C}$ and at a depth of 20 μm into the bulk solution. The final correlation curve was the average of 3 to 5 acquisitions of 20 seconds each. The observation volume was calibrated using an aqueous solution of sulforhodamine 6G that has a known diffusion coefficient of 414 $\mu\text{m}^2/\text{s}$.²⁷ We obtained a diffusion time of $t_D = 29 \mu\text{s}$. Hence, the lateral waist of the observation volume was $w_0 = 0.22 \mu\text{m}$. All diffusion constants were calculated using this value.

III. Results and discussion

1. Synthesis and characterization of CMC/PEG hydrogels embedded with lipid nanoparticles (LNPs)

Our design of hybrid materials combining a polysaccharide matrix with LNPs is motivated by the need to control LNP release by varying the mechanical properties (i.e. crosslinking density) of the CMC/PEG hydrogel as well as the surface charge and the size of the LNPs.

To synthesize polysaccharide matrices with controlled mechanical properties, CMC was modified with pentenoate groups. The resulting alkene-functional CMC (CMC-p) was crosslinked with a poly(ethylene glycol)-bis(thiol) derivative (PEG-(SH)₂) in PBS, by a thiol-ene reaction performed under UV light ($\lambda = 365 \text{ nm}$) in the presence of the water-soluble photoinitiator, Irgacure 2959. This reaction presents the advantages to process with high efficiency, in short reaction time.^{28,29}

Gel formation was monitored *in situ* by photorheometry by recording the variation of the storage (G') and loss (G'') moduli as a function of time during UV irradiation (Fig. 1a and Fig. S5). The samples were equilibrated for 1.5 min before being exposed to light for a time period of 35 min. Initially, G'' was larger than G' , which reflected the viscous behavior of the sample. After only 5 min of UV light exposure, the storage modulus increased sharply due to the formation of covalent crosslinks, whereas the loss modulus increased negligibly during this time of gel formation. Consequently, there was a crossover point, where G' became higher than G'' . The time required for this crossover to occur is sometimes referred to as the gelation time, although this value depends on the applied frequency.³⁰ During the post-gelation period, the G' curve leveled off until ~10 min, indicating the end of the gelation process.³¹ The steady-state values of G' (G'_{eq}) were used as representative values of the hydrogel elasticity. Fig. 1b shows the frequency sweep profiles of G' and G'' for a CMC/PEG hydrogel prepared using a $[SH]/[=]$ ratio of 0.5. G' was greater than G'' over the whole range of frequencies covered and G' was independent of frequency, which was consistent with the formation of a covalent hydrogel network.³⁰

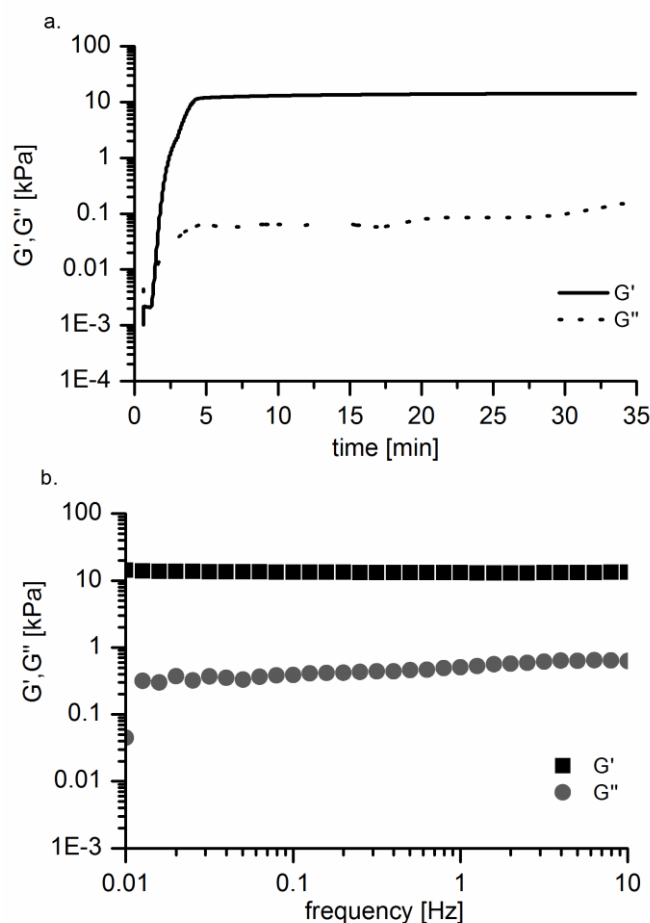


Fig. 1 Analysis of the CMC-pentenoate/PEG-(SH)₂ hydrogel formation by photorheometry (GEL0.5, [SH]/[=] ratio $R = 0.5$): (a) Time dependence of the storage (G' , straight line) and loss (G'' , dotted line) moduli at a fixed frequency (1 Hz); (b) Storage (dark square) and loss (grey round) moduli as a function of the frequency at a stress amplitude of 3.5%.

With the aim to tailor the release kinetics of LNPs, hydrogel samples were prepared by varying the crosslinking density which was controlled by the [SH]/[=] ratio (R). GEL0.5 (corresponding to $R = 0.5$) had an intermediate crosslinking density whereas GEL0.2 ($R = 0.2$) was less cross-linked and GEL1.0 ($R = 1.0$) more cross-linked. The G'_{eq} value and the swelling ratio in PBS for the three networks are shown in Fig. 2. As expected, the highest G'_{eq} value was observed for GEL1.0 (G'_{eq}

~ 21 kPa), whereas GEL0.5 and GEL0.2 displayed G'_{eq} values of ~ 11 kPa and ~ 5.5 kPa, respectively (Fig. 2a). The opposite trend was observed for the swelling ratio, which was lower with higher degree of crosslinking (i.e. higher G'_{eq} , see Fig. 2b).

These hydrogels with different crosslinking density were afterwards subjected to uniaxial compression tests to determine the Young's modulus (E). The compressive moduli E , obtained from the slopes of the linear region of the stress-strain curves (below 20 % deformation) are listed in Table S3 (ESI). Similarly to G' the higher modulus was reached for GEL1.0.

Hybrid LNP-loaded hydrogels were prepared by mixing the particle emulsions with the CMC-p/PEG-(SH)₂ mixtures before UV cross-linking (Scheme 1). LNPs having diameters of ≈ 50 or ≈ 120 nm (respectively referred to as F50 and F120) and different surface charges (neutral (N), positive (+) and negative (-)) loaded with DiI were used to monitor their release from the hydrogel matrix since this lipophilic dye was previously shown to remain entrapped into the particle lipid core for at least 2 months (Fig. S2, ESI).¹⁸ Even if the resolution of confocal fluorescence images was not sufficient to visualize single individual LNPs, fluorescence microscopy was used to evidence the fluorescence of DiI-loaded LNPs inserted into the hydrogel matrix, especially taking into account that this dye only emits in a lipid hydrophobic environment and not in aqueous buffer. The CLSM images of DiI-loaded LNP hydrogels confirmed the presence and the homogeneous distribution of the particles inside the CMC-p/PEG matrix (Scheme 1).

The resulting hydrogels loaded or not with LNPs (F50 or F120 at different particle/CMC payload (w/w)) were characterized by rheology and swelling measurements. For the three CMC/PEG hydrogels, the incorporation of neutral LNPs appeared to have negligible influence on the gelation kinetics, even for high particle/CMC payloads (50% w/w_{CMC}) (Fig. S5, ESI). As can be seen from Fig. 2a and 2b, the gels prepared in the presence of LNPs possessed shear moduli and swelling ratios similar to those of LNP-free hydrogels. These results indicate that the particles entrapped into the polymer network did not hinder the gelation process.

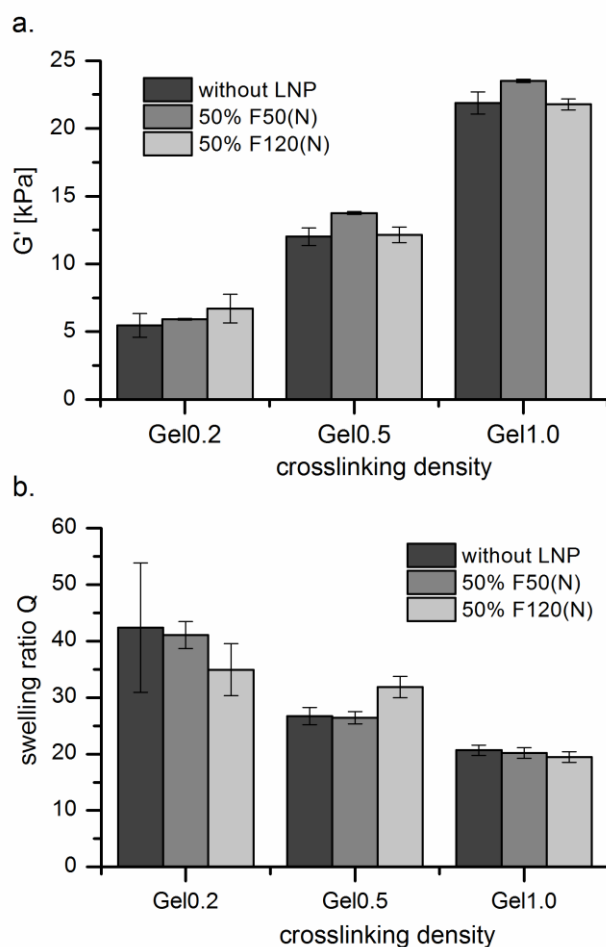


Fig. 2 Rheological properties (G'_{eq} , a.) and equilibrium swelling ratio (Q , b.) of hydrogels with different crosslinking densities loaded or not with LNP with different size (F50 or F120) at a concentration of 50%w/w_{CMC}.

Based on the successful entrapment of neutral LNPs in the hydrogels, we next focused on the synthesis of hydrogels (GEL0.5) loaded with negatively or positively charged LNPs (F50(-) and F50(+), respectively) at 10 % (wt % CMC) and 50 % (wt % CMC). Repulsive or attractive electrostatic interactions, generated by the incorporation of the LNPs in the hydrogels, may affect their mechanical and swelling properties. The properties of the hydrogels were first characterized by oscillatory shear rheometry and compared with the gel containing neutral LNPs and with the control LNP-free gel. Fig. 3a shows that the G'_{eq} value remained unchanged for hydrogels containing

F50(-) and F50(N) LNPs in comparison to the corresponding control LNP-free gel, whatever the LNP concentration (10 % and 50% w/w particle/CMC). The incorporation of F50(+) in the negatively charged hydrogel matrix resulted in a very slight increase of the G'_{eq} modulus compared to the LNP-free gel (especially for the 10% w/w network) that could be due to the fact that positively charged particles provided additional physical crosslinking to the matrix. The Young's modulus (E) of these hydrogels loaded with charged LNPs were also evaluated (Fig. S6, ESI). It is interesting to note that the modulus E followed a trend similar to that observed for modulus G' . As can be seen from Fig. 3b, the presence of charged particles did not affect the swelling behavior of the hydrogels in PBS as already observed with neutral LNPs in the hydrogels GEL0.2, GEL0.5 and GEL1.0.

All together, these results indicate that LNPs loaded in hydrogels up to a concentration of 50% w/w particle/CMC did not significantly affect the mechanical properties of hydrogels.

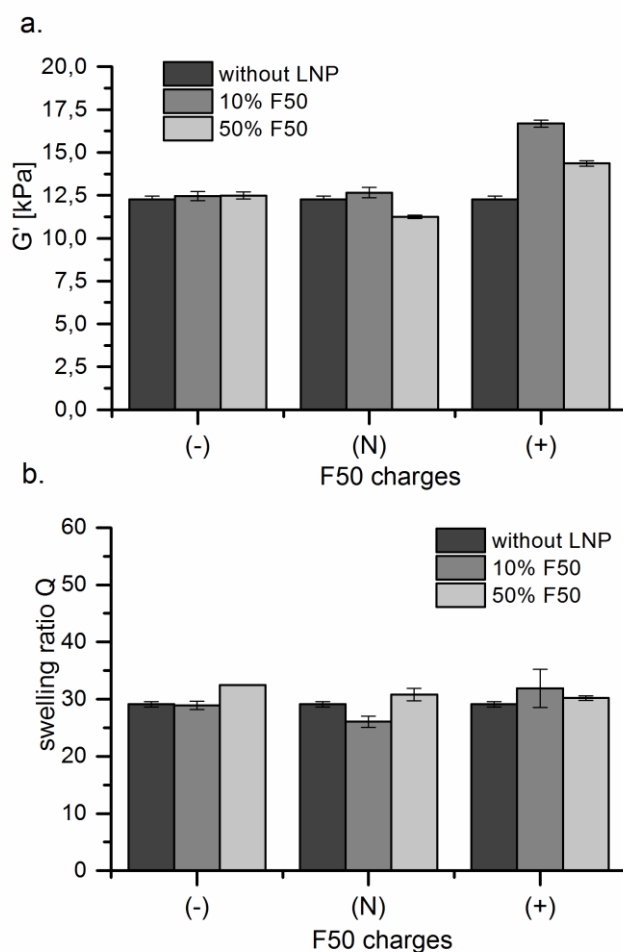


Fig. 3 Rheological properties (G'_{eq} , a.) and equilibrium swelling ratio (Q , b.) of hydrogels GEL0.5 loaded with 10% or 50% w/w particle/CMC of F50(-), F50(N) or F50(+).

2. In Vitro Cytotoxicity Study of LNP loaded Hydrogels

To better support the potential use of prepared hybrid hydrogels as drug delivery patches, WST-1 assay, which quantifies the metabolic activity of cell mitochondria reflecting the density of living cells, was performed using NIH3T3 fibroblasts as cell model. The results for GEL0.5 loaded or not with LNP F50 or F120 are presented in Fig. 4. The density of living cells cultured in medium that was contacted with LNP-free hydrogel (GEL0.5) was comparable to that of the control. This suggests that hydrogel GEL0.5 did not release in the culture medium substances that interfered with cell viability. The density of living cells measured in the supernatant in direct contact with GEL0.5 was about 70% of control, not a hallmark of cytotoxicity, but due to cell uptake in the material which decreased the number of remaining cells in the analyzed supernatant, as confirmed by microscopy analysis. When LNPs were loaded into GEL0.5 at 50% w/w particle/CMC payload, the density of living cells cultured in the supernatant released from the hydrogels decreased in the range of 60-70%. This could be accounted for by partial release of surfactants entering the composition of the LNPs. LNPs present an IC_{50} (concentration at which 50% of cells dye) of about 500 $\mu\text{g/mL}$ in contact with fibroblasts (directly linked to the PEG surfactant concentration entering their composition),¹⁸ and particle concentration was in this range in our gel experiments. However, no significant difference was observed when cells were cultured in direct contact with GEL0.5, GEL0.5+F50 or GEL0.5+F120. The decrease in the density of living cells counted in the supernatant after gel removal observed in all these cases was due to cell uptake in the materials. Hence, the hydrogels seemed to display neither significant cytotoxicity nor stimulatory effect on NIH3T3 fibroblasts, and appeared suitable for applications as biomaterials.

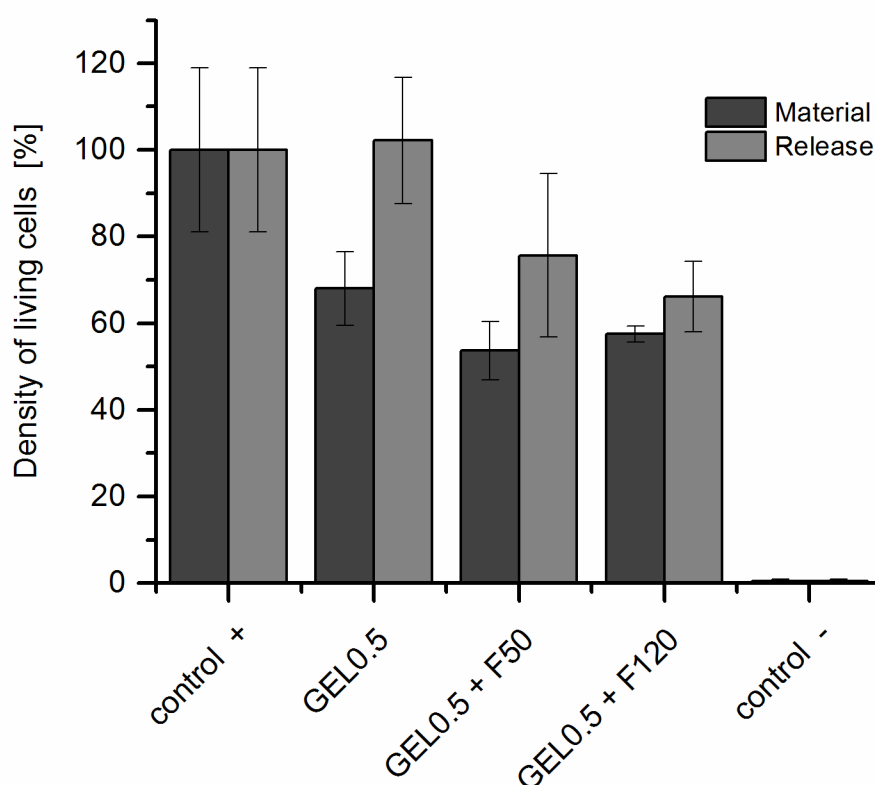


Fig. 4 Density of living NIH3T3 fibroblasts after 24h incubation in direct (material) or indirect (release) contact with GEL0.5 loaded or not with F50/F120 at 50% w/w particle/CMC payload.

3. In vitro release study of LNPs from CMC-PEG hydrogels

Having the different hybrid hydrogels in hand, we investigated the influence of the hydrogel cross-linking density, as well as the size and surface charge of LNPs on the release kinetics of the particles from the networks. In all the experiments, the LNPs were loaded in the hydrogel matrices at a concentration of 50% w/w CMC.

In order to determine with a greater precision the release profiles, the fluorescence was measured from DiI fluorophore incorporated in the LNPs remaining in the hydrogel matrix and subtracted from that of LNPs initially incorporated in the hydrogel matrix (Fig. S3 and S4, ESI). As mentioned above, this lipophilic dye was previously shown to remain inside the LNP core over at least 60 days (Fig. S2, ESI).¹⁸ It should also be noted that the LNPs inside the hydrogel matrix remained stable

for at least 4 weeks. Indeed, the DLS analysis of the LNPs after their recovery from the dissolution material by treatment with NaOH showed that the hydrodynamic diameter and polydispersity index of the particles were not affected over 4 weeks (Fig. S7, ESI). Based on these data, the release profiles measured by fluorimetry were assumed to be related to the release of LNPs.

First, in order to evaluate the influence of the hydrogel crosslinking density on the release of LNPs, F50(N) were loaded into GEL0.2, GEL0.5, GEL1.0 and their release was monitored for 1 month. As can be seen in Fig. 5, LNP release profiles were characterized by a gradual release phase over the first 7 days followed by a very slow phase (further referred to as "plateau phase"). After the first 7 days, ~ 45 , ~ 35 and ~ 12 % of LNPs initially entrapped in the GEL0.2, GEL0.5, GEL1.0, respectively, were released (Fig. 5). At day 30, the amount of LNPs released increased to ~ 50 , ~ 40 and ~ 15 % for the GEL0.2, GEL0.5, GEL1.0, respectively. It appears from these observations that LNPs onto the surface of hydrogels diffused firstly from the initial swelling of the gel. Later, LNPs that were further from the hydrogel surface were slowly released. The release measurements showed a strong dependence of the LNP release on the crosslinking density (i.e. swelling ratio) of the hydrogels (Fig. 5). A decrease in the crosslinking density resulted in an increase of the LNP release after 30 days. The difference of released LNPs between the 3 types of gels at day 30 was mostly attributed to size restrictions on particle diffusion out of the hydrogel based on the relationship between particle size and mesh size. In this regard, the CMC mesh size of the three hydrogels was estimated from swelling ratio data using the Flory-Rehner equation³² (ESI). This calculation revealed average CMC mesh sizes of 33 nm, 46 nm and 86 nm for the 21 kPa (GEL1.0), 11 kPa (GEL0.5) and 5.5 kPa (GEL 0.2) hydrogels, respectively. These values are rather maximal values of the network mesh size, since the PEG polymer chains certainly add hindrance to the network. Nanoparticle diffusion was observed even for GEL0.5 and GEL1.0 presenting mesh size (resp. 46 nm and 33 nm) smaller than the F50(N) particle diameter (52 nm when

expressed on a scattered light intensity basis, Table 1), suggesting that diffusion of the LNPs occurred thanks to the elastic properties of the gel network and of the nanoparticles, which lipid core could present some deformability. Indeed, it was previously observed that lipid nanoparticles could permeate through membranes which pore sizes was smaller than their diameter.³³ Moreover, F50(N) particle size distribution when expressed on a number basis displayed a mean particle diameter of 35 ± 5 nm with peak width of 8.9 ± 1.1 nm (Table 1), meaning that a part of the particle population displayed diameter smaller than the mesh size even for these gels with higher crosslinking densities. For the more crosslinked material (GEL1.0), the nanoparticles escaping the gel could be mainly located near the hydrogel surface and/or display smaller diameter.

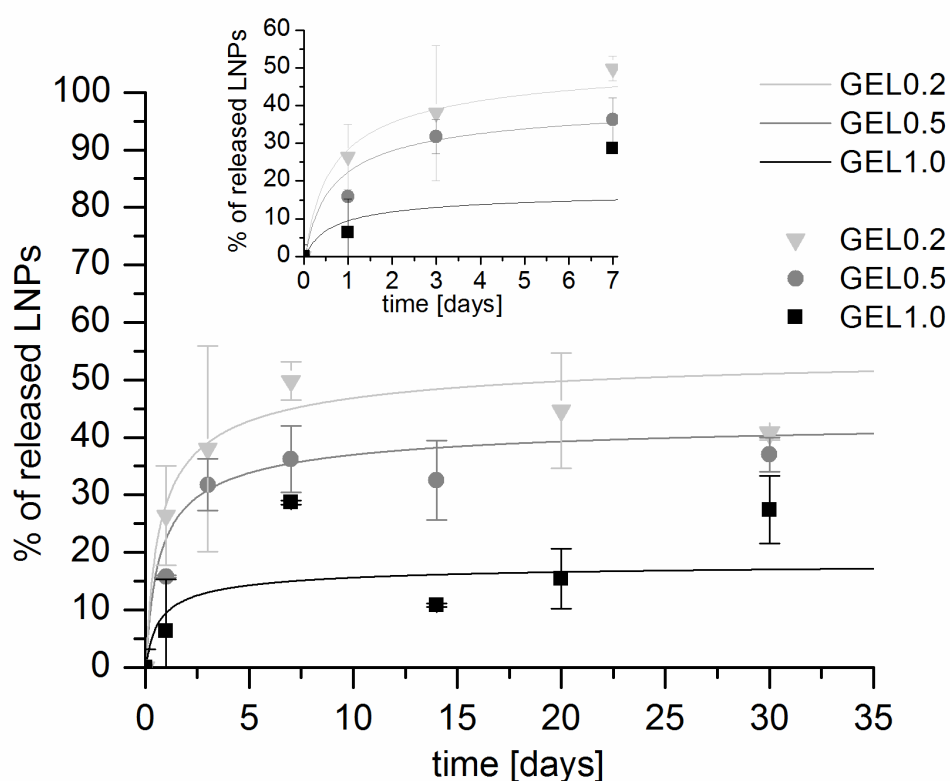


Fig. 5 Influence of the gel cross-linking density on the kinetics of release of F50(N) LNPs (gels loaded at 50% w/w particle/CMC) (line: model values; symbols: experimental values). Release profiles over 1,500 h (bottom) – Zoom of release profiles over initial 250 h (top).

To gain insight into the release mechanism of LNPs, the release curves were modeled using Fick's second law of diffusion taking into account steric hindrance effects caused by the presence of the gel network. The Fick's second law was shown to be efficient to predict the diffusion of a broad range of molecules, including small molecular weight drugs and biomacromolecules like proteins, once an appropriate diffusion coefficient was obtained.²⁶ Here, it was adapted to the delivery of nanoparticles by including additional parameters related to crosslinking density of hydrogels and physical-chemical properties of the loaded LNPs.²⁵

The model hypothesized that the physical presence of the network created a difficulty for diffusion of entrapped LNPs. A steric hindrance factor χ was thus calculated which was based on the relative length occupied by the LNPs (see experimental section). This steric hindrance factor was modulated according to the possible interactions between the network and the LNPs, and the elasticity of the structure. As the crosslinking density increased, χ increased too, meaning that the length dedicated to LNPs to diffuse was shorter. It was the total polymer mass which impacted the value of the χ factor.

As shown in Fig. 5, the resulting model showed a good fit with the experimental release profiles from all gels. Variations between calculated and experimental release were lower than 10 % at any time. Adequacy between experimental data and mathematical model confirms the hypothesis that LNP release was driven by diffusion mechanism.

Interestingly, by varying the LNP size or the LNP surface charge, it was possible to independently modulate the initial gradual release phase and the plateau phase. When F50(N) and F120(N) were loaded into the intermediate GEL0.5, a faster initial release was observed for the smaller particles, F50(N), over the first 7 days (~168 h) (Fig. 6). Nevertheless, the maximum release of LNPs reached after 30 days appeared to be similar for both particle types. The mathematical model, which took into account the difference in the diffusion coefficients of the LNPs (which were directly related to the hydrodynamic radius of the particles according to the Stokes-Einstein

equation), corroborated the experimental results for the release of F50. The experimental measures demonstrated however a lower initial kinetic release of F120 than the one calculated by the model (Fig. 6). Additional processes than pure diffusion certainly should be taken into account in this case.

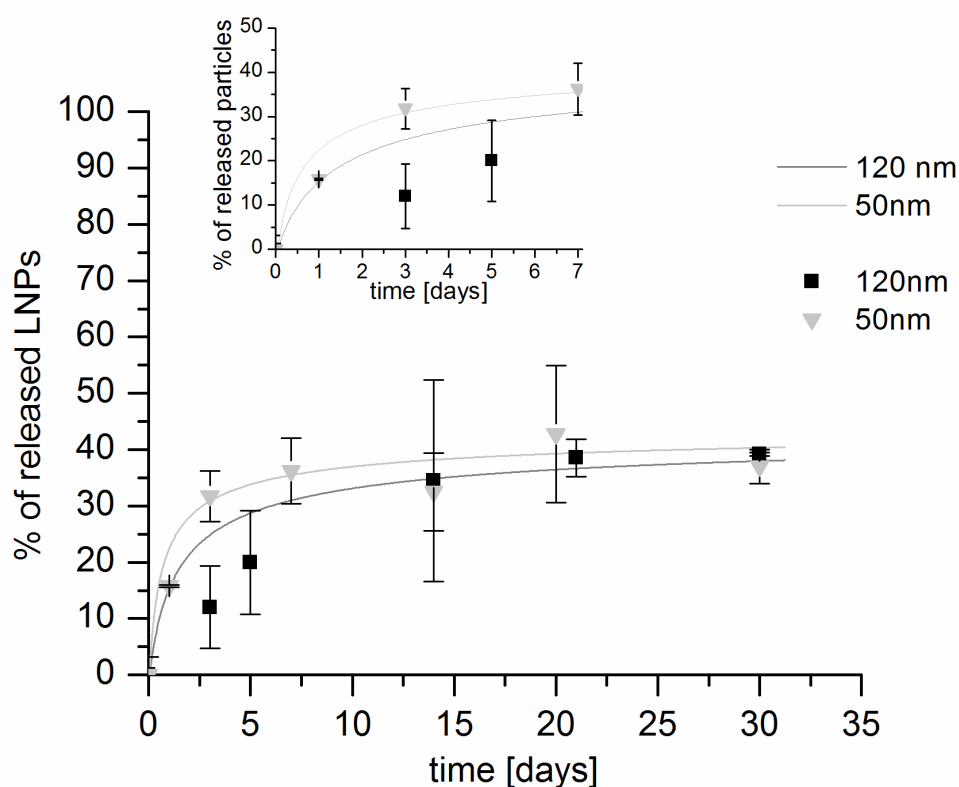


Fig. 6 Influence of the LNP size on the kinetics of release of F50(N)/F120(N) from GEL0.5 (gels loaded at 50% w/w particle/CMC). (line: model values; symbols: experimental values). Release profiles over 1,500 h (bottom) – Zoom of release profiles over initial 250 h (top).

On the other hand, when LNPs possessing a similar size but different surface charges, namely F50(-), F50(N) and F50(+), were incorporated in GEL0.5, the amount of LNPs released in the plateau phase was significantly different and followed the trend $F50(-) > F50(N) > F50(+)$. Notably, at day 30, the greatest release of 60 % of the initially encapsulated LNPs was obtained for

F50(-), whereas only 15 % of F50(+) were released. These results thus show that electrostatic interactions between surface charged LNPs and CMC polymer chains played a key role in LNP release from the hydrogel network. In this case, the mathematical model in which the steric hindrance factor χ was modulated according to the ionic charges of LNPs, fitted well with the experimental data (Fig. 7).

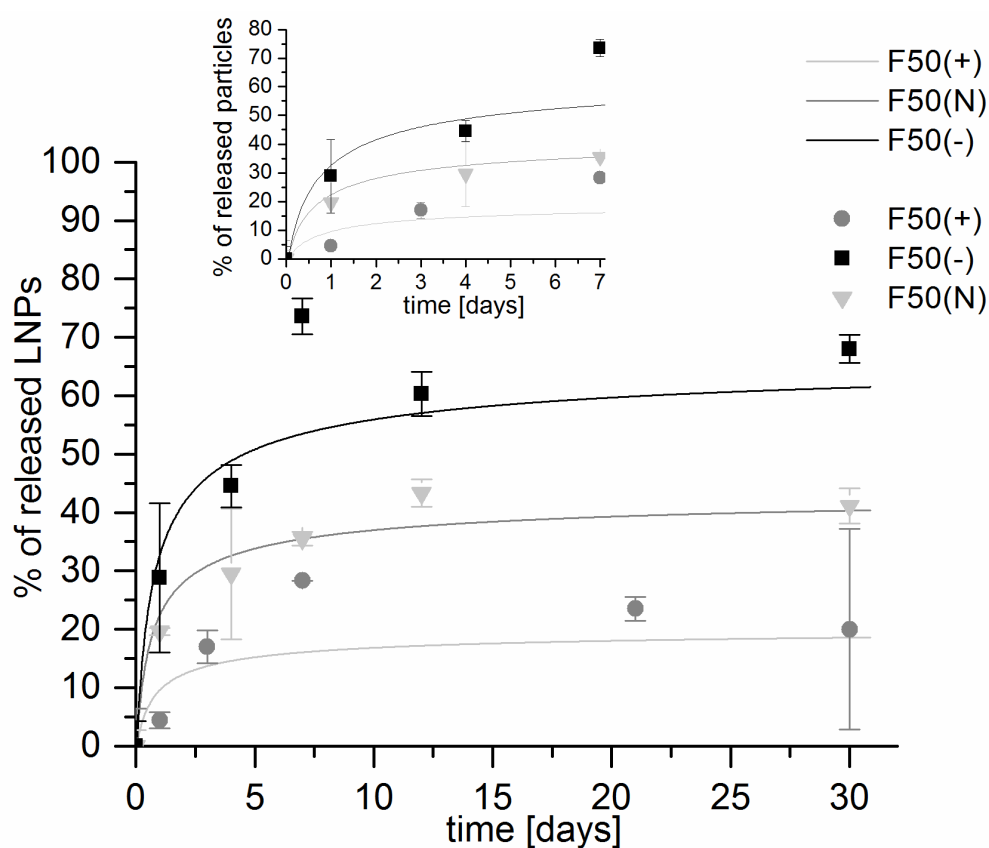


Fig. 7 Influence of the particle charge on the kinetics of release of F50 LNPs loaded at 50% w/w particle/CMC payload in GEL0.5. (line: model values; symbols: experimental values). Release profiles over 1,500 h (bottom) – Zoom of release profiles over initial 250 h (top).

According to these results, a simple and efficient way to control and adjust the initial rate of LNP release should be to vary their size. The final amount of released particles could be fine-tuned according to the gel mechanical properties as well as the surface charge of LNPs.

4. Measurement of LNP integrity

LNP integrity in the gels was demonstrated by fluorescence and DLS measurements since intact nanoparticles were recovered quantitatively shortly (within 1 h) after gel dissolution in NaOH, even after storage of the materials for a few weeks (ESI, Fig. S2, S3, S4, S7). Direct Dynamic Light Scattering (DLS) measurements of the gel supernatant could not be conducted with confidence since too poor signal was obtained most of the time, even after particle concentration. As an example, DLS measurements of initial F50, F50 obtained after dissolution of the hydrogel by NaOH treatment, and of the supernatant of F50 loaded GEL0.5 at 50%w/w_{CMC} (after concentration) are displayed in Fig. S8, ESI. Whereas particles entrapped in the gel presented diameters similar to that of free LNPs, as already stated above, two populations of ~ 30 nm and ~ 250 nm diameter were evidenced by DLS in the supernatant (Fig. S8). The DLS data suggested partial destabilization of LNPs when released from the gels with possible formation of micelles and aggregates. We previously determined that such lipid nanoparticles were stable in solutions for concentrations above 2-5 mg/mL of lipids but destabilized in the long-term (24 h and more) in more diluted conditions.^{21,}

34

In order to get more insight in the integrity of LNPs released from the hydrogels, we also performed FCS (fluorescent correlation spectroscopy) experiments using DiI-labeled nanoparticles. FCS is a technique widely used to determine the diffusion coefficient of fluorescent molecules,³⁵ and is sensitive enough to measure even a very low concentration (nanomolar) of molecules or particles. Here, the aim was to compare the diffusion coefficient of free LNPs, with the one of LNPs released from the hydrogels. FCS measurements were performed on free LNPs (F50(N)) in a PBS solution, and at day 7 on the supernatant of GEL0.2 and GEL0.5 containing F50(N) (GEL0.2+50%F50 and GEL0.5+50%F50). To fit the autocorrelation curve $\langle G(\tau) \rangle$, a two species diffusion model, similar to that used to fit measurements performed on micelles dispersed into hyaluronic acid gels,³⁶ was applied. Autocorrelation curves presented in Fig. 8 revealed that respectively 25% and 18% of

fluorescent particles detected in the supernatant of GEL0.2+50%F50 and GEL0.5+50%F50 had a diffusion coefficient close to that of free LNPs ($D=3.3 \mu\text{m}^2/\text{s}$) (Table S4, ESI). These particles were considered as intact LNPs. The remaining 75% and 82% of the fluorophore population had a higher diffusion coefficient, similar to that of small free molecules like rhodamine 6G. DiI forms non-emissive aggregates in hydrophilic media, but the small detected fluorescent structures could be DiI-loaded micelles formed from the shell phospholipids of LNPs.

All together, these data suggest that LNPs could be released (at least partially) intact from the hydrogels (since species with fluorescence diffusion coefficients similar to free LNPs were observed) but underwent destabilization in the few hours following their release in the very diluted conditions of the experiments (Fig. S3 and S4, ESI). In applications of such hybrid hydrogel systems for lipophilic drug delivery, the medium of particle release (for instance skin contact or muscle) could be very different than phosphate buffer and such dilution effects could not occur. At the end, it is highly desirable that the particle deliver their payload in a few hours on the site of the system implantation.

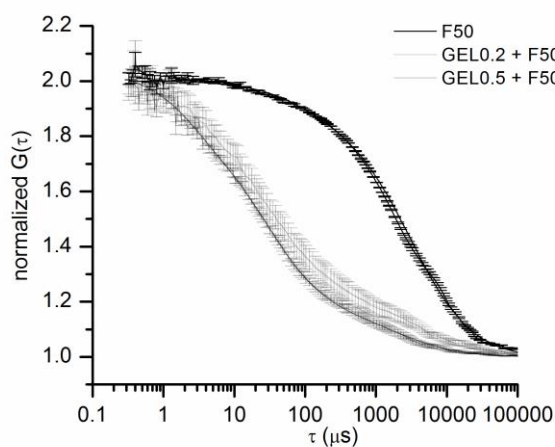


Fig. 8 FCS analysis of free F50 in PBS, and PBS supernatants at day 7 of GEL0.2 and GEL0.5 loaded with 50% F50 w/w particle/CMC.

IV. Conclusions

Original hybrid systems composed of LNPs entrapped within chemically crosslinked carboxymethyl-cellulose/PEG hydrogels were designed to achieve prolonged therapeutic action of hydrophobic drugs over an extended period of time. LNPs were included in the matrix with high payloads without negatively affecting the material properties. Despite steric hindrance effects caused by the presence of the gel, the elasticity of the network and of the particles allowed programmable and sustained release of the LNPs according to the particle and hydrogel design parameters. Indeed, the initial LNP release rate could be prolonged by increasing the LNP diameter from 50 nm to 120 nm while the amount of long-term released LNPs could be adjusted by tailoring the surface charge of the particles and the crosslinking density of the polymer network. The greatest amount of released particles was achieved with the softest GEL0.2 and negatively charged LNPs. A mathematical diffusion model based on Fick's second law was developed to better understand the relationship between hybrid gel properties and release profiles. This model, which took into account steric hindrance effects caused by the presence of the gel network, was shown to be efficient to predict the diffusion of large particles such as LNPs from the dense hydrogels. It was found that part of the particles released out of the gel matrix were destabilized in a few hours in PBS buffer. Such a destabilization was likely due to high dilution of the LNPs after their diffusion out of the matrix as the measurement of particle properties inside the hydrogel demonstrated their stability. The incorporation of LNPs in crosslinked CMC/PEG hydrogels thus represents a promising strategy for sustained and controlled release of hydrophobic drugs.

Acknowledgements

We thank Alexia Marcone and Mathilde Menneteau for the cytotoxicity experiments and the NMR platform of ICMG (FR2607) for its support. We acknowledge the Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives (CEA) for financial support. LETI/DTBS and CERMAV

are part of the Arcane Labex program, funded by the French National Research Agency (ARCANE project n° ANR-12-LABX-003).

Electronic Supplementary Information (ESI) available: Detailed formulations of particles and gels; ^1H NMR spectrum of CMC-pentenoate; Kinetics of gelation followed by *in situ* photorheometry; Material stress-strain curves and compression moduli; Fluorescence particle stability data; Dynamic Light Scattering data; Calculation of material mesh size; Detailed output of FCS data fitting.

References

- 1 C.-C. Lin and A. T. Metters, *Adv. Drug Delivery Rev.* 2006, **58**, 1379-1408.
- 2 N. Bhattarai, J. Gunn and M. Zhang, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2010, **62**, 83-99.
- 3 N. Annabi, A. Tamayol, J. A. Uquillas, M. Akbari, L. E. Bertassoni, C. Cha, G. Camci-Unal, M. R. Dokmeci, N. A. Peppas and A. Khademhosseini, *Adv. Mater.*, 2014, **26**, 85-124.
- 4 N. A. Peppas, P. Bures, W. Leobandung and H. Ichikawa, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2000, **50**, 27-46.
- 5 T. Coviello, P. Matricardi, C. Marianecchi and F. Alhaique, *J. Controlled Release*, 2007, **119**, 5-24.
- 6 T. R. Hoare and D. S. Kohane, *Polymer*, 2008, **49**, 1993-2007.
- 7 W. Gao, D. Vecchio, J. Li, J. Zhu, Q. Zhang, V. Fu, J. Li, S. Thamphiwatana, D. Lu and L. Zhang, *ACS Nano*, 2014, **8**, 2900-2907.
- 8 E. Ruel-Gariépy, G. Leclair, P. Hildgen, A. Gupta and J. C. Leroux, *J. Controlled Release*, 2002, **82**, 373-383.
- 9 A. Billard, L. Pourchet, S. Malaise, P. Alcouffe, A. Montembault and C. Ladaviere, *Carbohydrate Polymers*, 2015, **115**, 651-657.
- 10 P. Thoniyot, M. J. Tan, A. A. Karim, D. J. Young and X. J. Loh, *Adv. Sci.*, 2015, **2**, 1400010.
- 11 S. Grijalvo, J. Mayr, R. Eritja and D. D. Diaz, *Biomater. Sci.*, 2016, **4**, 555-574.

- 12 F. Zhao, D. Yao, R. Guo, L. Deng, A. Dong and J. Zhang, *Nanomater.*, 2015, **5**, 2054-2130.
- 13 J. Hurler, S. Žakelj, J. Mravljak, S. Pajk, A. Kristl, R. Schubert and N. Škalko-Basnet, *Int. J. Pharm.* 2013, **456**, 49-57.
- 14 A. Alinaghi, M. R. Rouini, F. Johari Daha and H. R. Moghimi, *Int. J. Pharm.*, 2014, **459**, 30-39.
- 15 L. K. Widjaja, M. Bora, P. N. P. H. Chan, V. Lipik, T. T. L. Wong and S. S. Venkatraman, *J. Biomed. Mat. Res. Part A*, 2014, **102**, 3056-3065.
- 16 R. J. H. Stenekes, A. E. Loebis, C. M. Fernades, D. J. A. Crommelin and W. E. Hennink, *Int. J. Pharm.*, 2001, **214**, 17-20.
- 17 V. DiTizio, C. Karlgard, L. Lilge, A. E. Khoury, M. W. Mittelman and F. DiCosmo, *J. Biomed. Mater. Res.*, 2000, **51**, 96-106.
- 18 J. Gravier, F. Navarro, T. Delmas, F. Mittler, A. C. Couffin, F. Vinet and I. Texier, *J. Biomed. Opt.*, 2011, **16**, 096013.
- 19 A. Guillot, A. Couffin, X. Sejean, F. P. Navarro, M. Limberger and C. M. Lehr, *Pharm. Res.* 2015, **32**, 3999-4009.
- 20 F. P. Navarro, G. Creusat, C. Frochot, A. Moussaron, M. Verhille, R. Vanderesse, J.-S. Thomann, P. Boisseau, I. Texier, A.-C. Couffin and M. Barberi-Heyob, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 2014, **130**, 161-169.
- 21 J. Mérian, R. Boisgard, P. A. Bayle, M. Bardet, B. Tavitian and I. Texier, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2015, **93**, 1-10.
- 22 T. Delmas, H. Piraux, A.-C. Couffin, I. Texier, F. Vinet, P. Poulin, M. E. Cates and J. Bibette, *Langmuir*, 2011, **27**, 1683-1692.
- 23 T. Delmas, A. C. Couffin, P. A. Bayle, F. D. Crécy, E. Neumann, F. Vinet, M. Bardet, J. Bibette and I. Texier, *J. Colloid Interface Sci.*, 2011, **360**, 471-481.

- 24 W.-C. Lin, W. Fan, A. Marcellan, D. Hourdet and C. Creton, *Macromolecules*, 2010, **43**, 2554-2563.
- 25 M.-C. Klak, E. Lefebvre, L. Rémy, R. Agniel, J. Picard, S. Giraudier and V. Larreta-Garde, *Macromolecular Biosci.*, 2013, **13**, 687-695.
- 26 M.-C. Klak, J. Picard, S. Giraudier and V. Larreta-Garde, *Soft Matter*, 2012, **8**, 4750-4755.
- 27 C. B. Müller, A. Loman, V. Pacheco, F. Koberling, D. Willbold, W. Richtering and J. Enderlein, *EPL (Europhysics Lett.)*, 2008, **83**, 46001.
- 28 J. Mergy, A. Fournier, E. Hachet and R. Auzély-Velty, *J. Polymer Sci. Part A: Polymer Chem.*, 2012, **50**, 4019-4028.
- 29 P. M. Kharkar, M. S. Rehmann, K. M. Skeens, E. Maverakis and A. M. Kloxin, *ACS Biomater. Sci. Engin.*, 2016, **2**, 165-179.
- 30 G. M. Kavanagh and S. B. Ross-Murphy, *Progress Polymer Sci.*, 1998, **23**, 533-562.
- 31 E. Hachet, H. Van Den Berghe, E. Bayma, M. R. Block and R. Auzély-Velty, *Biomacromolecules*, 2012, **13**, 1818-1827.
- 32 N. A. Peppas and E. W. Merrill, *J. Polymer Sci.: Polymer Chem. Ed.* 1976, **14**, 441-457.
- 33 S. Hirsjärvi, G. Bastiat, P. Saulnier and J.-P. Benoît, *Int. J. Pharm.*, 2012, **434**, 460-467.
- 34 J. Gravier, L. Sancey, S. Hirsjärvi, E. Rustique, C. Passirani, J. P. Benoit, J. L. Coll and I. Texier, *Mol. Pharm.*, 2014, **11**, 3133-3144.
- 35 R. Erhardt, M. Zhang, A. Böker, H. Zettl, C. Abetz, P. Frederik, G. Krausch, V. Abetz and A. H. E. Müller, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 3260-3267.
- 36 L. Xiao, Z. Tong, Y. Chen, D. J. Pochan, C. R. Sabanayagam and X. Jia, *Biomacromolecules*, 2013, **14**, 3808-3819.

Time-controllable lipophilic-drug release system designed by loading lipid nanoparticles into polysaccharide hydrogels

Electronic Supplementary Information

Lisa Racine^{a,b}, Aynur Guliyeva^b, Irène Wang^c, Véronique Larreta-Garde^d, Rachel Auzély-Velty^{b,*}
and Isabelle Texier^{a,*}

1. LNP formulation

Table S4 Details of lipid nanoparticle formulations

	Quantity (mg)			
	F120 (N)	F50 (N)	F50 (+)	F50 (-)
Refined soybean oil	150	85	67.2	85
Suppocire NC™	450	255	22.4	255
Dil dye	0.75	0.75	0.75	0.75
Lipoid S75™	45	65	2.2	33
DOTAP (cationic surfactant)	-	-	15	-
Hostaphat CC100 (anionic surfactant)	-	-	-	32
Myrjs40™ (neutral surfactant)	215	345	43.1	345
Glycerol	-	-	1000	-
Aqueous medium (154 mM NaCl)	qsp 2 ml	qsp 2 ml	qsp 2 ml	qsp 2 ml

2. Pentenoate grafted CMC: ^1H NMR spectrum

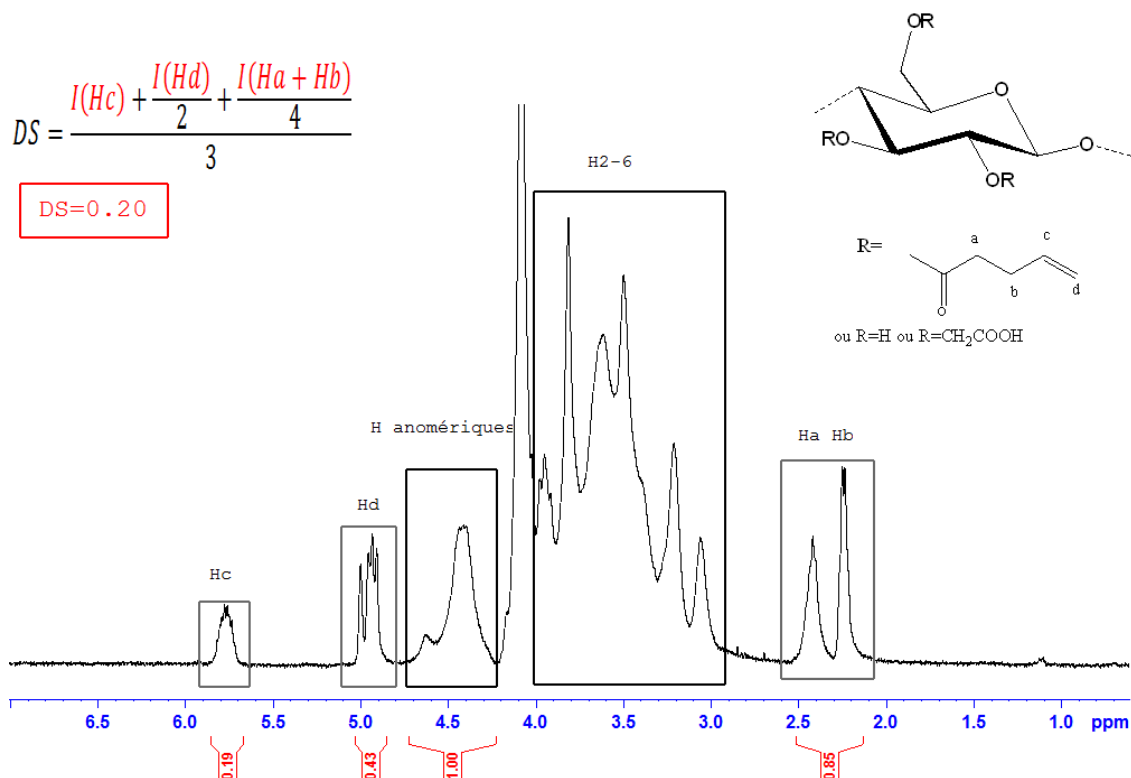


Fig. S3 ^1H NMR spectrum (400 MHz, 80 °C, 6 mg/mL in D₂O) of pentenoate-modified CMC. Digital integration of the NMR signals arising from the Ha, Hb, Hc and Hd of the pentenoate group and anomeric protons of CMC gives a substitution degree of 20% for the pentenoate group.

3. Hydrogel composition

Table S5 Detailed composition of the different CMC-PEG/LNP hydrogel systems

	CMC (mg)	PEG(SH) ₂ (mg)	R[SH]/[=]*	Irgacure 2959 (mg)	LNP (mg)	V _{PBS} (mL)
GEL0.2	30	8	0.2	1	-	1
GEL0.5	30	22	0.5	1	-	1
GEL1.0	30	44	1.0	1	-	1
GEL0.2+F120/F50 50%	30	8	0.2	1	15	1
GEL0.5+F120/F50 50%	30	22	0.5	1	15	1
GEL1.0+F120/F50 50%	30	44	1.0	1	15	1
GEL0.5+F120/F50 10%	30	22	0.5	1	3	1

*molar ratio of pentenoate groups of CMC over thiol groups of PEG-(SH)₂

4. Fluorescence stability of dye-loaded LNP in 1) gel-mimicking environment, 2) in conditions mimicking 10% of release of particles from the gel to 1 mL of 1X PBS and 3) in conditions mimicking dissolution of the gel (NaOH treatment) entrapping 10% of initial particle payload

The fluorescence stability of the particles in conditions mimicking the interior of the swollen gels (particle local concentration of 4-10 mg/mL) was assessed by fluorescence measurement (Tecan microplate reader) of particle dispersion in 1X PBS at a concentration of 5 mg/mL (Fig. S2). We observe that 85% of the fluorescence of the particles is maintained for at least 2 months (in 1X PBS).

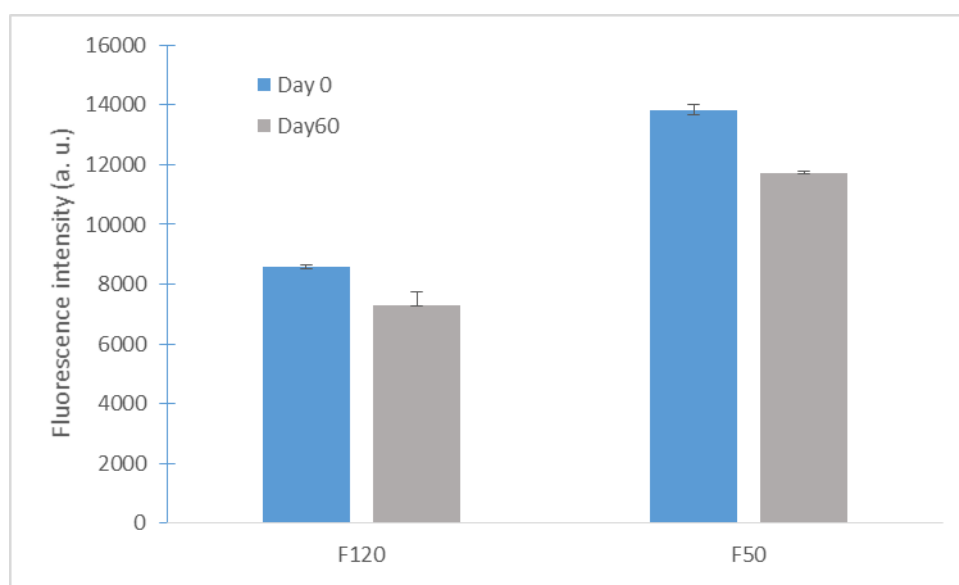


Fig. S2 Fluorescence intensity of F120-DiI and F50-DiI particles in 1X PBS at 5 mg/mL at day 0 and after 60 days.

Fluorescence stability measurements of F120-DiI and F50-DiI particles at a concentration of 0.063 mg/mL in 1X PBS or 0.1M NaOH were performed (Tecan microplate reader) (Fig. S3 and S4). This concentration corresponds to about 10% of released particles from the hydrogels in 1 mL buffer.

When the buffer is 1X PBS, this experiment mimics the fluorescence stability of the particles released in the buffer. We observe that in such diluted conditions, the particles partly loose their fluorescence in 1 day as they destabilize as observed in previous experiments [1,2] and as confirmed by the FCS experiments.

When the buffer is 1 mL 0.1M NaOH, this experiment mimics the fluorescence stability of the particles entrapped in the hydrogel during the gel dissolution process (15 minutes) and fluorescence

quantitation (40 minutes maximum). We observe that more than 80% of the fluorescence of the particles is preserved during gel dissolution and entrapped particle quantitation by fluorescence.

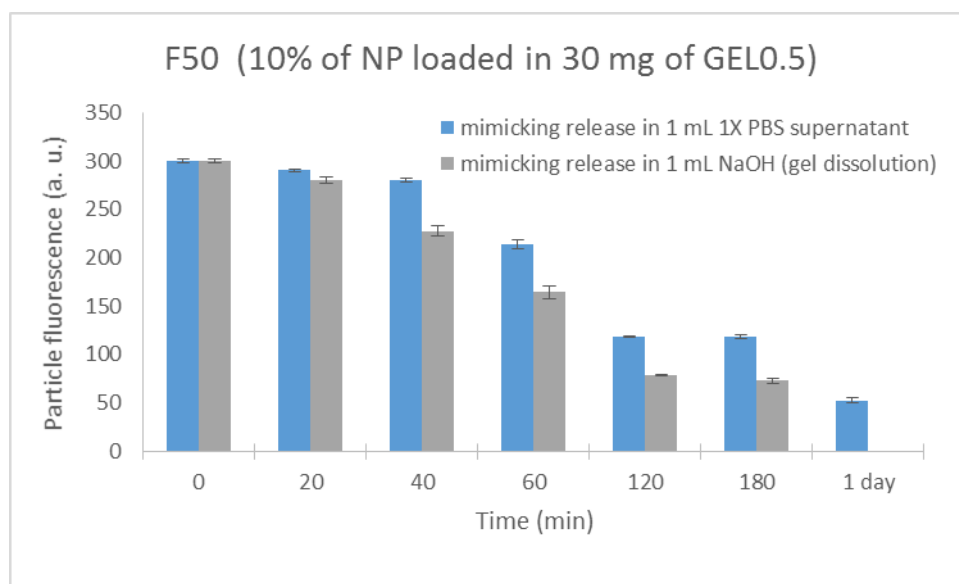


Fig. S3 Fluorescence intensity of F50-DiI particles at 0.063 mg/mL in 1X PBS or 0.1M NaOH.

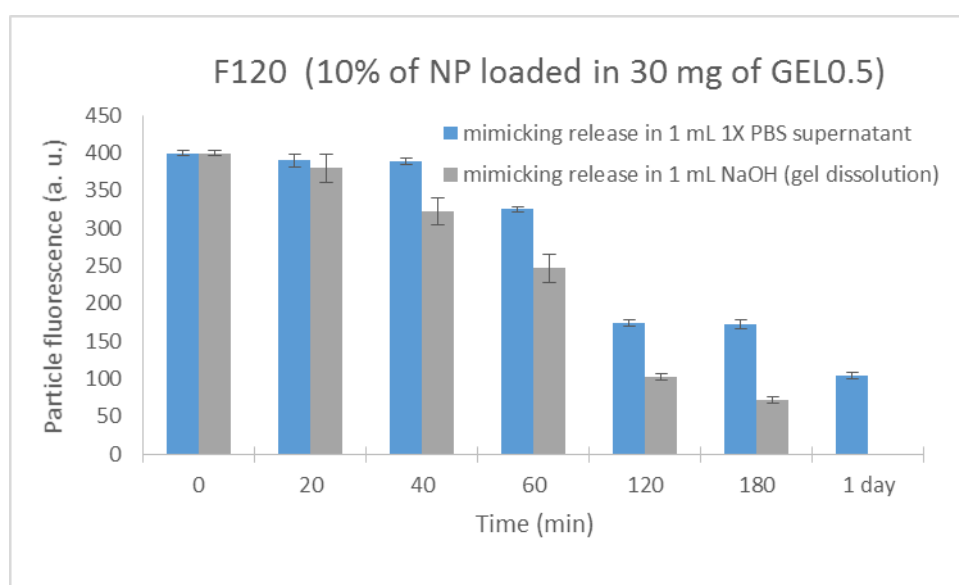


Fig. S4 Fluorescence intensity of F120-DiI particles at 0.063 mg/mL in 1X PBS or 0.1M NaOH.

5. Kinetics of gelation followed by *in situ* photorheometry

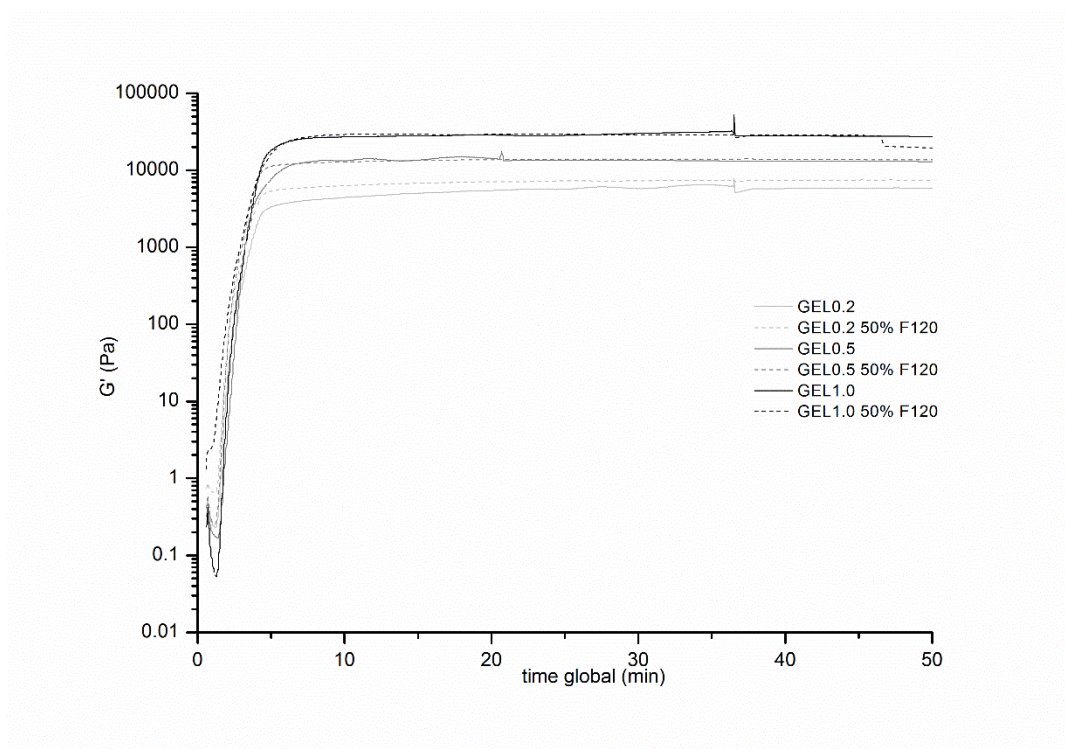


Fig. S5 Kinetics of gelation of GEL 0.2, GEL0.5 and GEL1.0 with and without 50% of F120(N).

5. Stress-strain curves

Table S3 Compressive moduli of CMC/PEG hydrogels prepared with various crosslinking densities (duplicate experiments)

Material	Compressive modulus E (kPa)
GEL0.2	5.0 ± 0.2
GEL0.5	14.3 ± 1.6
GEL1.0	20.3 ± 1.4

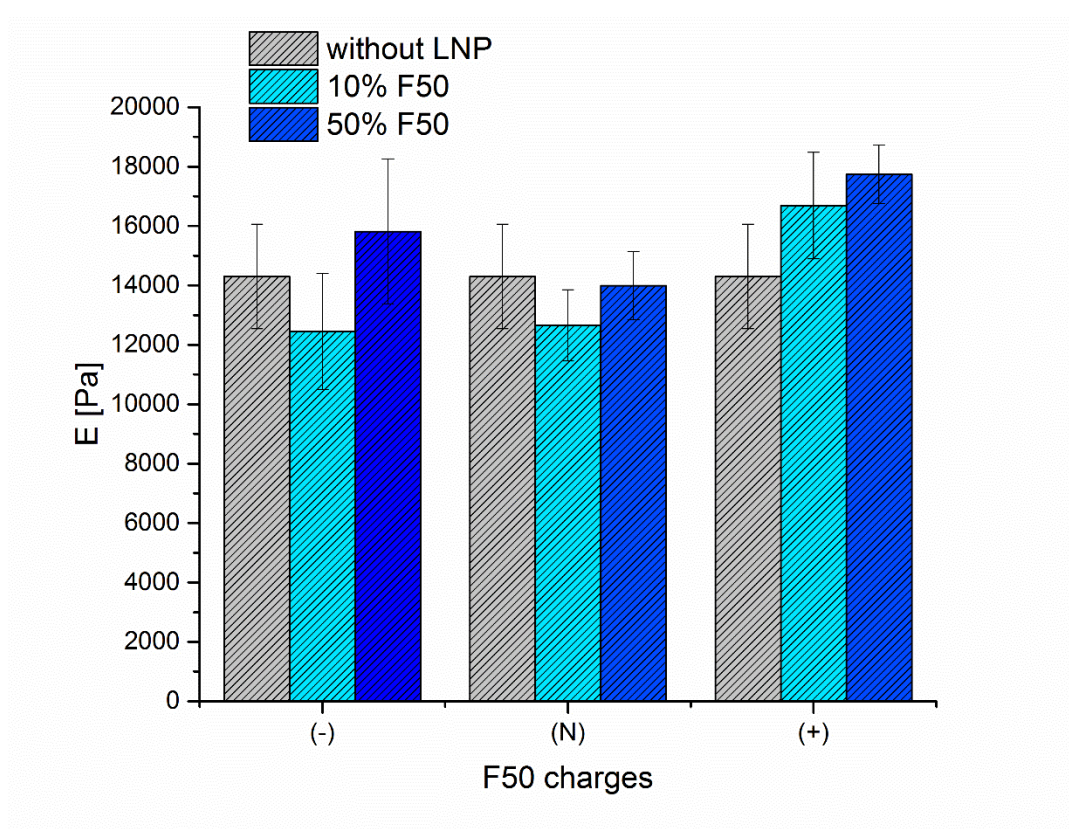


Fig. S6 Compressive moduli E obtained from the stress-strain curves of compressive tests.

7. Dynamic Light Scattering (DLS)

Size and polydispersity of LNPs F50 and F120 entrapped, then released upon CMC-PEG hydrogel degradation, were measured by DLS for GEL0.5. Recovered LNPs were slightly bigger than their initial size (71 ± 7 nm / 140 ± 5 nm versus 52 ± 2 nm / 119 ± 5 nm before gel loading) and their dispersion displayed an increased polydispersity (0.24 ± 0.07 / 0.18 ± 0.01 versus 0.12 ± 0.01 / 0.11 ± 0.01 before gel loading) (Fig. S7). After their inclusion in the matrices, some polymer chains were probably coating the nanoparticle surface, accounting for their increase of size and polydispersity. However, we observed that the diameter and the polydispersity index of the nanoparticles extracted from the hydrogels were constant with material incubation time for at least 2 months.

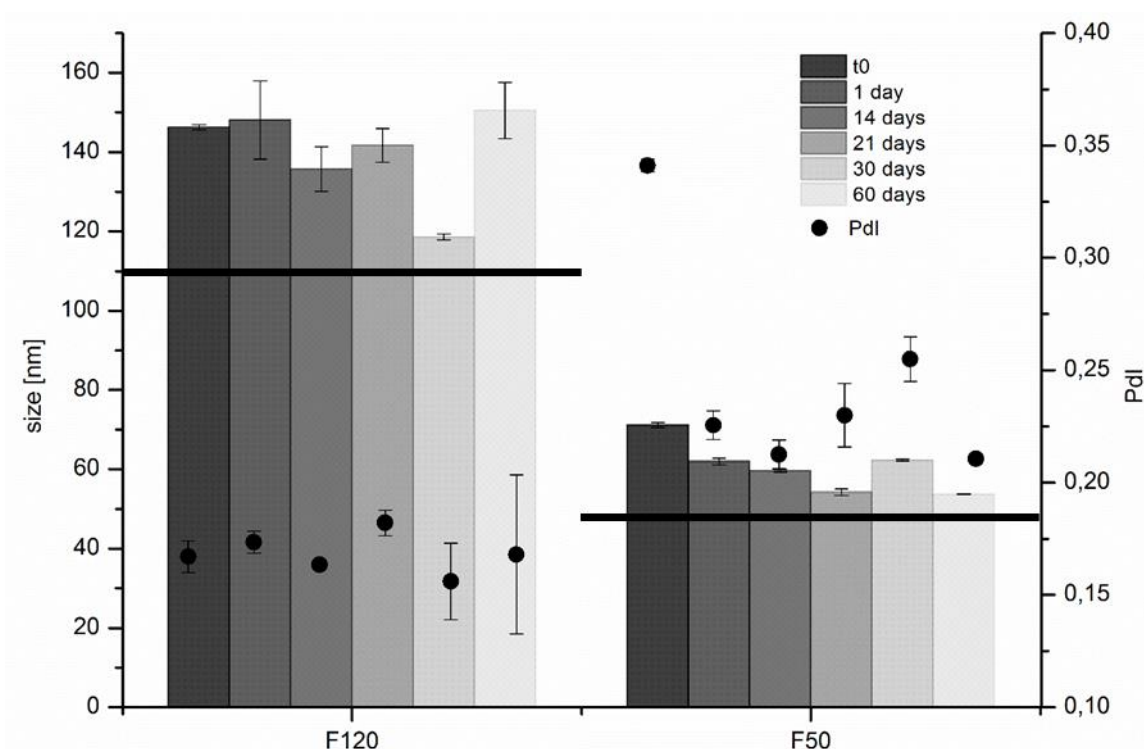


Fig. S7 Hydrodynamic diameter and polydispersity index of F50(N) and F120(N) particles entrapped within the gels (at 50% w/w particle/CMC) then released upon material degradation in NaOH 0.1 M according to DLS measurements (straight black line is the reference size of LNPs in PBS before encapsulation into gels).

8. Mesh size

The method of Peppas and Merrill [3] was used to estimate the mesh size of swollen CMC/PEG hydrogels. The physical parameters of CMC/PEG were assumed to be the same as those of CMC. The molecular weight between crosslinks M_c was first calculated using the experimentally determined swelling weight ratio Q_M and the polymer volume fraction, as below:

$$\frac{1}{M_c} = \frac{2}{M_n} - \frac{\frac{v}{V_1} \left[\ln(1 - v_{2,s}) + v_{2,s} + \chi^{FH} v_{2,s}^2 \right]}{v_{2,r} \left[\left(\frac{v_{2,s}}{v_{2,r}} \right)^{1/3} - \frac{1}{2} \left(\frac{v_{2,s}}{v_{2,r}} \right) \right]}$$

where,

M_n = Average molecular weight of the polymer chains = 70,000 g/mol;

v = specific volume of bulk cellulose = 0.621 cm³/g [4];

V_1 = Molar volume of solvent (assumed to be the same as water) = 18 cm³/mol;

$v_{2,s}$ = Equilibrium swollen polymer volume fraction = $1/Q_V = v / Q_M$ (for water);

$v_{2,r}$ = Polymer volume fraction;

χ^{FH} = Flory-Huggins interaction parameter for CMC in water = 0.45 [5].

M_c was used to calculate the mean square end-to-end distance of the free chain $(r_0)^2$ as

$$r_0^2 = l^2 \left(\frac{2M_c}{M_r} \right) C_n$$

where

l = Length of a virtual bond spanning a monosaccharide unit (defined from glycosidic oxygen to glycosidic oxygen) = 0.545 nm [6];

M_r = Molecular weight of the repeat unit = 221 g/mol for sodium CMC;

C_n = Flory characteristic ratio of CMC ~ 11.5 [7].

The mesh size ξ of the swollen hydrogel was then calculated as:

$$\chi = v_{2,s}^{-1/3} (r_0^2)^{1/2}$$

8. Fluorescence Correlation Spectroscopy

Table S4 Data obtained by fitting the FCS results of a fresh diluted solution of F50 (0.06 mg/mL), the supernatant at day 7 of F50 loaded GEL0.2 at 50 % (wt % CMC) and the supernatant at day 7 of F50 loaded GEL0.5 at 50 % (wt % CMC) with an autocorrelation function $\langle G'(\tau) \rangle$ taking into account two different populations: a population of slow species with diffusion constant D1, and a population of fast species with diffusion constant D2. Corresponding hydrodynamic radii and fraction of the total population (assuming identical brightness for both species) are also indicated.

F50			GEL0.2+50%F50			GEL0.5+50%F50		
D[$\mu\text{m}^2/\text{s}$]	R[nm]	%	D[$\mu\text{m}^2/\text{s}$]	R[nm]	%	D[$\mu\text{m}^2/\text{s}$]	R[nm]	%
D1=3.3	R1=74	%=87	D1=2.5	R1=100	%=25	D1=4.35	R1=56.3	%=18
D2=102	R2=2.4	%=13	D2=301	R2=0.81	%=75	D2=378	R2=0.6	%=82

9. DLS Analysis

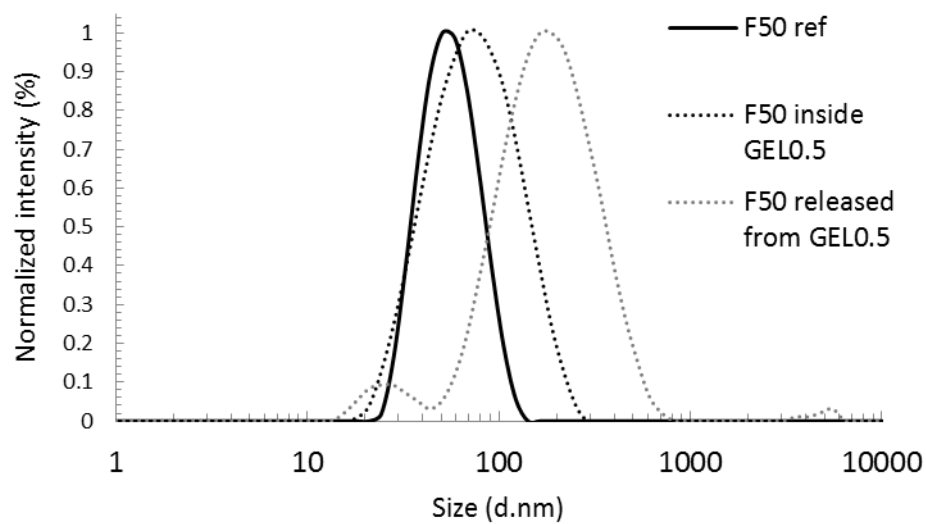


Fig. S8 DLS measurement of fresh F50, of F50 after their recovery from GEL0.5+F50(50%) at day 21, and of supernatant at day 7 of the GEL0.5+F50(50%) solution.

References

- [1] J. Gravier, L. Sancey, S. Hirsjärvi, E. Rustique, C. Passirani, J. P. Benoit, J. L. Coll, I. Texier, *Molecular Pharmaceutics*, 11 (2014) 3133-3144.
- [2] J. Mérian, R. Boisgard, P. A. Bayle, M. Bardet, B. Tavitian, I. Texier, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 93 (2015) 1-10.
- [3] N.A. Peppas, E.W. Merrill, *Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry Edition*, 14 (1976) 441-457.
- [4] A.J. Stamm, *Textile Research Journal*, 20 (1950) 631-636.
- [5] Z. Xia, M. Patchan, J. Maranchi, J. Elisseeff, M. Trexler, *Journal of Applied Polymer Science*, 127 (2013) 4537-4541.
- [6] N. Yathindra, V.S.R. Rao, *Biopolymers*, 9 (1970) 783-790.
- [7] D.R. Picout, S.B. Ross-Murphy, *Carbohydrate Research*, 337 (2002) 1781-1784.

2.2.3 Résultats complémentaires

Certains résultats complémentaires sur le système hydrogel CMC-p/PEG + LNPs n'ont pas été décrits dans l'article et sont présentés dans la partie qui suit. La partie expérimentale de ce chapitre est décrite dans le chapitre 5.

Les propriétés mécaniques des hydrogels en compression (E) et en cisaillement (G') ont été analysées afin de mieux comprendre le procédé de réticulation des hydrogels de CMC/PEG. Les modules mesurés avec différents instruments (rhéomètre, texturomètre, AFM) ont été comparés.

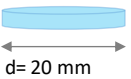
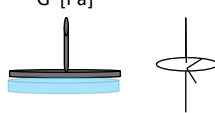
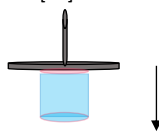
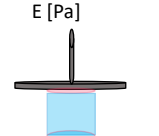
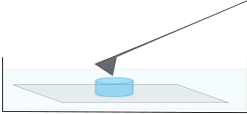
Pour terminer cette étude, ces systèmes ont été lyophilisés pour pouvoir être conservés plus longtemps. La structure de ces gels lyophilisés ainsi que leurs nouvelles propriétés mécaniques après réhydratation ont été évaluées.

2.2.3.1 Etude complémentaire sur les propriétés mécaniques des hydrogels

Dans l'étude présentée dans la publication, les caractérisations mécaniques des hydrogels de CMC-p/PEG-(SH)₂, en cisaillement (G') et en compression (E), ont été réalisées pour évaluer l'influence des nanoparticules sur le processus de réticulation des gels. Cette partie complémentaire vise à interpréter davantage les valeurs des modules mesurées et à confronter les valeurs selon l'instrument utilisé.

Le module en cisaillement G' a été mesuré avec un rhéomètre et différents instruments ont permis de mesurer le module en compression (E) : le rhéomètre, le texturomètre et l'AFM (Tableau 2-3).

Tableau 2-3: Instruments et formes des hydrogels utilisés pour réaliser les différentes caractérisations mécaniques

	Instrument	Dimensions du gel	Propriété mesurée
Publication	Rhéomètre	 $d = 20 \text{ mm}$ $e = 0,8 \text{ mm}$	 $G' [\text{Pa}]$ Cisaillement
	Rhéomètre	 $d = 6 \text{ mm}$ $e = 5 \text{ mm}$	 $E [\text{Pa}]$ Compression
Etude complémentaire	Texturomètre	 $d = 6 \text{ mm}$ $e = 5 \text{ mm}$	 $E [\text{Pa}]$ Compression
	AFM	 $d = 6 \text{ mm}$ $e = 1 \text{ mm}$	 $E_s [\text{Pa}]$ Compression

En début de thèse, les tests en compression ont été réalisés avec le rhéomètre en mode « squeeze test ».

Le rhéomètre a été alors à la fois utilisé pour réaliser les mesures de G' et de E . Le rhéomètre n'est pas l'instrument le plus adapté pour réaliser des tests en compression car la cellule de mesure des faibles forces normales n'est pas précise (cellule de force de 50 N, F_N mesurées $< 1 \text{ N}$). En cours de thèse, le CERMAV s'est équipé d'un texturomètre, et de nouvelles caractérisations ont pu être faites (cellule de force 5 N). Les modules obtenus avec les 2 instruments ont alors été comparés. Aussi, une collaboration avec la plateforme de nano caractérisation du CEA a permis de compléter cette étude par des mesures AFM de module d'Young (E) en milieu liquide à l'échelle locale.

Dans cette partie, nous distinguons les modules d'Young (E) des gels mesurés juste après formation sous UV, notés E_0 , des modules des gels gonflés à l'équilibre, notés E_{eq} .

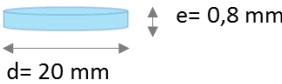
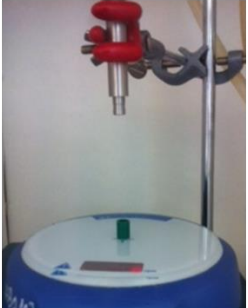
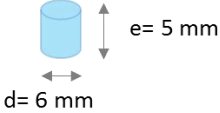
Comparaison des propriétés des 2 types d'hydrogels utilisés dans l'article

Dans la publication, les expériences ont été faites à partir de 2 types de gels, de formes différentes et fabriqués différemment (Tableau 2-4) :

- gel préparé à l'intérieur du rhéomètre : une lampe UV intégrée au rhéomètre permet de suivre la gélification de la solution pendant le temps d'irradiation (conditions d'irradiation : $P=20 \text{ mW/cm}^2$, $t_{\text{irradiation}}=35 \text{ min}$).

- gel préparé à l'extérieur du rhéomètre, en plaçant les gels dans un moule extérieur sous une lampe UV indépendante (conditions d'irradiation : $P=60 \text{ mW/cm}^2$, $t_{\text{irradiation}}=15 \text{ min}$)

Tableau 2-4 : Représentation des gels utilisés dans l'étude précédente et du procédé de fabrication

Fabrication	Dimensions du gel	Etudes
 UV in-situ rhéomètre	 $d = 20 \text{ mm}$ $e = 0,8 \text{ mm}$	- Influence de la densité de réticulation des gels sur le module G' (avec et sans LNPS) - Influence de la charge/taille des LNPs sur le module G'
 UV extérieur au rhéomètre	 $d = 6 \text{ mm}$ $e = 5 \text{ mm}$	- Gonflement - Influence de la densité de réticulation sur le module E - Influence de la charge des LNPs sur le module E - Cinétique de libération des LNPs

A partir des modules G' mesurés au rhéomètre, 3 gels de densité de réticulation variables ont été choisis pour y intégrer les LNPs. Ces gels fabriqués dans le rhéomètre sont fins et il est difficile de les sortir du rhéomètre sans les détériorer. Pour la suite des expériences (mesures des taux de gonflement, évaluation de la cinétique de libération des LNPs depuis les gels) des gels plus épais ont été fabriqués à l'extérieur du rhéomètre, sous une lampe UV indépendante.

Il a alors fallu vérifier que les conditions opératoires choisies pour préparer ces gels plus épais (puissance de la lampe UV extérieure et temps d'irradiation), conduisaient à des gels aux propriétés mécaniques comparables à ceux formés dans le rhéomètre et que ces gels plus épais étaient homogènes. Ceci a été vérifié pour le gel moyennement réticulé, le GEL0.5, en réalisant des essais de compression sur le gel épais à l'aide du rhéomètre. Dans cette partie les tests de compression ont été réalisés sur les gels directement après formation. On note le module d'Young E_0 .

La contrainte réduite, σ_{red} , définie par l'équation 3 selon la théorie de Mooney [2, 3] met en évidence la partie non-linéaire de la courbe contrainte-déformation. Elle a été utilisée pour déterminer le module G' à partir de tests en compression.

$$\sigma_{red} = \frac{-\sigma_{nominal}}{\lambda' - \frac{1}{\lambda'^2}} \quad \text{où} \quad \sigma_{nominal} = \frac{F_N}{Aire_{cylindre}} \quad \lambda' = \frac{h}{h_0} \quad (4)$$

h correspond à la distance entre la géométrie et le plan de compression à l'instant t et h_0 correspond à cette distance à t_0 , atteinte pour un pré-chargement de $F_N = 0.005$ N. Dans le régime Hookéen, en considérant le gel incompressible, σ_{red} est une constante égale au module de cisaillement G' [2, 4].

La Figure 2-4 représente la courbe de σ_{red} en fonction de l'inverse du déplacement $1/\lambda'$ pour le GEL0.5. Lorsque σ_{red} est constante par rapport à $1/\lambda'$, selon la théorie, le matériau a un comportement élastique caoutchoutique [5]. Ceci n'est pas le cas pour le GEL0.5 aux fortes déformations, pour lequel la déformation entraîne une augmentation de la contrainte (Figure 2-4). Ce durcissement observé sous l'effet de la contrainte est représentatif d'un réseau homogène et bien réticulé [5].

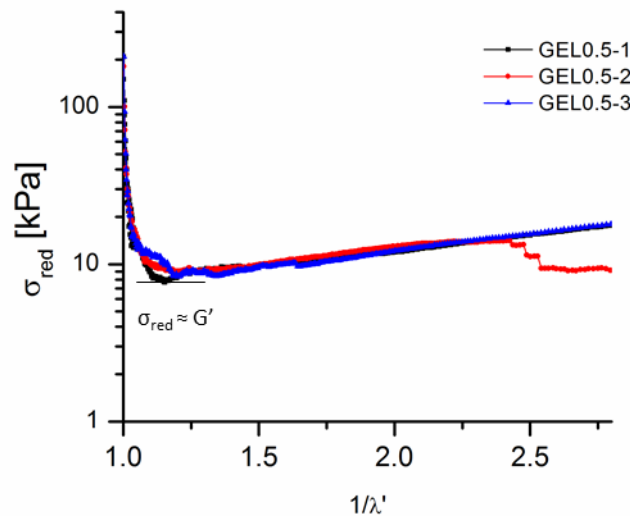


Figure 2-4: contrainte réduite en fonction du déplacement (appelée aussi courbe de Mooney) pour le GEL0.5 ($n=3$)

Le module G' déterminé à partir de σ_{red} pour de faibles déformations ($1/\lambda'$ proche de 1) est égale à $8,9 \pm 0,9$ kPa. Il est comparable à celui déterminé en rhéologie de $11,5 \pm 0,6$ kPa compte tenu d'une marge d'erreur raisonnable.

Le gel fabriqué hors rhéomètre étant plus épais, nous avons vérifié que la réticulation du gel était homogène sur toute son épaisseur. Pour cela, la pièce de GEL0.5 ($d=0,6$ cm, $h=0,5$ cm) a été coupée en 2 dans sa hauteur et des tests en compression ont été réalisés sur la partie haute (côté lampe UV) et la partie basse du gel. La Figure 2-5 présente les courbes de contrainte vraie – déplacement.

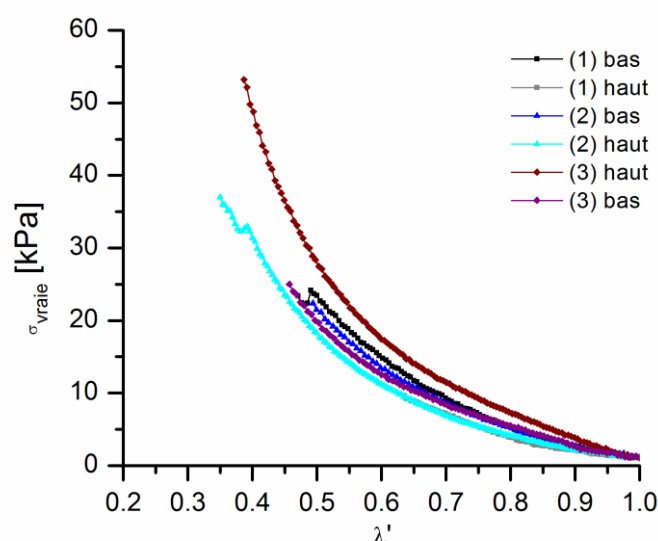


Figure 2-5 : contrainte vraie (σ_{vraie}) en fonction de la déformation λ' (h/h_0) pour la partie haute et basse du GEL0.5 ($n=3$)

Nous observons à partir de la Figure 2-5 qu'il n'existe pas de différence entre la partie haute et la partie basse du GEL0.5. Les modules d'Young (E_0) calculés à partir de la pente de la courbe à de faibles déformations (λ' proche de 1) sont les mêmes pour les 2 morceaux de gel (haut et bas).

Ces résultats suggèrent que les conditions opératoires hors rhéomètre ($P=60 \text{ mW/cm}^2$, $t_{\text{irradiation}}=15 \text{ min}$) utilisées pour faire des gels cylindriques d'épaisseur 0,5 cm, conduisent à la formation de gels homogènes et aux propriétés mécaniques similaires à ceux formés dans le rhéomètre.

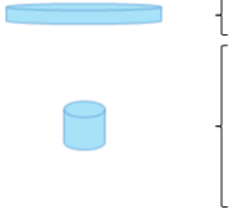
Corrélation des différentes propriétés mécaniques mesurées

- Comparaison des modules E mesurés avec le rhéomètre et avec le texturomètre

Dans cette partie, de nouveaux tests en compression ont été réalisés avec le texturomètre. Les valeurs des modules E_0 obtenues avec le rhéomètre et le texturomètre ($E_{0-\text{rhéomètre}}$ ou $E_{0-\text{texturomètre}}$) pour les 3 gels étudiés, GEL0.2, GEL0.5 et GEL1.0, sont comparées et présentés Tableau 2-5. Le coefficient de Poisson ν , reliant E et G' selon l'équation 4 [3], est calculé pour les 2 instruments.

$$E = 2G'(1 + \nu) \quad (4)$$

Ce coefficient ν caractérise la réponse de la section d'un matériau à une pression isotrope externe [6]. Nous noterons $\nu_{0-\text{rhéomètre}}$, le coefficient de Poisson calculé à partir de $E_{0-\text{rhéomètre}}$ et G' et $\nu_{0-\text{texturomètre}}$ le coefficient de Poisson calculé à partir de $E_{0-\text{texturomètre}}$ et G'.

Tableau 2-5 : Comparaison des modules en compression E_0 , et des coefficients de Poisson ν selon l'instrument utilisé pour les GEL0,2, GEL0,5 et GEL1,0


	GEL0.2	GEL0.5	GEL1.0
c_{CMC} [mg/mL]	30	30	30
$n_{PEG-(SH)_2}$ [mmol]	2,2	6,2	12,5
G' - rhéomètre [kPa]	5.5 ± 0.9	11.5 ± 0.6	21.8 ± 0.8
E_0 - rhéomètre [kPa]	5.0 ± 0.2	14.3 ± 1.6	20.3 ± 1.4
ν_0 - rhéomètre [kPa]	-0,5	-0,4	-0,5
E_0 - texturomètre [kPa]	13.8 ± 0.6	24.5 ± 0.5	31.4 ± 0.64
ν_0 - texturomètre [kPa]	0,3	-0,1	-0,3

Tout d'abord, si l'on compare les 2 instruments : le rhéomètre et le texturomètre, on constate que les valeurs de $E_{0-texturomètre}$ sont supérieures à celles de $E_{0-rhéomètre}$ de 10 kPa, quel que soit le gel étudié. Cette différence constante atteste de la reproductibilité des conditions de mesure, mais ces valeurs restent indicatives.

Un coefficient ν négatif caractérise les matériaux, qui lorsqu'ils sont comprimés présentent une diminution de leur section. Ceci est le cas des matériaux composites en nid d'abeille par exemple [7]. Pour les matériaux au comportement élastique (élastomères), comme les hydrogels, le coefficient de Poisson $\nu \rightarrow 0.5$ [8]. (Les hydrogels sont en fait des matériaux viscoélastiques, car ils se comportent comme des matériaux élastiques que sur des échelles de temps courtes). Les valeurs de ν que nous obtenons sont donc incohérentes pour les matériaux étudiés. Ces incohérences entre le module de cisaillement G' et les modules d'Young en compression E pourraient venir des conditions de mesure (adhésion entre la géométrie et la surface du gel appelé « effet tonneau ») ou des différences de géométries des gels. Rappelons que les modules G' ont été mesurés sur les gels fins alors que les modules E_0 sur des gels plus épais. [9]

- Comparaison des modules E mesurés sur les gels après formation ou gonflés à l'équilibre

Des essais de compression avec le texturomètre sur les gels gonflés à l'équilibre ($E_{eq-texturomètre}$) ont été réalisés. Les modules $E_{eq-texturomètre}$ et $E_{0-texturomètre}$ sont comparés Tableau 2-6 et les courbes contraintes vraie - déplacement sont présentées Figure 2-6, pour les 3 types de gel.

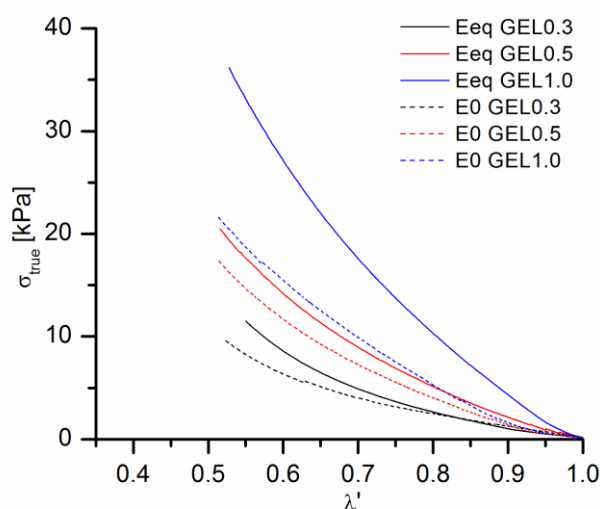


Figure 2-6 : Courbes obtenues après compression uniaxiale des gels de densité de réticulation variables (GEL0.2, GEL0.5 et GEL1.0) caractérisés après préparation (E_0) ou gonflés à l'équilibre (E_{eq}) (essais réalisés avec le texturomètre Shimadzu).

Pour un même instrument, le texturomètre, $E_{eq} > E_0$, quel que soit le gel. Afin de pouvoir comparer ces 2 modules, le module réduit des gels gonflés à l'équilibre, $E_{r,eq} = E_{eq} / E_0$, a été calculé (Tableau 2-6). Pour ces gels, une diminution de $E_{r,eq}$ est observée lorsque le taux de gonflement augmente.

Tableau 2-6 : Modules E mesurés avec le rhéomètre sur des gels gonflés à l'équilibre ($E_{eq-texturomètre}$) ou juste après formation ($E_{0-texturomètre}$). Paramètre $E_{r,eq}$ des GEL0.2, GEL0.5 et GEL1.0 calculés à partir de l'équation (6) ($E_{r,eq-v}$) et des modules élastiques E_{eq} et E_0

	GEL0.2	GEL0.5	GEL1.0
Q_{eq-PBS}	$42,3 \pm 8,6$	$26,7 \pm 1,5$	$20,6 \pm 0,9$
Q_{0-PBS}	$31,1 \pm 6,3$	$22,9 \pm 4,3$	$13,9 \pm 1,2$
$E_0 - \text{texturomètre [kPa]}$	$13,8 \pm 0,6$	$24,5 \pm 0,5$	$31,4 \pm 0,64$
$E_{eq-texturomètre [kPa]}$	$16,8 \pm 1,4$	$32,1 \pm 1,4$	$61,14 \pm 5,6$
$E_{r,eq}$	1,2	1,3	1,9
$E_{r,eq-v}$	1,2	1,3	1,5

Gundogan et al. ont étudié les propriétés mécaniques en compression des gels de poly(isopropylacrylamide) en fonction de leur degrés de gonflement et de la densité de réticulation du réseau [10]. Ils ont utilisé l'expression mathématique du module d'Young E pour commenter les différences entre E_{eq} et E_0 .

Pour les réseaux homogènes, constitués de chaînes de polymères Gaussiennes, le module d'Young E d'un gel gonflé est relié à la densité de réticulation par la formule suivante [11]:

$$E = A \frac{\rho}{M_c} RT (\nu_2^0)^{\frac{2}{3}} (\nu_2)^{1/3} \quad (5)$$

Avec, ρ la densité de polymère, M_c la masse molaire de la chaîne polymère entre 2 nœuds de réticulation, ν_2^0 la fraction volumique du gel après préparation, ν_2 , la fraction volumique du gel gonflé. Ces fractions volumiques sont obtenues en multipliant les fractions massiques des gels après préparation ou à l'état gonflé par le volume spécifique. Le volume spécifique de la cellulose, v , est de 0.651 cm³/g [9]. En considérant que le gel a un réseau affine (la déformation de chaque segment élastique est la même que la déformation relative appliquée à l'échantillon macroscopique), le facteur A est égal à 1.

Pour les gels caractérisés juste après fabrication, le module E_0 devient $E_0 = A(\rho/M_c)RT\nu_2^0$. A partir de l'équation (5) le module réduit des gels gonflés à l'équilibre, $E_{r,eq}$ ($E_{r,eq} = E_{eq}/E_0$) devient alors :

$$E_{r,eq} = \frac{E_{eq}}{E_0} = \left(\frac{\nu_{2,eq}}{\nu_0} \right)^{\frac{1}{3}} = V^{-\frac{1}{3}} \quad (6)$$

où V représente le volume normalisé du gel. Pour les différentes formulations des gels de polyacrylamide. Gundogan et al ont représenté le module réduit $E_{r,eq}$ en fonction du volume normalisé V. Ils ont mis en évidence 3 régimes linéaires différents de dépendance entre $E_{r,eq}$ et V, avec des pentes positives et négatives. Ainsi, le module plus élevé des gels gonflés à l'équilibre ne peut donc pas être justifié par la théorie, il est peut-être dû à des hétérogénéités dans le matériau, à la limite d'extensibilité des chaînes du réseau et à la présence de chaînes courtes.

Mesures des modules d'Young (E) des hydrogels par microscopie à force atomique (AFM)

Dans l'étude qui suit, une collaboration avec Denis Mariolle et le Dr Nicolas Chevalier de la plateforme de nano-caractérisation du CEA a été mise à profit pour compléter les caractérisations mécaniques des hydrogels, avec et sans LNPs, par des mesures de modules d'Young (E) en AFM, en milieu liquide. Précédemment, les modules E calculés tenaient compte de l'élasticité des hydrogels à l'échelle macroscopique, mais ne tenaient pas compte de l'élasticité du matériau à l'échelle locale, qui peut être intéressante à connaître pour certaines applications.

L'indentation est la méthode la plus courante pour évaluer les propriétés locales des matériaux. On distingue 2 techniques d'indentation : le nano-indenteur et l'AFM. L'AFM est préférée pour l'analyse de matériaux souples car il peut opérer à de faibles déformations [12, 13]. La plupart des mesures en AFM sont effectuées sur des échantillons déshydratés, seules certaines équipes développent l'AFM en milieu liquide. Plusieurs difficultés sont rencontrées lors de l'analyse d'échantillons hydratés. La principale est liée à la tension de surface de l'eau et à la difficulté à identifier le point de contact entre la pointe et

l'échantillon. Une autre difficulté réside dans la souplesse du matériau et dans la forte adhésion entre l'hydrogel et la pointe [14].

Dans la littérature, l'AFM en milieu liquide a été principalement développé pour étudier les propriétés mécaniques des cellules à l'échelle nanométrique. Il a été démontré récemment que certaines pathologies pouvaient engendrer une altération des propriétés mécaniques des cellules. Ces mesures mécaniques permettraient alors de diagnostiquer certaines maladies comme les maladies vasculaires, la cataracte, la malaria, et la maladie d'Alzheimer [15-17]. L'AFM en milieu liquide a aussi été utilisé en ingénierie tissulaire pour corrélérer l'élasticité locale de biomatériaux hydratés, à l'adhésion et la prolifération des cellules [18-20] et pour étudier les nanohétérogénéités de matériaux souples [21, 22].

Dans cette étude, nous utilisons l'AFM pour estimer les propriétés mécaniques des hydrogels gonflés à l'équilibre, dans le but de les comparer aux valeurs obtenues avec un texturomètre. Pour ce faire une courbe « déflexion-distance » est enregistrée à chaque pixel de la cartographie des propriétés mécaniques (mode « Force-Volume »). Il s'agit de mesurer la déflexion du levier en fonction de la distance entre la pointe et l'échantillon quand ceux-ci se rapprochent ou s'éloignent. Une déflexion de consigne est sous le contrôle de l'utilisateur. Elle donne la force maximale appliquée entre la pointe et l'échantillon. Pour calculer les modules d'Young, plusieurs modèles de mécanique du contact entre pointe et échantillon ont été utilisés pour modéliser la courbe force-indentation, en tenant compte des conditions expérimentales, notamment la forme et la taille de l'indenteur utilisé. Les approches retenues sont les modèles de sphère-Hertz [23](Johnson-Kendall-Roberts (JKR) [24], hyperboloïde [25] et sphère-Sneddon [26]. Ces modèles sont décrits dans la partie expérimentale.

Les modules d'Young à l'échelle locale de 2 hydrogels aux propriétés mécaniques les plus extrêmes (GEL0.2 et GEL1.0), avec et sans LNPs ($d = 120$ nm, neutres (F120(N)), ont été mesurées par AFM et sont présentées Tableau 2-7.

Tableau 2-7 : Modules d'Young obtenus par AFM pour différentes forces de déflexion (0.94 nN et 1.88 nN) pour les GEL0.2 et GEL1.0 avec et sans LNPs (50%w/w_{CMC})

		E [kPa]	GEL0.2	GEL0.2 + LNP	GEL1.0	GEL1.0 + LNP
Module d'Young local	F=0.94 nN	E _{AFM} - Hertz	23,2 ± 1,2	19,0 ± 1,1	81,3 ± 5,8	90,2 ± 6,9
		E _{AFM} - Hyperboloïd	22,5 ± 1,1	18,3 ± 1,1	80,3 ± 5,7	89,6 ± 6,9
		E _{AFM} - JKR	22,8 ± 1,1	18,6 ± 1,1	81 ± 5,4	89,6 ± 8,0
	F=1.88 nN	E _{AFM} - Hertz	25,6 ± 1,2	20,5 ± 1,2	88,1 ± 5,2	91,6 ± 4,9
		E _{AFM} - Hyperboloïd	24,6 ± 1,2	18,8 ± 2,2	84,3 ± 7,5	90,1 ± 4,8
		E _{AFM} - JKR	24,8 ± 1,0	19,9 ± 1,6	86 ± 5,0	90,6 ± 5,2

- Influence des LNPs sur le module E mesuré en AFM

Pour cette étude complémentaire, les LNPs de tailles 120 nm, neutres (F120) ont été choisies pour être incorporées dans les gels, car lors de travaux antérieurs, il a été observé qu'elles étaient plus robustes que les F50 et qu'elles conservaient davantage leurs propriétés après incorporation dans le gel.

Pareillement à ce qui a été observé à l'échelle macroscopique pour les F50, les propriétés mécaniques locales des gels ne sont pas significativement modifiées par la présence des F120, pour une concentration en particules de 50% w/w_{CMC}, quelle que soit la force d'indentation et le modèle utilisé (Tableau 2-7). Ceci confirme que la présence des LNPs ne gêne pas la réticulation du gel et ne modifie pas localement l'élasticité du gel.

- Comparaison des modules d'Young à l'échelle locale et macroscopique

Les modules des gels gonflés mesurés en AFM en milieu liquide à l'échelle locale (E_{eq-AFM}) sont supérieurs aux modules mesurés avec le texturomètre à l'échelle macroscopique ($E_{eq-texturomètre}$). Si l'on considère le modèle JKR utilisé pour ajuster les données « force – indentation », les modules E_{eq-AFM} sont 1.3 fois supérieurs aux modules $E_{eq-texturomètre}$ (Tableau 2-8). Il est intéressant de noter que ce coefficient de proportionnalité est le même pour les 2 gels. Des résultats similaires, où les modules à l'échelle locale ont été surestimés par rapport aux modules « bulk », indépendamment du modèle, ont aussi été observés pour d'autres matériaux souples [27-29]. Ces études ont montré que le module E_{eq-AFM} dépendait de la profondeur d'indentation: cet effet est appelé « skin effect ». Dokulin et al. attribuent ce « skin effect » à des caractéristiques de la pointe qui ne permettent pas de tenir compte des phénomènes d'adhésion entre le matériau et la pointe [22].

Tableau 2-8: Comparaison des modules E_{eq} des GEL0.2 et GEL1.0 à l'état gonflés mesurés avec le texturomètre (échelle macroscopique) ou en AFM (échelle locale)

	GEL0.2	GEL1.0
E_{eq} - texturomètre	16,8 ± 1,4	61,14 ± 5,6
E_{eq-AFM} - JKR (F= 0.94nN)	22,8 ± 1,1	81 ± 5,4

Cette étude AFM a permis de dégager des tendances sur les propriétés élastiques des hydrogels en fonction de leur réticulation et/ou de la présence de LNPs. La valeur des modules est indicative, mais le facteur de proportionnalité, identique pour les 2 gels, atteste de la cohérence de la mesure. Même s'ils sont très utilisés dans la littérature, la validité des modèles d'indentation classique pour des expériences AFM restent à valider et à débattre. Nous rappelons qu'ils ne sont valables que pour des matériaux homogènes, continus et infinis. Notamment, les effets de peau et les propriétés viscoélastiques ne sont pas pris en compte dans cette étude à visée comparative.

2.2.3.2 Lyophilisation des hydrogels et analyse de leur morphologie

Pour se rapprocher le plus possible de l'application visée, qui est d'utiliser ces hydrogels composites comme patches pour la délivrance d'un principe actif, les hydrogels ont été lyophilisés, pour pouvoir les conserver facilement. Les morphologies de ces matériaux déshydratés ont été analysées et comparées en fonction de leur densité de réticulation. Les nouvelles propriétés mécaniques des gels lyophilisés puis réhydratés ont ensuite été mesurées.

Les hydrogels GEL0.2 (le moins réticulé), GEL0.5 (moyennement réticulé), et GEL1.0 (le plus réticulé) ont été lyophilisés selon le protocole décrit dans la partie expérimentale et leur structure a été analysée au microscope électronique à balayage (MEB).

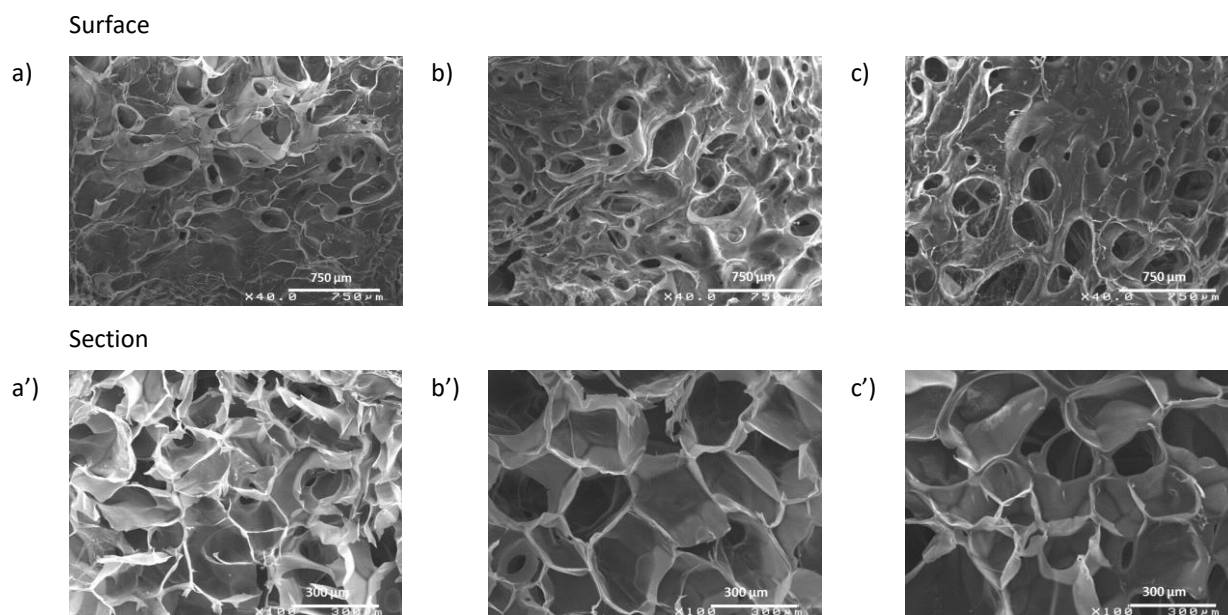


Figure 2-7 : Images MEB (100x) de la surface et de la section des gels différants par leur densité de réticulation, obtenus par le même procédé de lyophilisation : GEL0.2 (a) et (a'), GEL0.5 (b) et (b') et GEL1.0 (c) et (c')

La surface des 3 gels étudiés apparaît très dense quel que soit le gel étudié (Figure 2-7-a, b, et c). Néanmoins, on peut observer des structures différentes selon la densité de réticulation sur les images des sections des gels (Figure 2-7-a', b', et c'). Plus le gel est réticulé et plus la paroi des pores est épaisse. Le GEL0.2, le moins réticulé (Figure 2-7 (a')), présente des pores mal définis aux parois très fines. Les pores du GEL0.5 sont plus réguliers, et les parois plus épaisses (Figure 2-7 (b')). Enfin, le GEL1.0, apparaît comme étant le plus dense. On peut observer Figure 2-7 (c') des zones peu poreuses. La taille des pores analysée par le logiciel ImageJ® est constante pour les 3 gels et de l'ordre de 250 μm. Ces microstructures observées au MEB à partir d'échantillons lyophilisés ne correspondent pas à la structure du gel après réticulation à l'état gonflé, compte tenu des résultats présentés dans la publication (taille des pores calculée de l'ordre

de 50 nm et cinétique de libération lente des nanoparticules). La macroporosité est créée lors de la congélation. Plus la congélation se fait rapidement, plus les cristaux de glace emprisonnés dans le réseau sont petits et donc la taille de pores du matériau lyophilisé est faible. Après sublimation, la taille des cristaux de glace laisse place à des pores de tailles identiques. Les 3 gels étant congelés dans les mêmes conditions, ceci justifie des tailles de pores identiques. Shoichet et al. ont préparé des hydrogels de HA avec une macroporosité variable en fonction de la température et de la vitesse de congélation choisies [30].

La lyophilisation dans l'eau peut être utilisée pour créer un hydrogel macroporeux, les matériaux obtenus sont appelés cryogels, néanmoins lorsqu'on souhaite obtenir un matériau déshydraté qui conserve une structure proche de celle présente à l'état hydraté d'autres procédés de déshydratation sont préférables comme le séchage au CO₂ supercritique [31, 32].

2.2.3.3 Analyse des propriétés mécaniques des gels après lyophilisation

Les nouvelles propriétés mécaniques des gels lyophilisés puis réhydratés ont été mesurées, pour évaluer l'impact de la lyophilisation sur la structure du gel. Les essais ont été réalisés sur le gel intermédiaire, le GEL0.5.

Après lyophilisation, les gels ont été réhydratés en les plongeant dans 1mL de PBS pendant 24h. Les modules d'Young en compression ont été mesurés avec le texturomètre et comparés à ceux obtenus pour les gels hydratés non-lyophilisés. Les résultats des essais de compression sont présentés pour le GEL0.5 dans le Tableau 2-9. Les essais ont été réalisés sur 3 échantillons. Une diminution du module d'Young est constatée pour le gel lyophilisé. Ce résultat est en adéquation avec la macroporosité des gels observée par MEB. L'étape de congélation dans le procédé de lyophilisation génère des macropores et fragilise les parois des pores. Cette comparaison des propriétés mécaniques démontre qu'après resuspension, le gel lyophilisé ne retrouve pas sa structure initiale. En imaginant lyophiliser les gels composites CMC-p/PEG-(SH)₂ + LNPs, en conservant les propriétés des LNPs, les cinétiques de libération des particules seraient sûrement modifiées dû au changement de structure de la matrice hydrogel.

Tableau 2-9 : Modules d'Young obtenu par compression pour le GEL0.5 à l'état hydraté avant et après lyophilisation (n=4).

	Eeq [kPa]
GEL0,5 avant lyoph	32,1 ± 1,4
GEL0,5 après lyoph	14,7 ± 2,5

2.3 Conclusion

Dans ce chapitre, le potentiel des hydrogels de CMC/PEG pour la délivrance locale de LNPs a été évalué. Il a été démontré que la présence des LNPs, jusqu'à une concentration de 50 % w/w_{CMC}, ne modifiait pas le processus de réticulation, et que les propriétés mécaniques des gels étaient maintenues, cela quel que soit la densité de réticulation du gel et la taille des particules. Lorsque des LNP(+) sont intégrées au système, composé de CMC chargée négativement, une légère augmentation des propriétés mécaniques des gels a été observée, attribuée à la présence d'interactions électrostatiques LNP(+)/CMC supplémentaires.

En encapsulant un fluorophore dans le cœur des LNPs, il a été possible de déterminer les profils de libération de ces particules depuis la matrice polymère et de les modéliser par un modèle de diffusion. Malgré l'encombrement stérique causé par la présence du gel, l'élasticité du réseau permet la diffusion des LNPs vers l'extérieur du gel. Les cinétiques de libération ont été mesurées en fonction du design du système (densité de réticulation des gels et propriétés des LNPs). Il a été démontré que la vitesse initiale de libération des LNPs pouvait être ralentie en augmentant le diamètre des LNPs de 50 nm à 120 nm, et que la quantité finale de LNPs libérée pouvait être ajustée selon la charge des LNPs et la densité de réticulation des gels. Le modèle a été cohérent avec les valeurs expérimentales obtenues. Ainsi, en fonction du profil de libération souhaité, on peut imaginer pouvoir, grâce au modèle, élaborer un système composite adapté. Une estimation de la taille de pores (≈ 50 nm) justifie la faible diffusion des particules restant piégées dans le matériau, après 30 jours.

Dans le but de pouvoir être stocké, le système composite a été lyophilisé. La lyophilisation modifie la structure du réseau. Cela a pu être observé par MEB et les mesures des propriétés mécaniques du matériau lyophilisé après resuspension attestent de ce changement de structure. Dans le cas où les particules résisteraient à l'étape de lyophilisation, les cinétiques de libération seraient de nouveau à réévaluer sur ces matériaux lyophilisés.

Avec l'idée de mettre en forme des matériaux plus faciles à manipuler et à conserver, nous avons utilisé la chimie thiol-ène pour fabriquer des films. Cette étude fera l'objet du chapitre 3.

Références

- [1] T. Loftsson, M.E. Brewster, Pharmaceutical applications of cyclodextrins: basic science and product development, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 62 (2010) 1607-1621.
- [2] M. Mooney, A theory of large elastic deformation, *Journal of Applied Physics*, 11 (1940) 582-592.
- [3] G. Miquelard-Garnier, Synthèse et propriétés mécaniques d'hydrogels polyélectrolytes modifiés par des groupements hydrophobes. *Matériaux*, Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, Matériaux (2007).
- [4] R.S. Rivlin, D.W. Saunders, Large Elastic Deformations of Isotropic Materials. VII. Experiments on the Deformation of Rubber, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 243 (1951) 251-288.
- [5] W.-C. Lin, W. Fan, A. Marcellan, D. Hourdet, C. Creton, Large Strain and Fracture Properties of Poly(dimethylacrylamide)/Silica Hybrid Hydrogels, *Macromolecules*, 43 (2010) 2554-2563.
- [6] U. Chippada, B. Yurke, N.A. Langrana, Simultaneous determination of Young's modulus, shear modulus, and Poisson's ratio of soft hydrogels, *Journal of Materials Research*, 25 (2010) 545-555.
- [7] S. Hirotsu, Softening of bulk modulus and negative Poisson's ratio near the volume phase transition of polymer gels, *The Journal of Chemical Physics*, 94 (1991) 3949-3957.
- [8] G.N. Greaves, A.L. Greer, R.S. Lakes, T. Rouxel, Poisson's ratio and modern materials, *Nat Mater*, 10 (2011) 823-837.
- [9] A.J. Stamm, Specific Volume of Native Cellulose, *Textile Research Journal*, 20 (1950) 631-636.
- [10] N. Gundogan, D. Melekaslan, O. Okay, Rubber elasticity of poly(N-isopropylacrylamide) gels at various charge densities, *Macromolecules*, 35 (2002) 5616-5622.
- [11] L.R.G. Treloar, The elasticity and related properties of rubbers, *Reports on Progress in Physics*, 36 (1973) 755-826.
- [12] D. Tranchida, S. Piccarolo, M. Soliman, Nanoscale Mechanical Characterization of Polymers by AFM Nanoindentations: Critical Approach to the Elastic Characterization, *Macromolecules*, 39 (2006) 4547-4556.
- [13] D. Tranchida, Z. Kiflie, S. Acierno, S. Piccarolo, Nanoscale mechanical characterization of polymers by atomic force microscopy (AFM) nanoindentations: viscoelastic characterization of a model material, *Measurement Science and Technology*, 20 (2009) 095702.
- [14] C. Oelschlaeger, F. Bossler, N. Willenbacher, Synthesis, Structural and Micromechanical Properties of 3D Hyaluronic Acid-Based Cryogel Scaffolds, *Biomacromolecules*, 17 (2016) 580-589.
- [15] H.J. Kim, K.K. Kim, I.K. Park, B.S. Choi, J.H. Kim, M.S. Kim, Hybrid scaffolds composed of hyaluronic acid and collagen for cartilage regeneration, *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 9 (2012) 57-62.
- [16] H.-D. Hwang, H.-J. Cho, P. Balakrishnan, C.-W. Chung, I.-S. Yoon, Y.-K. Oh, Y. Byun, D.-D. Kim, Cross-linked hyaluronic acid-based flexible cell delivery system: Application for chondrogenic differentiation, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 91 (2012) 106-113.
- [17] A. Sharma, S. Bhat, V. Nayak, A. Kumar, Efficacy of supermacroporous poly(ethylene glycol)-gelatin cryogel matrix for soft tissue engineering applications, *Materials Science and Engineering: C*, 47 (2015) 298-312.
- [18] A.J. Engler, S. Sen, H.L. Sweeney, D.E. Discher, Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification, *Cell*, 126 (2006) 677-689.
- [19] A.J. Engler, F. Rehfeldt, S. Sen, D.E. Discher, Microtissue Elasticity: Measurements by Atomic Force Microscopy and Its Influence on Cell Differentiation, in: *Methods in Cell Biology*, Academic Press, 2007, pp. 521-545.

- [20] A.J. Engler, L. Richert, J.Y. Wong, C. Picart, D.E. Discher, Surface probe measurements of the elasticity of sectioned tissue, thin gels and polyelectrolyte multilayer films: Correlations between substrate stiffness and cell adhesion, *Surface Science*, 570 (2004) 142-154.
- [21] M.E. Dokukin, I. Sokolov, Quantitative Mapping of the Elastic Modulus of Soft Materials with HarmoniX and PeakForce QNM AFM Modes, *Langmuir*, 28 (2012) 16060-16071.
- [22] M.E. Dokukin, I. Sokolov, On the Measurements of Rigidity Modulus of Soft Materials in Nanoindentation Experiments at Small Depth, *Macromolecules*, 45 (2012) 4277-4288.
- [23] H. Hertz, Ueber die Berührung fester elastischer Körper, *Journal für die Reine und Angewandte Mathematik*, 1882 (1882) 156-171.
- [24] D. Maugis, Adhesion of spheres: The JKR-DMT transition using a dugdale model, *Journal of Colloid and Interface Science*, 150 (1992) 243-269.
- [25] B.B. Akhremitchev, G.C. Walker, Finite sample thickness effects on elasticity determination using atomic force microscopy, *Langmuir*, 15 (1999) 5630-5634.
- [26] I.N. Sneddon, The relation between load and penetration in the axisymmetric boussinesq problem for a punch of arbitrary profile, *International Journal of Engineering Science*, 3 (1965) 47-57.
- [27] E.K. Dimitriadis, F. Horkay, J. Maresca, B. Kachar, R.S. Chadwick, Determination of Elastic Moduli of Thin Layers of Soft Material Using the Atomic Force Microscope, *Biophysical Journal*, 82 (2002) 2798-2810.
- [28] S. Belikov, N. Erina, L. Huang, C. Su, C. Prater, S. Magonov, V. Ginzburg, B. McIntyre, H. Lakrout, G. Meyers, Parametrization of atomic force microscopy tip shape models for quantitative nanomechanical measurements, *Journal of Vacuum Science & Technology B*, 27 (2009) 984-992.
- [29] A. Michele, I. Vincenzo, F. Francesco, A. Maria, S. Roberto, Size effects in nanoindentation of hard and soft surfaces, *Nanotechnology*, 20 (2009) 235703.
- [30] S.C. Owen, S.A. Fisher, R.Y. Tam, C.M. Nimmo, M.S. Shoichet, Hyaluronic Acid Click Hydrogels Emulate the Extracellular Matrix, *Langmuir*, 29 (2013) 7393-7400.
- [31] F. Quignard, R. Valentin, F. Di Renzo, Aerogel materials from marine polysaccharides, *New Journal of Chemistry*, 32 (2008) 1300-1310.
- [32] C.A. García-González, M. Alnaief, I. Smirnova, Polysaccharide-based aerogels—Promising biodegradable carriers for drug delivery systems, *Carbohydrate Polymers*, 86 (2011) 1425-1438.

Chapitre 3

Les films de chitosane/PEG

Chapitre 3 Les films de chitosane/PEG

3.1	Objectifs et approche	139
3.2	Résultats expérimentaux.....	140
3.2.1	Caractérisation du chitosane (CS)	140
3.2.1.1	Détermination du degré d'acétylation (DA)	140
3.2.1.2	Détermination de la masse molaire moyenne visosimétrique (Mv)	141
3.2.2	Synthèse et caractérisation du chitosane-pentènoate (CS-p)	142
3.2.3	Mise en forme des films	144
3.2.4	Caractérisation des films	145
3.2.4.1	Apparence et épaisseur des films secs.....	145
3.2.4.2	Analyse FT-IR	146
3.2.4.3	Propriétés mécaniques des films secs.....	149
3.2.4.4	Stabilité des films dans le PBS	150
3.2.4.5	Gonflement des films dans le PBS	152
3.2.4.6	Préparation et caractérisations des films contenant des LNPs	155
3.3	Conclusion.....	156
	Références.....	157

3.1 Objectifs et approche

Pour la suite de ces travaux de thèse, nous avons sélectionné le chitosane (CS) pour élaborer de nouvelles matrices d'hydrogels. Le CS a été choisi pour ces propriétés biologiques et pour les diverses possibilités de le mettre en forme.

Dans ce chapitre, notre objectif a été de préparer une nouvelle matrice facile à manipuler et à conserver. Pour cela, nous avons utilisé les propriétés filmogènes du chitosane (CS) pour mettre en forme un nouveau système de délivrance de principe actif (DDS). Ce nouveau DDS, préparé sous forme d'un film doit être flexible et élastique, pour pouvoir être proposé comme patch transdermique.

Les films de CS purs sont rigides et cassants, limitant ainsi leurs applications. Deux stratégies ont alors été utilisées pour rendre le film plus élastique : 1) le CS a été mélangé à un polymère flexible, 2) les chaînes de CS ont été réticulées.

Dans la continuité du chapitre précédent, le poly(éthylène glycol) (PEG) a été mélangé au CS pour former des films hybrides de CS/PEG. Le PEG est connu pour être un excellent plastifiant [1]. Dans la littérature, certains auteurs rapportent la préparation de films hybrides à partir de CS mélangé à l'alginate [2], au PEG [3] ou à la gélatine [4]. Ces films aux nouvelles propriétés biologiques et mécaniques sont présentés comme ayant un fort potentiel pour servir de matrice pour des applications de délivrance de principes actifs [2, 4-9].

La seconde stratégie consiste à réutiliser la chimie radicalaire thiol-ène, pour réticuler chimiquement les films de CS. Cette chimie, déjà utilisée pour former les hydrogels de CMC/PEG (chapitre 2), a l'avantage de permettre un contrôle spatial et temporel de la réticulation. La réaction se fait sous UVs, en présence d'un photo-amorceur, entre un CS préalablement modifié par des groupements alcènes, et un PEG-bis(thiol) (PEG-(SH)₂). Des films de CS réticulés ont été rapportés dans la littérature. Miles et al ont développé des films de CS purs réticulés par des liaisons disulfures à partir de CS-thiol modifiés [10]. Les films réticulés hydratés présentent une amélioration significative des propriétés mécaniques comparés aux films non réticulés : le pourcentage d'élongation à la rupture a été multiplié par 6 (365 %) et la contrainte à la rupture a été multipliée par 4 (10 MPa). (Il est important de préciser que les essais mécaniques ont été réalisés sur des films hydratés). Des films hybrides semi-IPN de CS/PEG ont également été fabriqués par réticulation du CS par la génipine, un agent de couplage couramment utilisé pour réticuler le CS [11]. Ces films réticulés présentent une excellente stabilité à pH physiologique.

Dans ce chapitre, les propriétés des films hybrides de CS/PEG réticulés et non-réticulés ont été comparées. Des essais préliminaires sur les films intégrant les LNPs ont été réalisés.

3.2 Résultats expérimentaux

3.2.1 Caractérisation du chitosane (CS)

Le chitosane utilisé dans cette étude a été caractérisé par son degré d'acétylation et sa masse molaire moyenne viscosimétrique Mv. Il a ensuite été modifié chimiquement par des groupement alcène afin de permettre la réticulation des chaînes de CS avec le PEG-(SH)₂ par chimie thiol-ène.

3.2.1.1 Détermination du degré d'acétylation (DA)

Comme nous avons pu le voir dans la revue présentée chapitre 1, le degré d'acétylation est un paramètre important du chitosane dont dépendent ses propriétés. Il peut être déterminé par infrarouge [12], ou par RMN ¹H [13]. Cette dernière méthode a été choisie pour déterminer le DA du chitosane utilisé dans cette étude.

Le DA est calculé à partir du spectre RMN ¹H du CS présenté Figure 3-1, par intégration des signaux caractéristiques des protons des groupements désacétylés (I-H₂-NH₂) en prenant comme référence interne les protons anomériques du chitosane (I-H₁-NH₂ + I-H₁-COCH₃).

$$DA = 1 - \left(\frac{I(H_2 - NH_2)}{I(H_1 - NH_2) + I(H_1 - COCH_3)} \right) \quad (1)$$

Le DA calculé de 0,14 est proche du DA de 0.15 donné par le fournisseur.

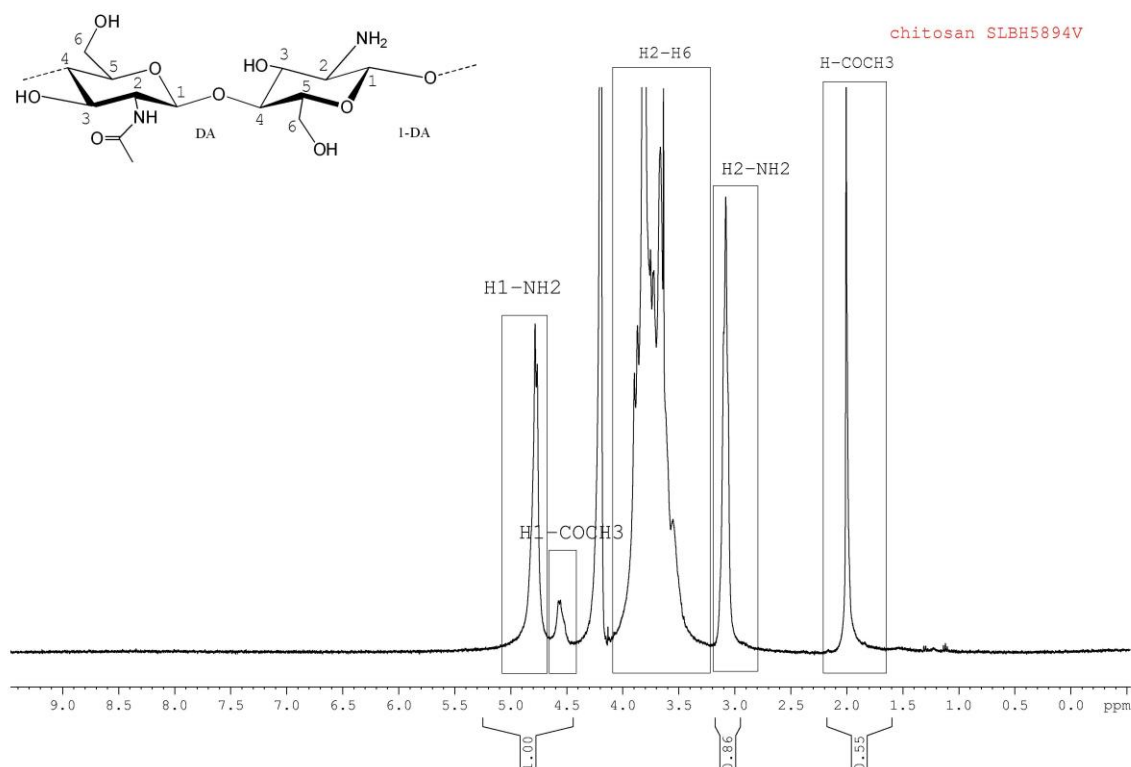


Figure 3-1: Spectre RMN ^1H du chitosane utilisé dans cette étude (80 °C, CD_3COOD , 5 mg/mL)

3.2.1.2 Détermination de la masse molaire moyenne viscosimétrique (M_v)

D'après la relation de Mark-Houwink, il est possible de déterminer la masse molaire viscosimétrique du CS à partir de sa viscosité intrinsèque [14]. La viscosité intrinsèque du CS a été mesurée à l'aide d'un viscosimètre capillaire d'Hubbelohde. Grâce à une étude en régime dilué, la viscosité réduite η_{red} a été représentée en fonction de la concentration c . Selon la relation de Huggins, η_{red} évolue de façon linéaire en fonction de la concentration en régime dilué :

$$\eta_{red} = [\eta] + k'c[\eta]^2 \quad (2)$$

où k' est la constante de Huggins et $[\eta]$ la viscosité intrinsèque. L'extrapolation des droites $\eta_{red} = f(c)$ lorsque $c \rightarrow 0$, permet de déterminer la viscosité intrinsèque $[\eta]$, et la constante de Huggins, k' , qui dépend du solvant et qui est comprise entre 0,3 et 0,8 en bon solvant. Les mesures réalisées pour le lot de CS utilisé sont présentées Figure 3-2.

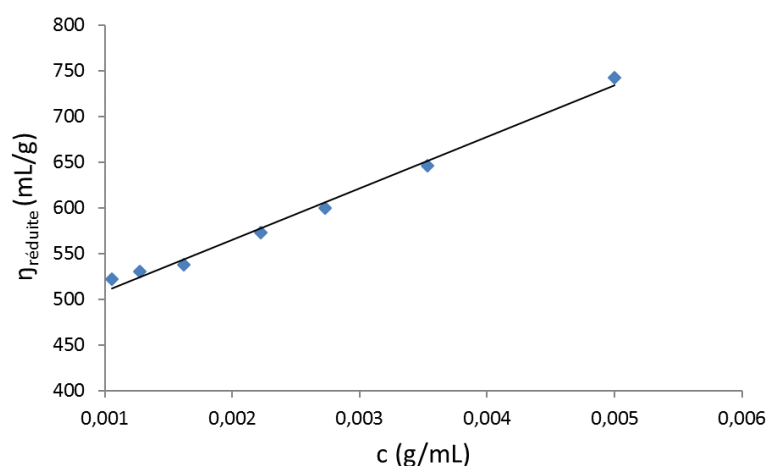


Figure 3-2: Variation de la viscosité réduite en fonction de la concentration pour une solution de CS dilué dans AcOH 0.3M/AcONa 0.1 M à 25 °C.

La loi de Mark-Houwink permet de relier la viscosité intrinsèque d'un polymère à sa masse molaire moyenne viscosimétrique (M_v):

$$[\eta] = KM_v^a \quad (3)$$

où a et K sont les coefficients empiriques de Mark-Houwink ($K=$, ils dépendent du degré d'acétylation (DA) du CS et du solvant. Nous avons utilisé les valeurs de ces coefficients déterminés par Brugnerotto et al. [15] pour le CS solubilisé dans le solvant que nous avons utilisé (AcOH 0,3M/AcONa 0,1M) à 25°C.

Les caractéristiques du CS ainsi que les valeurs des coefficients de Mark-Houwink utilisées sont présentés Tableau 3-1.

Tableau 3-1 : Caractéristiques du CS, ^a mesurées dans AcOH 0,3 M/AcONa 0,1 M à 25 °C, ^b valeurs issus des travaux de Brugnerotto et al. [15], ^c données fournisseur.

Nom	K^b	a^b	$[\eta]^a$ [mL/g] ^{2,3}	M_v [g/mol]	M_w^c [g/mol]
Chitosan Sigma Aldrich cas: 9012-76-4 (lot: STBC5292V)	0,074	0,798	497,04	62 500	60 000 - 120 000

3.2.2 Synthèse et caractérisation du chitosane-penténoate (CS-p)

Le CS-p est obtenu par réaction de l'anhydride penténoïque avec le CS en milieu acide (pH 4-5). La réaction préférentielle est l'addition nucléophile des groupements $-NH_2$ du CS sur l'anhydride. Le schéma de la réaction est présenté en Figure 3-3.

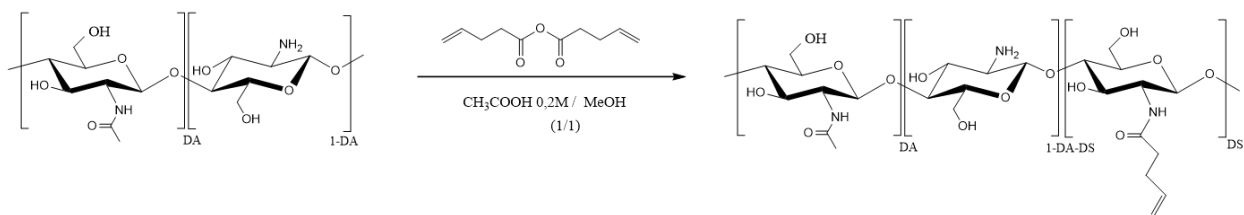


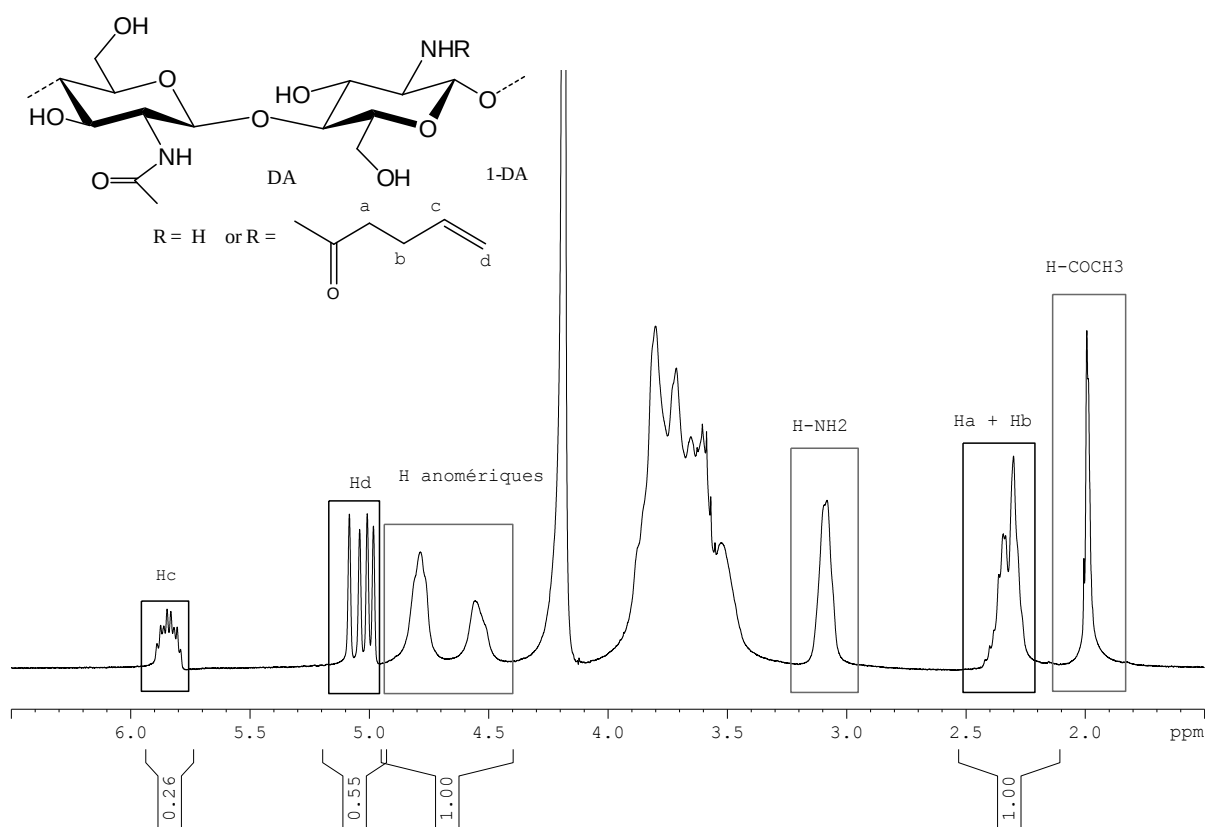
Figure 3-3 : Synthèse du CS-p

Le degré de substitution (DS) en groupements penténoate a été calculé par RMN ^1H à partir de l'équation 4, en intégrant l'aire des protons du groupement penténoate à 5.8, 5.0, 2.3 et 2.0 ppm par rapport à l'aire des protons anomériques du CS entre 4.5 et 4.9 ppm. Le spectre RMN ^1H du CS-p est présenté en **Erreur !**

Source du renvoi introuvable.

$$DS = \frac{I(H_c) + \frac{I(H_d)}{2} + \frac{I(H_a + H_b)}{4}}{3} \quad (4)$$

Le DS calculé est de 0.26 pour le CS-p utilisé dans cette étude.

Figure 3-4 : Spectre RMN ^1H du CS-p (5 mg/mL, 400 MHz, D_2O , 80°C)

3.2.3 Mise en forme des films

Les films ont été fabriqués à partir d'une solution de CS solubilisé dans l'acide acétique (1 % v/v pH = 4,2), coulée dans un moule en verre. L'acide acétique est ensuite évaporé. Un schéma détaillant le protocole de mise en forme des films est présenté Schéma 3-1.

Des films contenant des quantités de PEG-OH (PEG, Mw = 4 000 g/mol et PEG-SH, Mw = 3 500 g/mol) variables, non-réticulés ou réticulés par chimie thiol-ène, ont été préparés. Quelle que soit la quantité de PEG ajoutée la concentration en CS est fixée à 1 % w/v. La concentration de PEG dans la solution finale dépend du film préparé. Elle est de 0,2 % ou 0,5 % w/v. Le film non réticulé préparé à partir d'une solution en CS à 1% w/v et en PEG-OH à 0,2% w/v est noté « CS1%PEG0,2%-non-réticulé ». Le même film réticulé, est noté CS1%PEG0,2%-réticulé, bien qu'il ait été préparé à partir de CS modifié (CS-p) et de PEG-(SH)₂.

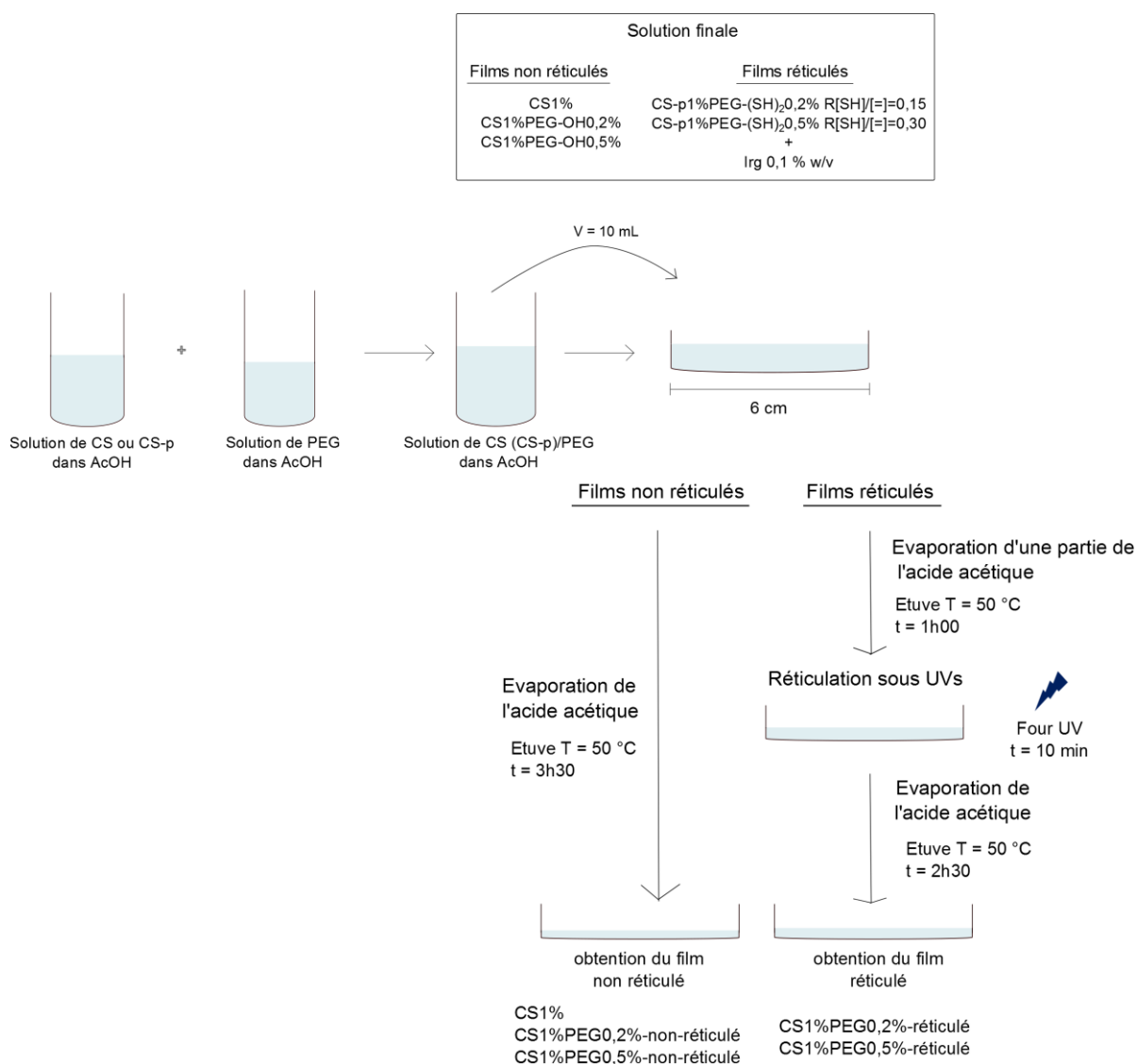


Schéma 3-1: Représentation schématique du procédé de mise en forme des films réticulés et non-réticulés

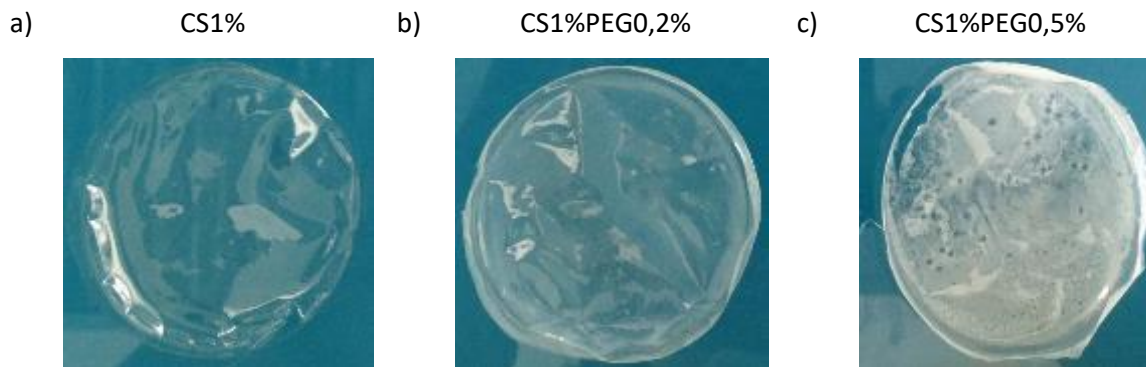
3.2.4 Caractérisation des films

Différentes caractérisations ont été réalisées sur les films secs puis sur les films hydratés, afin d'évaluer l'influence du PEG et de la réticulation sur leurs propriétés.

3.2.4.1 Apparence et épaisseur des films secs

Les films secs obtenus à la fin du procédé sont présentés sur les photos de la Figure 3-5.

Films non-réticulés



Films réticulés

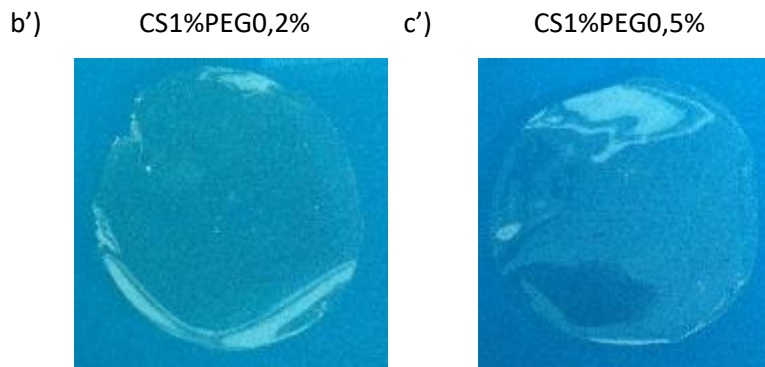


Figure 3-5 : Images des films secs non-réticulés et réticulés de CS pur (CS1% (w/v)) et de CS/PEG (CS1%PEG0,2% et CS1%PEG0,5%).

Si l'on compare les films non-réticulés, le film de CS pur (CS1%) est transparent, alors que les films hybrides de CS/PEG sont plus opaques. Plus la concentration en PEG dans le film est élevée et plus le film est opaque. Zivanovic et al. qui ont étudié des films de CS ($M_w = 150\,000$ g/mol, $DA < 0,15$)/PEG ($M_w = 900\,000$ g/mol), attribuent ce blanchiment à la formation d'agrégats de cristaux de PEG (sphérulites) [3]. Ils ont étudié la cristallisation du PEG dans leurs films de CS/PEG par microscopie en lumière polarisée. Ils ont observé une augmentation du nombre de cristaux avec l'augmentation de la quantité en PEG. Dans leur étude, aucun cristal de PEG n'a été observé dans les films CS1%PEG0,1% ; les premiers cristaux apparaissent dans les films CS1%PEG0,25%. D'autres rapportent une séparation de phase entre le CS et le

PEG pour certains ratios de CS/PEG. Ceci peut également justifier la présence de précipités blancs sur les films non-réticulés contenant du PEG. Jin et al. ont observé une séparation de phase pour les films de CS ($M_w = 300\,000$ g/mol)/PEG ($M_w = 20\,000$ g/mol ou 600 g/mol) au dessus d'un ratio en PEG de 50/50 CS/PEG [11]. Ils ont également observé que la réticulation des films permettait de s'affranchir de ce problème.

En effet, contrairement aux films non réticulés, les films réticulés sont transparents pour des quantités de PEG identiques. La réticulation pourrait empêcher la cristallisation du PEG, polymère semi-cristallin. Toutefois, ces films opaques restent intéressants, ils sont faciles à manipuler (ils ne collent pas et ne s'enroulent pas, comparés aux films de CS pur).

L'épaisseur des films secs réticulés et non-réticulés a été mesurée à l'aide d'un micromètre. L'épaisseur indiquée dans le tableau est une moyenne des épaisseurs mesurées sur 2 films différents de 6 cm de diamètre. Pour chaque film, son épaisseur est une moyenne de 6 mesures réalisées à des endroits différents.

Tableau 3-2 : Epaisseurs des films de CS pur, de CS/PEG non-réticulés et réticulés par chimie thiol-ène

Films (% w/v)	épaisseur (μm)
<u>films non-réticulés</u>	
CS1%	$22,8 \pm 6,2$
CS1%PEG0,2%	$29,0 \pm 4,3$
CS1%PEG0,5%	$41,0 \pm 8,6$
<u>films réticulés</u>	
CS1%PEG0,2%	$35,2 \pm 4,9$
CS1%PEG0,5%	$38,0 \pm 8,2$

Les épaisseurs mesurées sont cohérentes avec les formulations ; le film le plus épais est le film contenant le plus de PEG (CS1%PEG0,5%). En tenant compte de l'erreur, pour une quantité identique en PEG, la réticulation ne modifie pas l'épaisseur du film sec.

3.2.4.2 Analyse FT-IR

La spectroscopie infra-rouge (IR) est utilisée pour étudier les interactions intermoléculaires entre le CS et le PEG. Les interactions physiques possibles entre ces 2 polymères peuvent provenir de liaisons hydrogènes entre les groupements $-\text{NH}_2$, $-\text{NHCOCH}_3$ et $-\text{OH}$ du CS avec les groupements $-\text{COC}$ du PEG. Nous avons dans un premier temps étudié les films non-réticulés. Le spectre du PEG-OH et les spectres des films contenant 0, 20 et 50% de PEG par rapport à la concentration en CS de 1 % w/v dans la solution finale des

films sont représentés Figure 3-6. Nous avons étudié ces spectres entre 2000 et 600 cm^{-1} , car pour des longueurs d'ondes supérieures les bandes de vibration des groupements -O-H et -N-H se superposent.

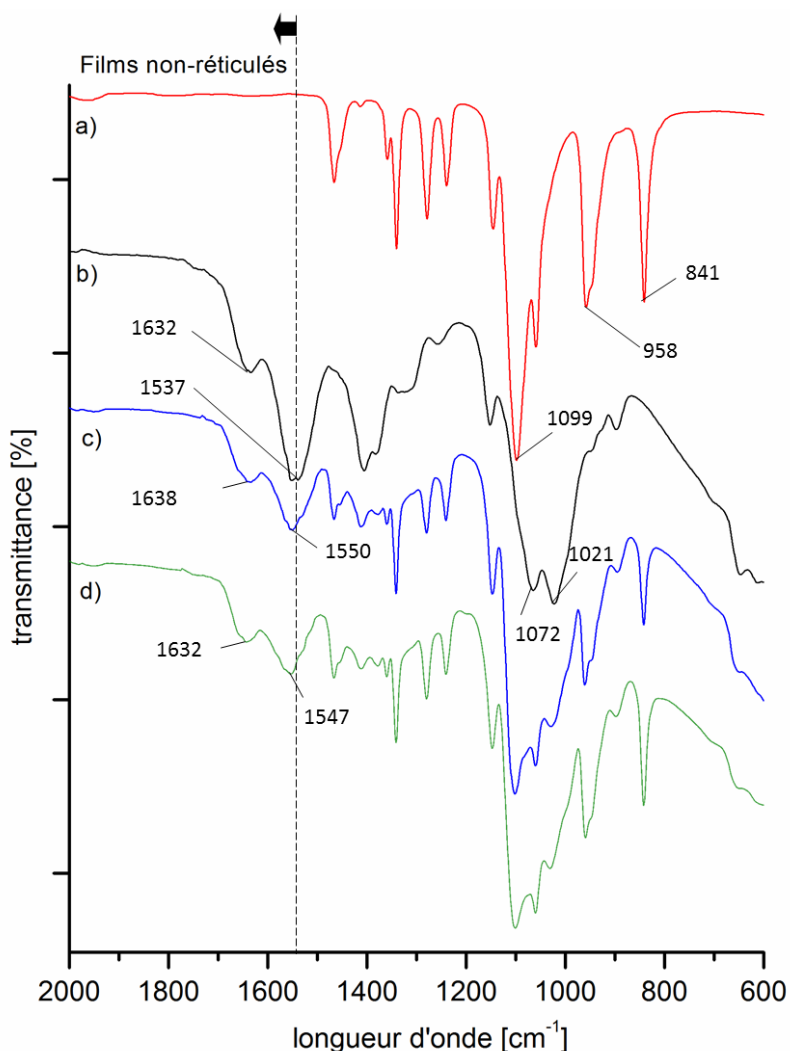


Figure 3-6: Spectre FTIR du PEG a) (PEG-OH, $M_w=4\,500\text{ g/mol}$), et des films de b) CS1% (film de CS pur), c) CS1%PEG0,2%-non-réticulé, d) CS1%PEG0,5%-non-réticulé.

Le film de CS pur (Figure 3-6-b) présente des bandes distinctes à 1632 et 1537 cm^{-1} , attribués respectivement à l'amide I (-C=O) et à l'amide II (-C-N). La vibration d'élongation C-O- produit une bande d'absorption entre 1072 et 1021 cm^{-1} , caractéristique de la structure polysaccharidique. Après formation des films non-réticulés de CS/PEG, la bande d'absorption à 1537 cm^{-1} de l'amide II du CS est décalée vers des longueurs d'ondes supérieures (1547 et 1550 cm^{-1} pour les spectres c et d respectivement), suggérant la présence de liaisons hydrogène entre les groupements amides du CS et les groupements hydroxyle du PEG vers 3000 cm^{-1} . La bande à 1098 cm^{-1} attribuée aux liaisons éther (-COC) du PEG reste inchangée sur les spectres des films de CS/PEG (spectres c et d). Les bandes C-O- du CS et -COC du PEG sont distinctes. Les bandes à 958 et 841 cm^{-1} sur le spectre du PEG (spectre a) sont les contributions des zones cristallines

du PEG. On peut noter une diminution de la transmittance de ces pics sur le spectre des films de CS/PEG (spectre c et d), attestant de la diminution de la cristallinité du PEG. Cette diminution est d'autant plus importante pour le film contenant le moins de PEG. Kolhe et al. ont également démontré une diminution des zones cristallines du PEG dans des films de CS/PEG (70/30) par analyse IR et diffusion des rayons X [16]. Ils l'attribuent à la présence d'interactions intermoléculaires CS/PEG. Néanmoins une partie du PEG reste à l'état cristallin, ce qui peut justifier l'apparence opaque des films de CS/PEG.

Les mêmes films réticulés par chimie thiol-ène ont été analysés par spectroscopie IR (Figure 3-7). Aucune différence n'a été observée entre les spectres des films réticulés contenant le PEG à 0,5 et 0,2 % w/v. Nous avons donc choisi de présenter uniquement le spectre du film CS1%PEG0,5%-réticulé (spectre d) et de le comparer à son homologue non-réticulé (spectre c). D'importantes différences peuvent être observées entre ces 2 films. Les bandes à 958 et 841 cm^{-1} caractéristiques du caractère cristallin du PEG ont quasiment disparu sur le spectre du film réticulé. Ceci est en bonne adéquation avec l'aspect transparent des films réticulés. Des interactions intermoléculaires entre le PEG et le CS sont toujours présentes dans le film réticulé (décalage du pic de l'amide II du CS à 1537 cm^{-1} sur le spectre du film réticulé, spectre d). On distingue sur le spectre du film réticulé (spectre-c) un épaulement à 795 cm^{-1} caractéristique de la liaison –C-S, confirmant la réticulation entre le CS (CS-p) et le PEG (PEG-bis(thiol)) par chimie thiol-ène.

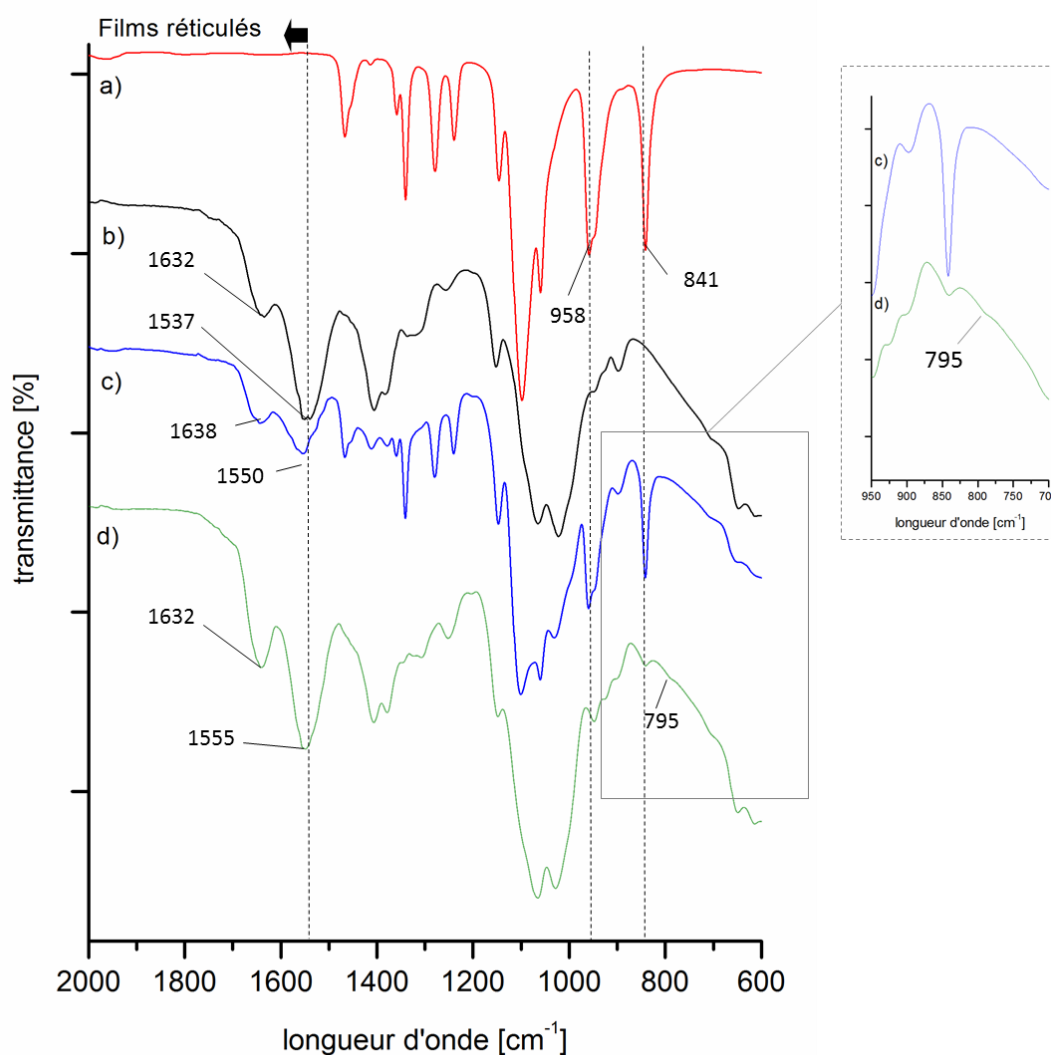


Figure 3-7: Spectre FTIR du PEG a) (PEG-OH, Mw=4 500 g/mol)), et des films de b) CS1% (film de CS pur), c) CS1%PEG0,5%-non-réticulé, d) CS1%PEG0,5%-réticulé.

3.2.4.3 Propriétés mécaniques des films secs

L'évaluation des propriétés mécaniques de ces films est une caractérisation importante pour déterminer la capacité du matériau à endurer diverses déformations durant son utilisation en tant que patch transdermique. La résistance des films secs en traction, jusqu'à la rupture, a été enregistrée. La contrainte à la rupture et le pourcentage d'élongation à la rupture des films sont reportés dans le Tableau 3-3.

Tableau 3-3 : Tests en traction sur les films secs de CS, CS/PEG non-réticulés et réticulés. Mesure de la contrainte à la rupture et de la déformation à la rupture (n=4).

Film (w/w CS/PEG)	contrainte à la rupture (Mpa)	élongation à la rupture (%)
<u>films non réticulés</u>		
CS1%	40,8 ± 6,0	35,2 ± 8,2
CS1%PEG0,2%	45,7 ± 7,9	30,9 ± 3,1
CS1%PEG0,5%	41,3 ± 3,8	3,5 ± 0,8
<u>films réticulés</u>		
CS1%PEG0,2%	75,9 ± 13,2	55,8 ± 0,3
CS1%PEG0,5%	87,6 ± 11,4	40,8 ± 11,2

Pour les films non-réticulés, la contrainte à la rupture reste inchangée, quelle que soit la quantité de PEG ajoutée. Cela n'est pas le cas pour l'élongation des films à la rupture. L'extensibilité du film contenant le plus de PEG, CS1%PEG0,5%, est divisée par 10 (élongation de $3,5 \pm 0,8$ %) comparé au film de CS pur CS1% (élongation de $35,2 \pm 8,2$ %). L'ajout d'une telle quantité de PEG conduit à un film cassant. Pour le film non-réticulé CS1%PEG0,2%, l'extensibilité du film n'est pas modifiée par rapport au film de CS pur. Zivanovic et al. ont également observé une diminution de l'extensibilité de leur films de CS/PEG avec l'augmentation de la quantité de PEG [3]. Ils ont mesuré pour leurs films de CS ($M_w = 150\,000$ g/mol) pur de $40\,\mu\text{m}$ d'épaisseur, une contrainte à la rupture et une élongation à la rupture de $73,5 \pm 7,1$ MPA et $17,7 \pm 13,3$ % respectivement. L'ajout de PEG ($M_w=900\,000$ g/mol) réduit alors l'extensibilité du film à $\sigma_{\text{rupture}}=54,3 \pm 3,8$ MPa et $\varepsilon_{\text{rupture}}=17,7 \pm 13,3$ % pour le film (CS1%)PEG(6%) ([3]).

La réticulation des films permet de s'affranchir de ces problèmes de cristallisation, améliorant de façon significative les 2 caractéristiques mécaniques des films; l'élongation à la rupture et la contrainte à la rupture. La résistance à la rupture est multipliée par 2 comparé aux films de CS1% et CS1%PEG0,2% et l'extensibilité par 1,8 %. Aucune différence significative n'est observée entre les 2 films réticulés. L'erreur sur les essais en traction est trop importante et la différence de réticulation trop faible (CS1%PEG0,2% -> [SH/ENE]=0,10 et CS1%PEG0,5% -> [SH/ENE]=0,30) pour pouvoir distinguer les propriétés mécaniques de ces 2 films.

3.2.4.4 Stabilité des films dans le PBS

Le CS est soluble en milieu acide ($\text{pH} < 6$) mais n'est pas soluble à pH physiologique ($\text{pH} = 7,4$) alors que le PEG l'est quel que soit le pH. Il est donc possible que les films de CS/PEG non-réticulés puissent être altérés par la dissolution du PEG lorsqu'ils sont immergés en milieu tampon. La stabilité des films de CS/PEG est estimée en mesurant le % de polymère qui reste dans le film après une immersion de 24 h dans le PBS (mesure gravimétrique). Les résultats sont présentés Figure 3-8. Avant d'être immergés dans la solution de

PBS, les films ont été trempés dans une solution d'hydroxyde d'ammonium (NH_4OH à 2 % v/v) pour éliminer les traces d'acide acétique et éviter que les films ne se dissolvent.

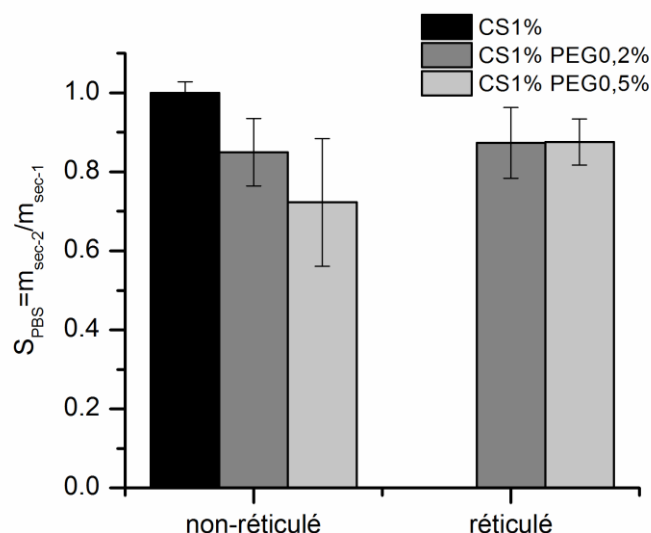


Figure 3-8: Evaluation de la stabilité des films de CS ou CS/PEG non-réticulés et réticulés dans le PBS. (n=3).

La stabilité des films non-réticulés diminue légèrement par rapport au film de CS pur (CS1%), et cela de façon plus marquée pour le film au % de PEG le plus important. Néanmoins, cette diminution reste faible et à la limite de l'erreur de mesure. Pour les films réticulés, on n'observe pas de différence entre 0,2 % et 0,5 % de PEG, et très peu de différence avec le film de CS pur. Il n'y a donc pas eu de perte de matière, en l'occurrence de PEG (car soluble dans le PBS), durant la période d'immersion (24h) dans le PBS. Néanmoins, les films de CS/PEG non-réticulés restent opaques après immersion dans le PBS, alors que les films de CS pur (CS1%) et les films réticulés sont transparents. Si l'opacité des films est due à des cristaux de PEG, ceux-ci ne sont pas éliminés par immersion des films dans le PBS et le PEG est toujours présent après 24h d'immersion dans le PBS.

Films non réticulés



Films non réticulés

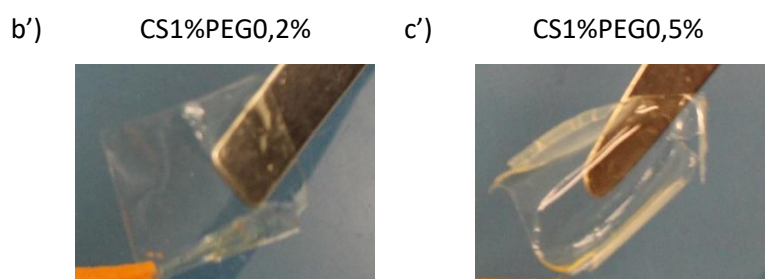


Figure 3-9: Observation des films de CS pur et des films de CS/PEG non-réticulés et réticulés après avoir été trempés dans une solution de NH_4OH , rincés et immergés pendant 24h dans une solution de PBS.

3.2.4.5 Gonflement des films dans le PBS

Le taux de gonflement des films réticulés et non réticulés de CS et CS/PEG a d'abord été mesuré dans le PBS, à différents temps d'immersion. Les résultats de ces gonflements sont présentés Figure 3-10. Comme précédemment, avant d'être immergés dans la solution de PBS, les films ont été trempés dans une solution basique de NH_4OH pour éliminer l'acide acétique contenu dans le film, puis rincés au PBS.

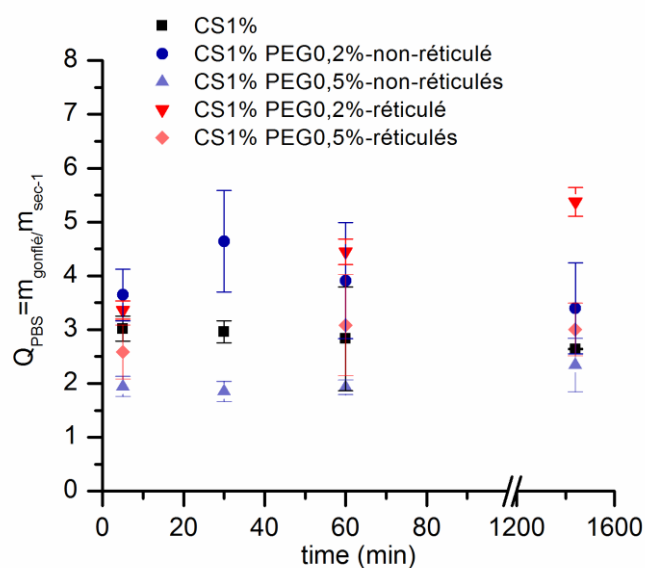


Figure 3-10: Mesure du taux de gonflement dans le PBS à différents temps d'immersion, des films de CS purs, CS/PEG non-réticulés et réticulés (n=3).

Les films de CS et CS/PEG gonflent rapidement dans le PBS. Le gonflement à l'équilibre est atteint en 5 min. Les 2 polymères, séparément, gonflent rapidement dans l'eau, car ils forment des liaisons hydrogène avec l'eau et sont ainsi capables de retenir un large volume d'eau.

Les taux de gonflement des différents films préparés, mesurés après 1h d'immersion dans le PBS sont présentés Figure 3-11.

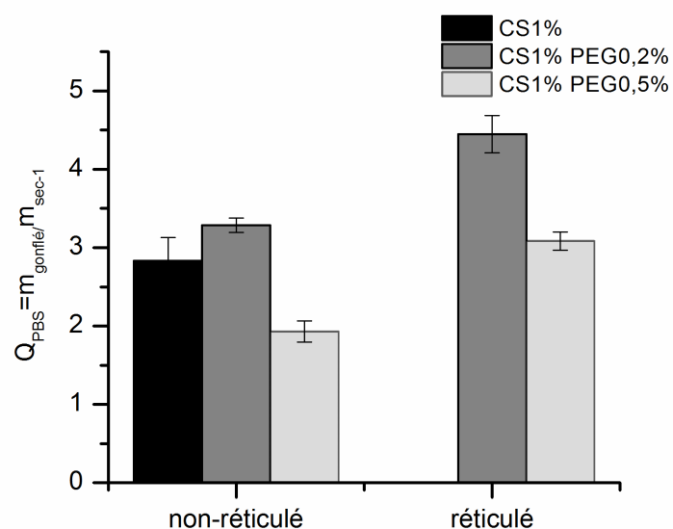


Figure 3-11 : Taux de gonflement dans le PBS après 1h d'immersion des films de CS pur, CS/PEG non-réticulés et réticulés. (n=3).

Concernant les films non- réticulés, après 1h d’immersion dans le PBS, le film contenant le plus de PEG (CS1%PEG0,5%) gonfle moins que le film de CS pur et de CS1%PEG0,2%. Ce résultat pourrait être expliqué par la présence d’interactions CS/PEG.

On peut noter que plus les films sont réticulés et moins ils gonflent, en raison d’une densification du réseau.

Comparé aux éponges de CS/PEG, qui seront présentées au chapitre 4 et pour lesquelles le taux de gonflement est de 2500 %,le taux de gonflement des films est largement inférieur (max 400%).

Pour mettre en évidence la réticulation des films par chimie thiol-ène, les films non-réticulés et réticulés ont été plongés dans une solution d’acide acétique à 1 % v/v directement après fabrication. Alors que les films non-réticulés sont totalement dissous en quelques secondes, les films réticulés restent intacts 24h après, comme le démontrent les photos de la Figure 3-12. Ceci confirme la réticulation entre le CS et le PEG (PEG-(SH)₂).

Films réticulés

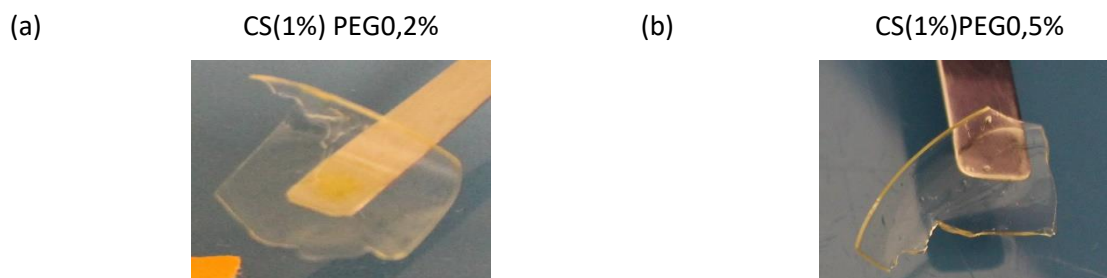


Figure 3-12: Observation des films de CS/PEG immergés dans une solution d'acide acétique à 1 % v/v pendant 24h

Le taux de gonflement des films réticulés a été mesuré dans l’acide acétique à t=1 h. Les résultats sont présentés Figure 3-13.

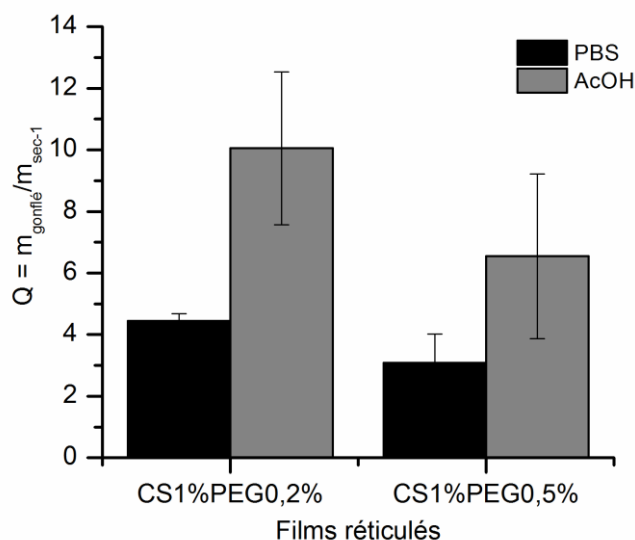


Figure 3-13: Taux de gonflement des films de CS/PEG réticulés dans l'acide acétique à 1 % (v/v).

Les taux de gonflement mesurés en milieu acide sont 2 fois supérieurs à ceux mesurés dans le PBS. L'augmentation du volume d'eau retenu par le film est due à la protonation des groupements $-NH_2$ en NH_3^+ en milieu acide, entraînant des répulsions électrostatiques des chaînes de CS rendant moins dense le réseau.

Ce changement de comportement en fonction du pH peut être un argument valable pour proposer ces films réticulés comme systèmes de délivrance de principes actifs, activables en milieu acide.

3.2.4.6 Préparation et caractérisations des films contenant des LNPs

Ayant pour objectif de proposer ces films comme systèmes de délivrance de principes actifs hydrophobes, les LNPs ont été incorporées dans les films. Elles ont été ajoutées à la solution de CS/PEG en milieu acide avant l'étape d'évaporation, à 25 % w/w_{CS}. L'influence de la présence des LNPs sur les propriétés des films a été mesurée sur le film non-réticulé contenant 0,2 % w/v de PEG. Les propriétés des films avec et sans particules sont présentées dans le Tableau 3-2.

Tableau 3-4: Tableau résumé des propriétés du film CS1%PEG0,2%-non-réticulé, avec LNPs (25 % w/w_{CS}) et sans.

	Film CS1%PEG0,2%-non réticulé	
	sans LNPs	avec LNPs
stabilité (S)	0,84 ± 0,08	1,0 ± 0,2
gonflement (Q)	3,3 ± 0,4	3,5 ± 0,5
contrainte à la rupture	45,7 ± 7,9	33,9 ± 4,2
élongation à la rupture	30,9 ± 3,1	55,0 ± 20,2

Les films contenant les LNPs présentent des propriétés similaires aux films contrôle sans LNPs. Ces premiers résultats sont encourageant quant au développement de ces films composites CS/PEG/LNPs.

3.3 Conclusion

Dans cette étude, la chimie thiol-ène a été réutilisée pour réticuler des films de CS-p/PEG. Les propriétés de ces films réticulés ont été comparées à celles des films de CS/PEG non-réticulés. Il a été démontré que l'ajout de PEG dans la préparation des films non-réticulés, conduisait à des films opaques et cassants. Néanmoins, ces films hydratés, bien que toujours opaques, sont stables dans le PBS, conservent leur forme et sont faciles à manipuler. La réticulation des films permet d'obtenir des films transparents et homogènes avec une meilleure extensibilité. De plus, ces films réticulés n'ont pas besoin d'être trempés dans une solution basique avant d'être utilisés. Ils sont prêts à l'emploi directement à la fin du procédé de fabrication et sont sensibles au pH : ils gonflent davantage en milieu acide. L'analyse par spectroscopie IR a permis de justifier l'opacité des films non-réticulés et leurs propriétés limitées par la présence de PEG cristallisé. Ces bandes caractéristiques du PEG cristallisé disparaissent sur les spectres des films réticulés expliquant l'aspect transparent de ces derniers films.

Des LNPs de diamètre 120 nm ont été intégrées dans le film non-réticulé de CS1%PEG0,2%. L'analyse préliminaire des nouvelles propriétés de ce film hybride a démontré que le taux de gonflement des films ainsi que leurs propriétés mécaniques n'étaient pas modifiées.

Ces résultats préliminaires devront être confortés par des mesures de stabilité des particules dans ces films pour justifier de l'approche double encapsulation.

Références

- [1] N.E. Suyatma, L. Tighzert, A. Copinet, V. Coma, Effects of Hydrophilic Plasticizers on Mechanical, Thermal, and Surface Properties of Chitosan Films, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (2005) 3950-3957.
- [2] X. Meng, F. Tian, J. Yang, C.-N. He, N. Xing, F. Li, Chitosan and alginate polyelectrolyte complex membranes and their properties for wound dressing application, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 21 (2010) 1751-1759.
- [3] S. Zivanovic, J. Li, P.M. Davidson, K. Kit, Physical, Mechanical, and Antibacterial Properties of Chitosan/PEO Blend Films, *Biomacromolecules*, 8 (2007) 1505-1510.
- [4] M.M. Rahman, S. Pervez, B. Nesa, M.A. Khan, Preparation and characterization of porous scaffold composite films by blending chitosan and gelatin solutions for skin tissue engineering, *Polymer International*, 62 (2013) 79-86.
- [5] M. Cheng, J. Deng, F. Yang, Y. Gong, N. Zhao, X. Zhang, Study on physical properties and nerve cell affinity of composite films from chitosan and gelatin solutions, *Biomaterials*, 24 (2003) 2871-2880.
- [6] K. Tomihata, Y. Ikada, In vitro and in vivo degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives, *Biomaterials*, 18 (1997) 567-575.
- [7] A. Altinisik, K. Yurdakoc, Synthesis, characterization, and enzymatic degradation of chitosan/PEG hydrogel films, *Journal of Applied Polymer Science*, 122 (2011) 1556-1563.
- [8] X.-L. Yan, E. Khor, L.-Y. Lim, Chitosan-alginate films prepared with chitosans of different molecular weights, *Journal of Biomedical Materials Research*, 58 (2001) 358-365.
- [9] Y.J. Yin, K.D. Yao, G.X. Cheng, J.B. Ma, Properties of polyelectrolyte complex films of chitosan and gelatin, *Polymer International*, 48 (1999) 429-432.
- [10] K.B. Miles, R.L. Ball, H.W.T. Matthew, Chitosan films with improved tensile strength and toughness from N-acetyl-cysteine mediated disulfide bonds, *Carbohydrate Polymers*, 139 (2016) 1-9.
- [11] J. Jin, M. Song, D.J. Hourston, Novel Chitosan-Based Films Cross-Linked by Genipin with Improved Physical Properties, *Biomacromolecules*, 5 (2004) 162-168.
- [12] M.L. Duarte, M.C. Ferreira, M.R. Marvão, J. Rocha, An optimised method to determine the degree of acetylation of chitin and chitosan by FTIR spectroscopy, *International Journal of Biological Macromolecules*, 31 (2002) 1-8.
- [13] M. Lavertu, Z. Xia, A.N. Serreqi, M. Berrada, A. Rodrigues, D. Wang, M.D. Buschmann, A. Gupta, A validated ¹H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 32 (2003) 1149-1158.
- [14] W.-M. Kulicke, C. Clasen, Execution of Viscosity Measurements, in: *Viscosimetry of Polymers and Polyelectrolytes*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2004, pp. 13-39.
- [15] J. Brugnerotto, J. Desbrières, L. Heux, K. Mazeau, M. Rinaudo, Overview on structural characterization of chitosan molecules in relation with their behavior in solution, *Macromolecular Symposia*, 168 (2001) 1-20.
- [16] P. Kolhe, R.M. Kannan, Improvement in ductility of chitosan through blending and copolymerization with PEG: FTIR investigation of molecular interactions, *Biomacromolecules*, 4 (2003) 173-180.

Chapitre 4

Les éponges de chitosane/PEG

Chapitre 4 Les éponges de chitosane/PEG

4.1	Contexte	161
4.1.1	Objectifs.....	161
4.1.2	APPROCHE : les éponges de chitosane/PEG réticulées.....	161
4.2	Résultats	162
4.2.1	Article sur les éponges de chitosane/PEG.....	162
4.2.2	Résultats complémentaires sur les éponges.....	188
4.2.2.1	Etude rhéologique complémentaire des hydrogels de PEG (PEG-YNE/PEG-SH) ..	188
4.2.2.2	Inclusion des LNPs dans les éponges de CS/PEG	193
4.3	Conclusion.....	198
	Références.....	200

4.1 Contexte

4.1.1 Objectifs

L'objectif de cette dernière étude, est de développer une nouvelle matrice hydrogel pour préparer des matériaux composites intégrant les nanoparticules lipidiques (LNPs). Le design de ces nouveaux hydrogels devra être réfléchi pour proposer un matériau facile à manipuler et capable de libérer la majeure partie des LNPs encapsulées. Un autre challenge consistera à mettre au point une nouvelle chimie de réticulation pour remplacer la chimie thiol-ène radicalaire précédemment utilisée, et ainsi éliminer la présence de radicaux libres, qui risqueraient d'interférer et de dégrader le principe actif encapsulé dans le cœur des particules. Ces nouveaux systèmes pourront être implantés ou servir de patchs transdermiques.

4.1.2 APPROCHE : les éponges de chitosane/PEG réticulées

Le chitosane (CS), un polysaccharide extrait de la carapace des crustacés, a été choisi comme composant de ce nouveau système de délivrance pour ses propriétés anti-microbiennes et muco-adhésives. Ce polysaccharide est déjà utilisé dans des systèmes commercialisés tel que des pansements ou des DDS implantables [1, 2].

Nous avons choisi d'utiliser le procédé de lyophilisation pour créer des hydrogels macroporeux, qualifiés d'éponges dans cette étude. Les éponges ont l'avantage d'avoir une porosité interconnectée, permettant potentiellement la diffusion des nanoparticules dans le réseau, d'être souples et donc facilement implantables au niveau du site biologique où le PA doit être délivré. Néanmoins, les éponges de CS pur présentent une stabilité limitée et se décomposent rapidement en milieu acide. Pour palier à ces limitations, du poly(éthylène glycol) (PEG), un polymère flexible et biocompatible a été ajouté à la formulation des éponges.

Aussi, pour éviter que le PEG se solubilise durant l'utilisation de l'éponge, le réseau de PEG a été réticulé dans la solution de CS, formant un réseau semi-interpénétré (semi-IPN). Une nouvelle chimie, la chimie thiol-yne par addition nucléophile, a été développée pour réticuler ces chaînes de PEG fonctionnalisées (PEG-bis-thiol (PEG-SH) $M_w=3\,400$ g/mol et tétra-PEG-alcyne (PEG-YNE) $M_w=10\,206$ g/mol). Cette chimie a été rapportée comme étant efficace dans le PBS à pH 7,4 sans ajouts d'agents toxiques [3].

Dans un premier temps, la cinétique de gélification du réseau simple de PEG (PEG-YNE/PEG-SH) a été étudiée. Des conditions de gélification optimales ont été retenues pour former ce réseau PEG dans les éponges de CS et la cinétique de gélification du réseau dans les éponges a été évaluée. Les propriétés physico-chimiques de ces éponges ont été comparées à celles des éponges non réticulées.

Après avoir caractérisé les éponges de CS/PEG réticulées et non réticulées, les LNPs ont été intégrées dans ces matériaux. Un schéma représentant le réseau des éponges composites réticulées est présenté Figure 4-1.

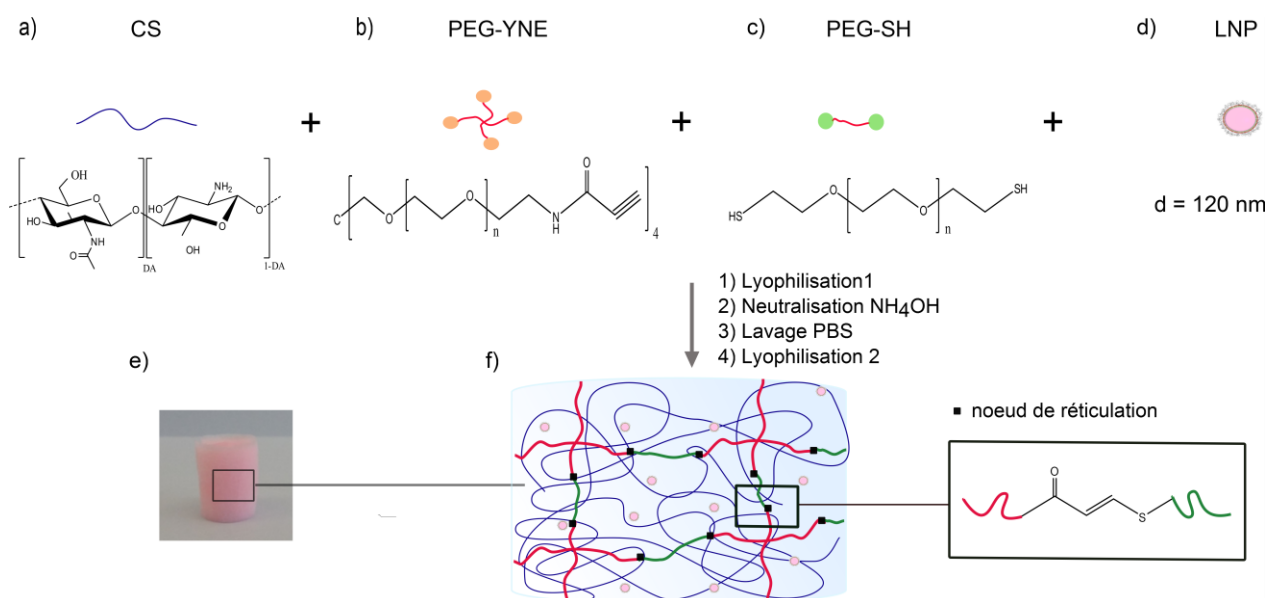


Figure 4-1: Représentation schématique du réseau des éponges de CS/PEG composites réticulées. a) formule chimique du CS, b) formule chimique du tétra-PEG-alcyne (PEG-YNE), c) formule chimique du PEG-bis-thiol (PEG-SH), d) représentation des nanoparticules lipidiques (LNPs), e) du matériau obtenu et f) du réseau formé.

L'essentiel de ce chapitre est consacré à l'étude de la cinétique de gélification des PEGs par addition nucléophile thiol-yne sous forme d'un simple réseau, ou d'un réseau semi-interpénétré lorsque les PEGs sont mélangés à du CS. Cette étude a fait l'objet d'une 2nde publication en cours de finalisation. Les études conduites sur les matériaux composites, incorporant les LNPs sont présentées en résultats complémentaires.

4.2 Résultats

Le chitosane utilisé pour fabriquer les éponges décrites est le même que celui ayant servi à fabriquer les films présentés dans le chapitre 3 (DA = 0,14 et Mv = 62 500 g/mol).

4.2.1 Article sur les éponges de chitosane/PEG

La chimie thiol-yne par addition nucléophile a été développée pour réticuler des hydrogels de PEG fonctionnalisés par des groupements alcynes (tétraPEG-alcyne (PEG-YNE)) et des groupements thiol (PEG-bisthiol (PEG-SH)). La cinétique de gélification du réseau simple de PEG-SH/PEG-YNE a d'abord été étudiée par rhéologie. Cette solution de PEG fonctionnalisés a ensuite été mélangée à une solution de CS puis mis

sous forme d'éponge. La gélification du réseau PEG dans les éponges de CS a été étudié et les propriétés des éponges au réseau semi-interpénétré ont été évaluées.

Design of interpenetrating chitosan and poly (ethylene glycol) sponges for potential drug delivery applications

Lisa Racine^{1,2}, Guillaume Costa¹, Eric Bayma², Isabelle Texier^{1*}, and Rachel Auzély-Velty^{2*}

¹ *Grenoble Alpes Univ., F-38000 Grenoble France, and CEA LETI MINATEC Campus, F-38054 Grenoble France*

² *Grenoble Alpes Univ., CERMAV-CNRS, F-38000 Grenoble France*

Semi-interpenetrated chitosan (CS)/poly(ethylene glycol) (PEG) sponges were designed by crosslinking PEG in the CS matrix via nucleophilic thiol-yne addition. This reaction does not require the use of any potentially cytotoxic catalytic species and offers possibilities to prepare materials with tunable properties. The molecular structure of the sponges was analyzed by FTIR spectroscopy, which provided evidence of intermolecular interactions between PEG and CS, and the presence of a cross-linked PEG network in the CS matrix. The crosslinked CS/PEG sponges displayed a structure with large interconnected pores (tens of micrometer) as demonstrated by scanning electron microscopy, in comparison to blended materials with irregular and smaller pores. The crosslinked sponges also exhibited improved mechanical properties (higher Young's modulus) and stability at physiological pH. All together, these interesting properties open the way for the application of this biomaterial in topical drug delivery.

Keywords: chitosan, poly(ethylene) glycol, sponges, semi-interpenetrating network.

1. Introduction

Over the past decades, surface-mediated drug delivery systems have shown numerous potential benefits including reduced side effects and improved therapeutic efficacy (Brudno & Mooney, 2015). On-site release of therapeutics from medical devices can typically provide a controlled release of medication while preventing damage to the surrounding tissue. In this regard, biopolymer sponges, consisting of soft and flexible scaffolds with interconnected porous structures, have emerged as a promising approach for the localized and sustained delivery of drugs (X.-c. Chen et al., 2016; Parker et al., 2016; Tadros & Fahmy, 2014). Simple drug-loaded sponges using biopolymers like chitosan (Foda, El-laithy, & Tadros, 2004), gelatin (Lee & Yalkowsky, 1999), carboxymethyl cellulose (Ryan & Sax, 1995), and collagen (Kim et al., 2014) were previously investigated. Chitosan (CS) is a linear polysaccharide of randomly distributed *N*-acetyl glucosamine and glucosamine units, which is currently used in a number of commercial applications including wound dressings and drug delivery systems (Baldrick, 2010; Dash, Chiellini, Ottenbrite, & Chiellini, 2011; Mati-Baouche et al., 2014). CS present many advantages including mucoadhesive and antibacterial properties, biocompatibility, and biodegradability (Anitha et al., 2014; Kumar, Muzzarelli, Muzzarelli, Sashiwa, & Domb, 2004). Moreover, the “tunable” aspect of CS enables it to be processed into a variety of forms such as spongy-like scaffolds and films, under mild aqueous conditions, with no external crosslinking agent. CS scaffolds prepared under such conditions, however, exhibit low mechanical resistance and rapid decomposition, especially in acidic conditions or in the presence of lysozyme. Chemical crosslinking of chitosan or blending the CS network with others polymers were exploited to overcome these drawbacks (Bhattarai, Gunn, & Zhang, 2010). Glutaraldehyde and genipin have been extensively used to covalently crosslink chitosan, but the high reactivity and potential toxicity of these crosslinking agents is a limitation for biomedical uses (Leung, 2001; Sung, Huang, Huang, & Tsai, 1999). Regarding the strategy based on blending chitosan with polymers, many studies focused on the addition of poly(ethylene glycol) (PEG) to the physical CS network. Some studies reported the synergy of biological properties obtained from the blended materials, mostly devoted to wound healing dressings (Anjum, Arora, Alam, & Gupta, 2016; S.-H. Chen et al., 2013). Others evaluated the biocompatibility and the mechanical properties of CS/PEG film materials (Jin, Song, & Hourston, 2004; Zivanovic, Li, Davidson, & Kit, 2007). The latter studies demonstrated an increase in flexibility and elongation at break for CS/PEG films in comparison to pure CS materials but also a lack of stability due to PEG dissolution in aqueous media. Therefore, crosslinking of material seems to be an efficient solution to overcome this problem.

In this study, we developed a novel class of CS sponges consisting of an interpenetrating network (semi-IPN) of chitosan and PEG to control material properties such as stability in physiological conditions, porosity, mechanical and swelling properties. Our strategy for designing these sponges was based on the

combination of CS with two PEG derivatives modified with alkyne and thiol groups (PEG-YNE and PEG-SH, respectively), allowing the formation of a crosslinked PEG network via a “thiol-yne click reaction” inside the physical CS network under physiological conditions (Lowe, 2014). A careful analysis of the physico-chemical properties of these sponges in comparison to CS/PEG sponges obtained by blending native PEG with CS, suggests a high potential of these novel materials as surface-mediated drug delivery platforms.

2. Materials and methods

2.1. Materials

The sample of chitosan (CS, degree of acetylation (DA) = 0.14, M_v = 62000 g/mol) was purchased from Sigma-Aldrich-Fluka. The degree of acetylation of CS was determined by ^1H NMR. Poly(ethylene glycol) (PEG, M_n = 10000 g/mol) was purchased from Sigma-Aldrich-Fluka. Poly(ethyleneglycol)-bis(thiol) (PEG-SH, M_n = 3400 g/mol) was purchased from Creative PEGWorks (USA). 4-arm-poly(ethylene glycol) amine (PEG-NH₂, M_n = 10000 g/mol) was purchased from JenKem Technology (USA). Propiolic acid, diisopropylcarbodiimide (DIC), 1-hydroxybenzotriazole (HOBt), phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4) and other chemical products were purchased from Sigma-Aldrich-Fluka.

2.2. Synthesis of tetra-PEG with alkyne functional groups (PEG-YNE)

Tetra-PEG-alkyne (PEG-YNE) (M_n = 10200 g/mol) was prepared by an amine-acid coupling reaction between tetra-PEG-amine (PEG-NH₂) and propiolic acid in the presence of DIC/HOBt. PEG-NH₂ (500 mg) was first dissolved in anhydrous dimethylformamide (DMF) (80 mL) at room temperature. Then propiolic acid (84 mg) and HOBt (108 mg) were added. After 24 h of reaction at room temperature and under nitrogen atmosphere, DMF was evaporated and the mixture was solubilized in 10 mL of water. Precipitated DIC was removed by centrifugation. The mixture was then dialyzed for 48 h using a 3.5 kDa MWCO membrane and lyophilized to obtain a white powder of PEG-YNE (408 mg).

2.3. Gelation kinetics of PEG-SH/PEG-YNE via thiol-yne reaction

Different thiol group to alkyne group ratios ([SH]/[YNE]) ratios and 4-arm PEG-YNE (PEG-YNE) concentrations were used to study the kinetics of gelation via the thiol-yne reaction. The different formulations tested are detailed in Supporting Information (Table S1). The two PEG were first solubilized separately. PEG-YNE was dissolved in 200 μL of degassed PBS and PEG-bis(thiol) (PEG-SH) were dissolved in 150 μL of degassed PBS. The two solutions were mixed together using a vortex mixer for 5 s. The gelation kinetics of the mixtures was then followed by oscillatory shear rheometry using an AR2000 rheometer (TA Instruments, Inc) equipped with a cone-plate geometry. The upper cone geometry had a striated aluminum surface and a diameter of 20 mm. On each PEG hydrogel, oscillatory time sweep and frequency

sweep experiments were performed. All the dynamic rheological data were performed in the linear viscoelastic region. In the oscillatory time sweep experiments, the storage modulus (G') and the loss modulus (G'') were measured for a period of 20 h at a fixed frequency of 1 Hz and a fixed deformation of 12.5 %. The starting point of the gelation was determined by the crossover point between the G' and G'' which indicated the transition from a liquid state to a solid state. This point was sometimes referred to as the gelation time. Complete gelation was observed when the modulus G' reached a plateau. The steady-state values of G' (G'_{eq}) were used as representative values of the hydrogel elasticity (Kavanagh & Ross-Murphy, 1998).

2.4. Preparation of un-crosslinked CS/PEG blend sponges

Aqueous CS solution (1% w/v) was prepared by adding CS powder to acetic acid solution at 1% (v/v), under vigorous mixing, for 1 night. Various amounts of PEG (PEG-OH or tetra-PEG-NH₂, $M_n = 10000$ g/mol) were added to the CS solution during the stirring process, after total chitosan dissolution (Table S2 and Table S3). Once all the components were totally dissolved, 0.3 mL of the solution was transferred into each well of 96 wells plates. The plates were frozen at -20°C for 6 h and then freeze-dried at 0.1 mbar for 9h30. Cylindrical CS/PEG sponges were neutralized by adding 0.1 mL of ammonium hydroxide (2% v/v) in each well in order to remove remaining acetic acid. Ammonium hydroxide was selected to limit sponge shrinkage (Chatelet, Damour, & Domard, 2001). Then, sponges were washed several times with PBS until neutral pH. Sponges were then freeze-dried a second time in the same conditions. Scheme of the procedure used to prepare CS/PEG sponges is presented in **Fig. 2**. CS/PEG blended sponges are noted as “un-crosslinked CS(1%)PEG(X%)”, with X corresponding to the concentration of PEG in weight per volume (w/v) in the initial formulation.

2.5. Preparation of crosslinked CS/PEG sponges

The same experimental process as that described above for un-crosslinked sponges was used to prepare crosslinked CS/PEG sponges via thiol-yne reaction (Fig. 2). PEG was replaced by modified PEG-YNE and PEG-SH in a ratio [thiol]/[alkyne] ([SH]/[YNE]) equal to 1.3, to allow optimal thiol-yne crosslinking reaction between the PEG chains (Table S4). We noted the crosslinked sponges as “crosslinked CS(1%)PEG-YNE/SH(X%)”, with X corresponding to the concentration of functionalized PEG (PEG-YNE + PEG-SH) in weight per volume (w/v) in the initial formulation.

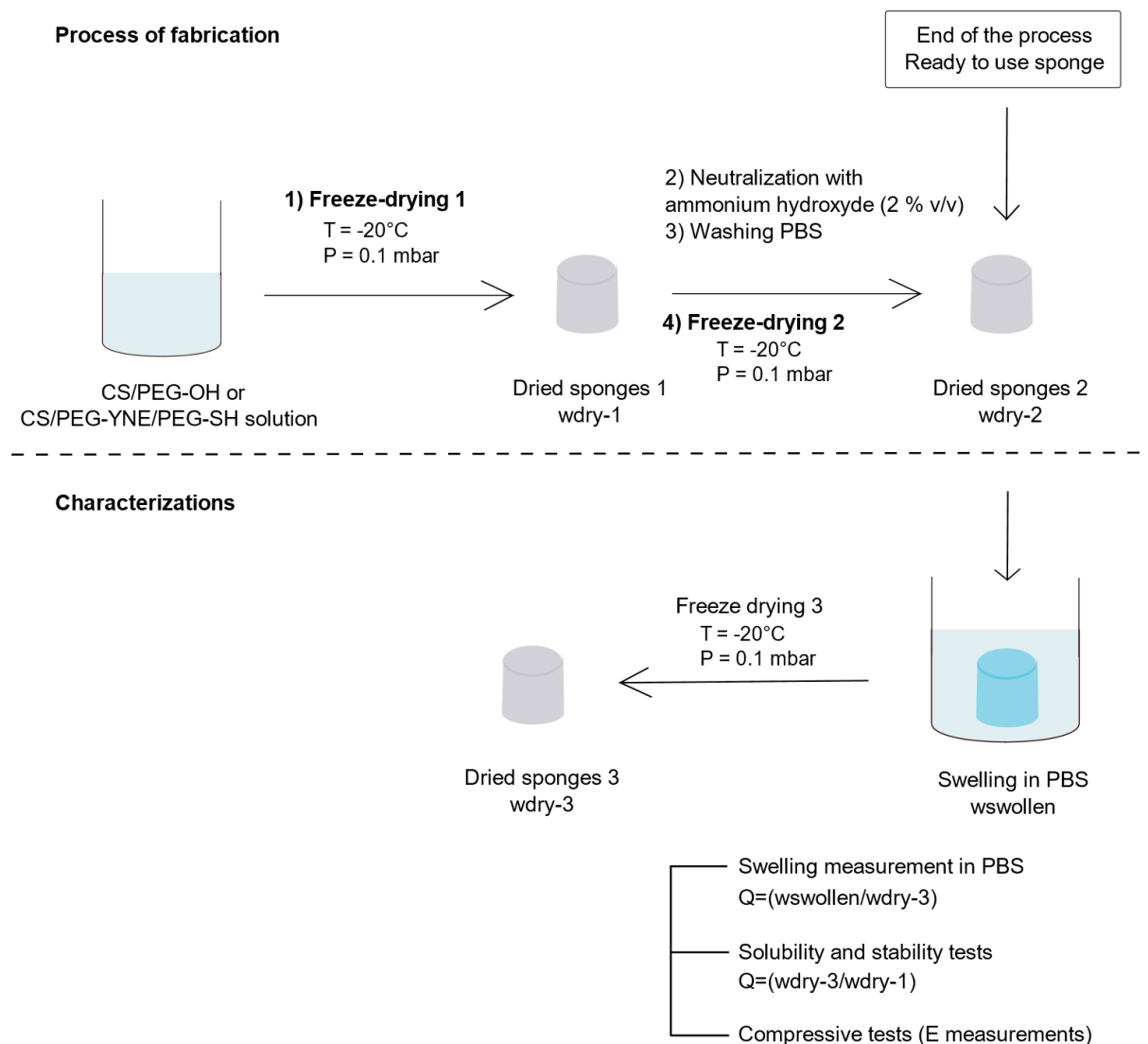


Fig. 2. Scheme depicting the fabrication of un-crosslinked and crosslinked CS/PEG sponges and their characterizations.

2.6. Spectroscopic analyses

¹H NMR analysis. Proton nuclear magnetic resonance (¹H NMR) spectra were recorded using a Bruker AVANCE III HD spectrometer operating at 400 MHz by applying a 45° tip angle for the excitation pulse and a 10 s recycle delay for accurate integration of the proton signals. Samples of 5 mg of PEG-NH₂ and PEG-YNE were prepared and dissolved in 1 mL of deuterium oxide (SDS, Vitry, France), for analysis.

FTIR analysis. FTIR spectra of the samples were measured using a Perkin Elmer FTIR-ATR spectrometer, resolution 8 cm⁻¹, in the range of 400-4000cm⁻¹. Dried samples were directly deposited on the FTIR metal plate.

2.7. Solubility and stability of sponges in physiological medium

The crosslinked and un-crosslinked chitosan sponges were weighted after the first freeze-drying process (w_{dry-1}). After the neutralization of sponges, and 2nd freeze-drying, the dried sponges were immersed in PBS for 24 h. During this swelling step, PEG chains which were not entangled in the CS network could be released. Sponges were then taken out and freeze-dried for the 3rd time, to determine S , the ratio of the weight of the dried material remaining in the sponges after 24 h of immersion in PBS (w_{dry-3}) to w_{dry-1} (Fig. 2). S can be expressed by the following equation:

$$S = \frac{w_{dry-3}}{w_{dry-1}}$$

Each experiment was repeated four times, and the average values were reported.

2.8. Swelling study

The swelling characteristics of the crosslinked and un-crosslinked CS/PEG sponges were determined by immersion of the sponges in PBS for 24 h, after the second freeze-drying step following the neutralization step (Fig. 2). It was confirmed that after 24 h, the sponges had reached their equilibrium swollen state. The sponges were withdrawn from PBS and their wet weight ($w_{swollen}$) were determined after removing excess of water with a filter paper. The sponges were then freeze-dried a third time to evaluate their dry weight (w_{dry-3}). The water uptake by the sponge was quantified by the swelling ratio Q , expressed by the following equation:

$$Q = \frac{w_{swollen}}{w_{dry-3}}$$

Each swelling experiment was repeated 4 times, and the average values were reported.

2.9. Mechanical measurements

Uniaxial compression measurements were carried out on sponges in the swollen state using an universal testing machine (EZ-X 5N, Shimadzu, Kyoto, Japan). The sponges obtained after the second freeze-drying step (4 mm diameter and 5 mm height cylinders when dried) were allowed to swell in PBS for 24 h. Then, they were placed on the substrate, and the upper plate (20 mm diameter) was moved down to be in contact with the sample until an initial normal force of 0.005 N was reached. Measurements were performed at a compression speed of 10 $\mu\text{m/s}$. The load and displacement data were collected during each experiment. A compressive stress-strain curve was generated from each sample, and the Young's modulus was calculated by a linear fit to the initial linear portion (up to 20% of strain) of the stress-strain curve.

Specimens were subjected to 50 % strain. Each compressive tests were repeated 4 times, and the average values of Young's modulus were reported.

2.10. Microscopy analysis

Confocal Laser Scanning Microscopy. Crosslinked and un-crosslinked sponges soaked in PBS for 24 h were observed with a Leica DMiRE2 confocal laser scanning system and an inverted fluorescence microscope. Rhodamine-labelled CS (CS-rhodamine) was visualized by excitation of the fluorochrome with a 543 nm excitation laser. A thin layer of the sponge (≈ 1 mm) was observed. CS-rhodamine was obtained according to a previously described experimental protocol (Ö. Tezgel).

Scanning electron microscopy (SEM) analysis. Internal structure of the sponges obtained after the second freeze-drying step was observed by a Scanning Electron Microscope (SEM) Quanta 200 (FEI), operating at 20kV with secondary electrons, in low vacuum mode. The average diameter of pores was determined from the SEM photographs by using ImageJ® 1.48 v software. The samples were previously cut and coated with platinum.

3. Results and discussion

In our study, CS was mixed with PEG to form a new class of porous CS/PEG scaffolds using an easy-to-implement freeze-drying method (Bencherif, Braschler, & Renaud, 2013). Two different families of chitosan sponges were created: “un-crosslinked CS/PEG sponges” (control, obtained by blending native CS with PEG) and “crosslinked CS/PEG sponges” (semi-IPNs, obtained by PEG crosslinking via thiol-yne chemistry).

The preparation process of the sponges and the characterizations performed on the materials are described in Fig. 2. The process comprised 2 freeze-drying steps. In the un-crosslinked sponges, PEG was not crosslinked, but physical interactions between the PEG and CS could occur. In the crosslinked sponges, the PEG network was chemically crosslinked via a nucleophilic thiol-yne coupling reaction between PEG-SH and PEG-YNE, into a CS solution. The schematic representation of the crosslinked sponge network is displayed in Fig. 3.

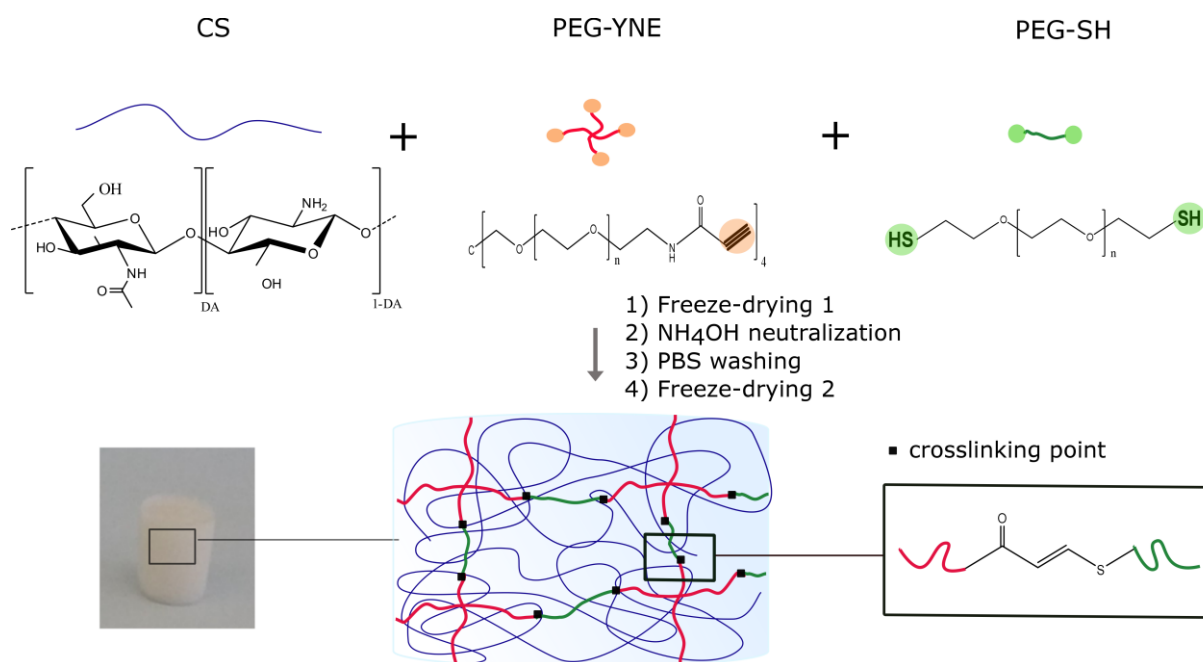


Fig. 3. Schematic representation of the crosslinked sponge network noted as crosslinked-CS(1%)PEG-YNE/SH(X%) with a $[\text{SH}]/[\text{YNE}]$ ratio equal to 1.3.

3.1. Study of the thiol/yne PEG cross-linking

As a first step in the design of cross-linked CS/PEG sponges, the kinetics of PEG hydrogel formation via a thiol-yne coupling reaction was analyzed by oscillatory shear rheometry. Unlike the most commonly applied radical thiol-ene reaction, the nucleophilic addition of thiols to electron-deficient alkynes can proceed efficiently under physiological conditions (PBS, pH 7.4) without requiring UV irradiation and potentially toxic photoinitiators (Vinh X. Truong, Ablett, Richardson, Hoyland, & Dove, 2015; V. X. Truong & Dove, 2013). In this study, PEG hydrogels were formed in PBS (pH 7.4) by reaction between a linear PEG-bis(thiol) (PEG-SH) and a 4-arm tetra-PEG-alkyne (PEG-YNE), prepared by an amine-acid coupling reaction (spectra in Supporting Information, Fig. S1 and S2). The crosslinking reaction was investigated in degassed PBS by varying either the PEG-YNE concentration between 4.0 and 11.5 % w/v at a fixed thiol to alkyne group ratio ($[\text{SH}]/[\text{YNE}] = 1.3$) or the $[\text{SH}]/[\text{YNE}]$ ratio in the range 0.7-1.5 at a fixed PEG-YNE concentration (11.5 % w/v). For the higher PEG-YNE concentration, gelation occurred after about 200 min, as revealed by the crossover point of the storage (G') and loss moduli (G'') versus time curves (Fig. S3). Notably, the G' value at the end of the crosslinking reaction (when G' reached a plateau) was 9.0 ± 1.3 kPa. Lower G' values and higher gelation time were observed with decreasing PEG-YNE concentration. The relatively slow gelation kinetics could be related to the long reaction time required for completion of the thiol-yne addition reaction. When the $[\text{SH}]/[\text{YNE}]$ ratio was varied at a fixed PEG-YNE concentration of 11.5 % w/v,

the best crosslinking conditions (highest G' value and shortest gelation time) were obtained for a $[SH]/[YNE]$ ratio of 1.3 (Fig. 4).

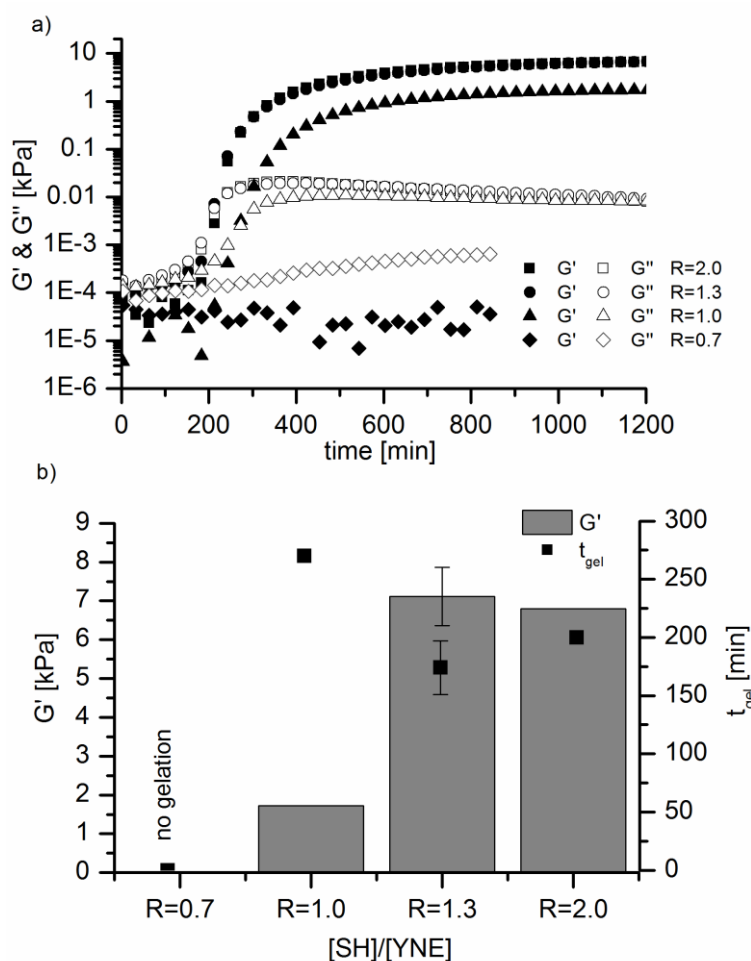


Fig. 4. (a) Rheological analysis of the gelation of a PEG-SH/PEG-YNE (11.5 % w/v) mixture as a function of $[SH]/[YNE]$ ratio in degassed PBS at 25°C. (b) Gelation time of PEG-YNE/ PEG-SH mixtures as function of $[SH]/[YNE]$ ratio, at a PEG-YNE concentration of 11.5 % w/v and G' value at the plateau.

For a ratio of 0.7, no gelation occurred and for a ratio of 1.0, a lower G' value (1.7 kPa) and higher gelation time (260 min) were measured. Because the maximum of G' was observed for a $[SH]/[YNE]$ ratio of 1.3, it is apparent that the crosslinking reaction did not proceed with 100 % efficiency. Nevertheless, as this maximum is close to a $[SH]/[YNE]$ ratio of 1, this indicates that PEG crosslinking was by far the most important reaction that occurs between the PEG derivatives. For a ratio > 1.3 , no improvement in the gelation time and G' value were observed, maybe because all the functional groups had reacted and excess of PEG caused steric hindrance, slowing the gelation kinetics. Therefore, a $[SH]/[YNE]$ ratio of 1.3 was chosen to prepare crosslinked CS/PEG sponges in the subsequent stages of the study. It was also checked that no gelation occurred for 20 h in acetic acid 1 % (v/v) at a concentration of PEG-YNE 11.5 % w/v and a

[SH]/[YNE] ratio of 1.3. A neutral pH is therefore required to perform the nucleophilic thiol-yne addition in a few hours.

The PEG-YNE/PEG-SH hydrogels, prepared in optimal conditions (PEG-YNE concentration of 11.5 % w/v and [SH]/[YNE] ratio of 1.3) and denoted as “crosslinked PEG-YNE/SH (21.5%)”, was freeze-dried and analyzed by FTIR. The formation of a crosslinked PEG network was supported by the disappearance of the $C\equiv C$ stretching band of PEG-YNE, located at 2112 cm^{-1} (Fig. S4).

3.2. Preparation of CS/PEG sponges

The sponges were prepared using the process of preparation shown in **Fig. 2**. Un-crosslinked CS/PEG sponges were obtained from CS/native PEG mixtures whereas crosslinked CS/PEG sponges were synthesized from mixtures containing CS, PEG-YNE and PEG-SH. Based on the rheological analysis, a [SH]/[YNE] ratio of 1.3 was used for the fabrication of crosslinked CS/PEG sponges.

3.2.1. Un-crosslinked CS/PEG sponges

Un-crosslinked sponges were prepared from mixtures in acetic acid of chitosan and native PEG by varying the concentration of PEG ($M_n = 10000\text{ g/mol}$), concentrations ranging from 0.3 to 6 % w/v, keeping the chitosan concentration constant (concentration of 1 % w/v). For this purpose, the two polymers were solubilized separately and mixed together. Then a first freeze-drying step was carried out (Fig. 2). The chitosan network was physically crosslinked after the second freeze-drying step by neutralization of its protonated $-NH_2$ groups with a solution of ammonium hydroxide (2 % v/v). Photographs of un-crosslinked CS/PEG sponges are displayed in Fig. 5. From a PEG concentration of 2 % w/v, sponges had a regular shape and an increase in PEG amount did not change the shape of the sponges.

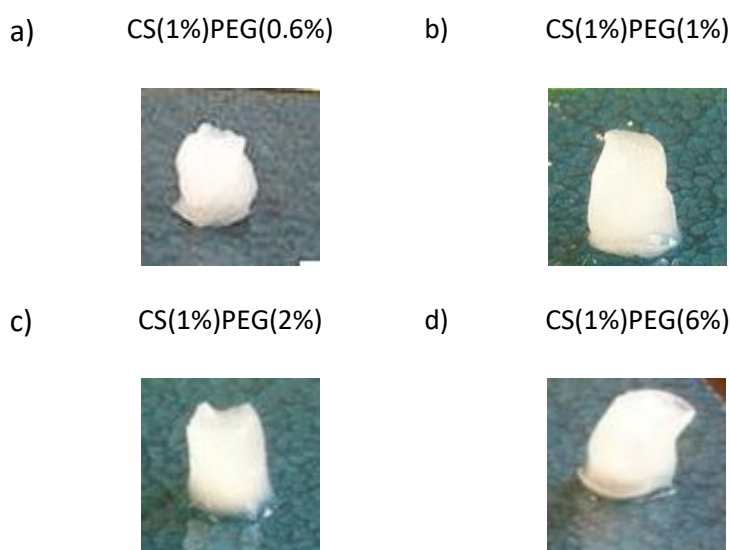


Fig. 5. Photographs of un-crosslinked sponges with various amount of PEG. PEG is referred to PEG-OH and polymer percentage are expressed in w/v.

3.2.2. Crosslinked CS/PEG sponges

The crosslinked sponges were synthesized using amounts of CS and PEG (mixture of PEG-SH and PEG-YNE) similar to those used for the fabrication of un-crosslinked sponges. The crosslinked PEG network inside the CS solution formed an interpenetrating (IPN) network. Photographs of crosslinked sponges are displayed in Fig. 6. PEG crosslinking provided sponges with a more defined shape and a more transparent appearance than the un-crosslinked materials, except for the crosslinked sponge with the highest amount of functionalized PEG (6 % w/v), which showed a transparent external area and an opaque core.



Fig. 6. Photographs of crosslinked CS/PEG sponges of which PEG was a mixture of PEG-YNE (tetra alkyne) and PEG-SH (bis thiol) ([SH]/[YNE] ratio of 1.3). Polymer percentage are expressed in w/v.

The kinetics of PEG crosslinking in the presence of CS was evaluated through compressive tests and measurement of the Young's modulus (E). The E values of swollen crosslinked sponges (functionalized PEG concentration of 2 % w/v and [SH]/[YNE] ratio of 1.3) were measured after the first freeze-drying step as well as after the second freeze-drying step at different soaking times in PBS (10 min, 24 h and 72 h). The results demonstrated that after the 2 freeze-drying steps and only 10 min of swelling in PBS, the crosslinked CS(1%)PEG-YNE/SH(2%) sponges nearly reached its maximum elastic modulus value ($E = 13.9 \pm 4.1$ kPa, versus 17.5 ± 4.5 kPa at $t=24$ h) (**Table 6**). The measurement of E before the second freeze-drying, after CS neutralization and 10 min of swelling is 2.3 ± 0.8 kPa. This value is close to the E modulus of the un-crosslinked CS(1%)PEG(2%) sponge used as a control ($E = 3.3 \pm 0.5$ kPa) (**Table 6**).

Table 6. Young's modulus measured from compressive tests of swollen uncrosslinked CS(1%)PEG(2%) after the second freeze-drying and crosslinked CS(1%)PEG-SH/YNE(2%) before and after the second freeze drying step followed by swelling for 10 min, 24h, and 72 h in PBS. PEG-YNE/SY was a mixture of PEG-YNE (tetra alkyne) and PEG-SH (bis(thiol)) in a [SH]/[YNE] ratio of 1.3.

		Swelling time	E [kPa]
un-crosslinked CS(1%)PEG(2%)	After freeze-drying 2	10 min	2.3 ± 0.8
crosslinked CS(1%)PEG-SH/YNE(2%)	Before freeze-drying 2	10 min	2.3 ± 0.8
	After freeze-drying 2	10 min	13.9 ± 4.1
		24 h	17.5 ± 3.7
		72 h	17.5 ± 4.5

3.3. Formulations of the sponges

The presence of PEG in the sponges was confirmed by FTIR. The FTIR spectra of pure CS sponge, PEG-OH, PEG-YNE, the un-crosslinked CS(1%)PEG(2%) sponges, and the crosslinked CS(1%)PEG-YNE/SY(2%) sponge, are shown in Fig. 7. The native CS sponge spectrum shows the characteristic absorption bands at 1636 cm^{-1} (Amide I, C=O stretching) and 1535 cm^{-1} (amide II, C-N bending) (Kolhe & Kannan, 2003; Shim & Nho, 2003) (Fig. 7(a)). The absorption bands between 1057 and 991 cm^{-1} (skeletal vibrations involving the C-O stretching) are characteristic of the polysaccharide structure (Kolhe & Kannan, 2003). The spectrum of pure PEG-OH shows a distinct absorption band at 1100 cm^{-1} , characteristic of C-O-C stretching band. Peaks at 1280 , 959 , 842 cm^{-1} are the contribution from the crystalline regions in PEG-OH (Kolhe & Kannan, 2003) (Fig. 7(b)). The spectrum of PEG-YNE is similar to that of PEG-OH, excepted for the absorption band at 2112 cm^{-1} attributed to the stretching band of $\text{C}\equiv\text{C}$ (Hensarling, Doughty, Chan, & Patton, 2009) (Fig. 7(c) and spectra in supporting information Fig. S2).

The crosslinked and un-crosslinked sponges exhibited the characteristic bands of CS and PEG (spectra d and e, Fig. 7). The recorded shifts of some of the CS peaks in slightly different regions compared with native CS sponge may be due to physical interactions (hydrogen bonds) between chitosan and PEG. In particular, a shift of the C-N bending at 1535 cm^{-1} for the CS sponge can be observed after the formation of crosslinked and un-crosslinked sponges (broader band at 1567 cm^{-1} for the CS/PEG sponges). FTIR spectroscopy was also used to verify the formation of a crosslinked PEG network in crosslinked CS/PEG sponges. The $\text{C}\equiv\text{C}$ stretching band of PEG-YNE, located at 2112 cm^{-1} , disappeared on the spectrum of crosslinked sponges (Fig. 7(e)), as observed in the spectrum of pure PEG-SH/PEG-YNE hydrogel (Fig. S4).

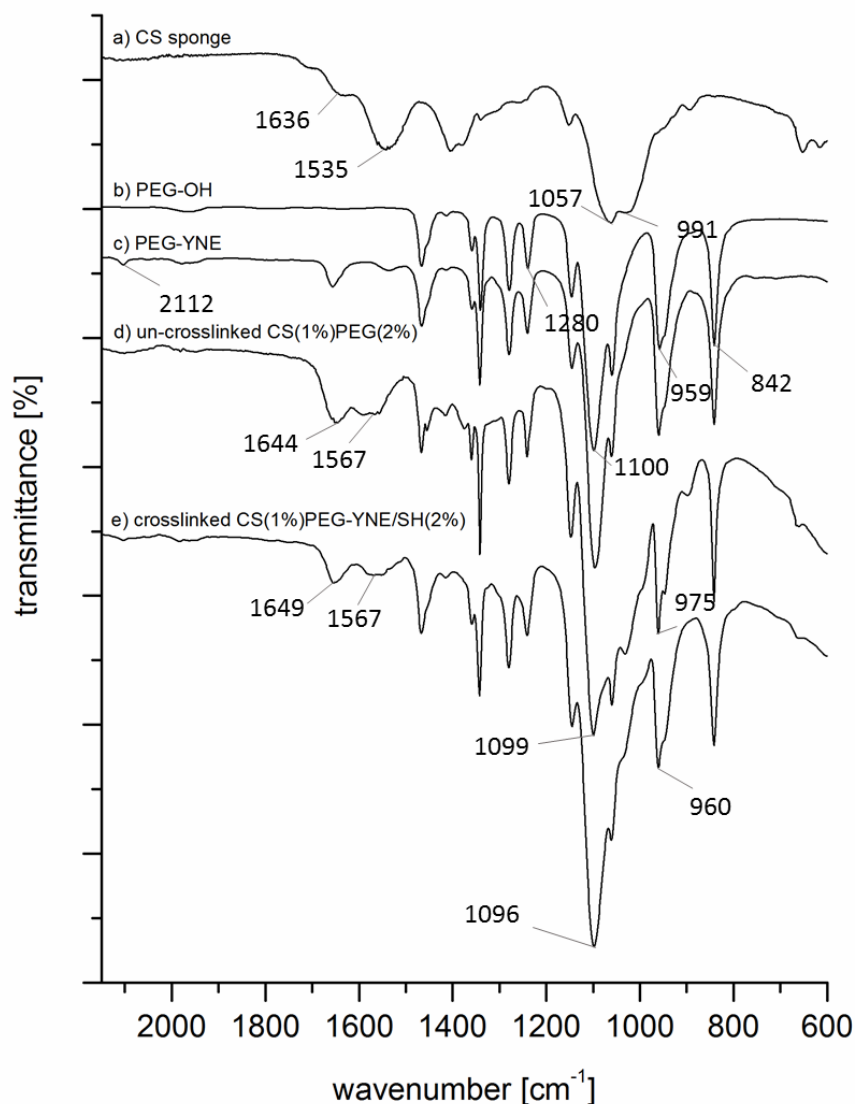


Fig. 7. FTIR spectra of CS sponge (a), PEG-OH (b), un-crosslinked CS(1%)PEG(2%) (c) and crosslinked CS(1%)PEG-YNE/SH (2%) (d).

3.4. Stability, mechanical testing and swelling of the prepared sponges

Having confirmed the presence of PEG in the sponges, we investigated the stability of the un-crosslinked and crosslinked materials after swelling in PBS at physiological pH. Unlike PEG, chitosan is insoluble in water at pH 7.4. The stability was evaluated from the ratio of the weight of the dried material remaining in the sponges after 24 h of immersion in PBS (w_{dry-3}) to the weight of the dried polymer material after the first freeze-drying process (w_{dry-1}). **Fig. 8** shows the mass fraction of non-dissolved material plotted against w/v % of PEG initially incorporated for the un-crosslinked and crosslinked sponges. From **Fig. 8**, it can be seen that as the percentage of PEG in the sponges increased, the stability of the un-crosslinked sponges decreased. When the results were expressed in weight for 10 mg of CS in the sponges, the weight

of PEG remaining in the material after PBS immersion appeared to be the same (10 mg) whatever the initial PEG concentration. Therefore, it can be concluded that the CS network was able to trap a maximum amount of un-crosslinked PEG of 1 mg/mg_{CS}.

PEG crosslinking increased the stability of sponges (**Fig. 8**). For the crosslinked materials, the w_{dry-3}/w_{dry-1} ratio exceeded 1. This could be accounted for by some water bound onto CS and PEG chains, and remaining after the swelling step of 24 h, followed by freeze-drying. This effect of crosslinking is of great importance to the targeted dressing application (biomedical applications) of such materials, as its stability should be maintained from the storage to the end of its service.

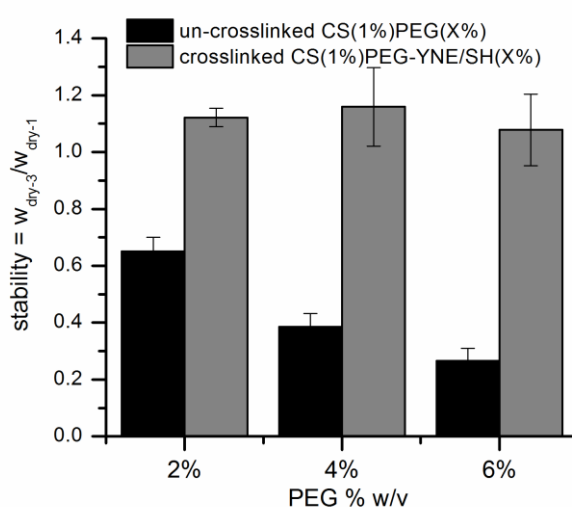


Fig. 8. Stability in PBS of un-crosslinked and crosslinked CS/PEG sponges versus PEG concentration. PEG corresponds to PEG-OH, and PEG-YNE/SH is a mixture of PEG-YNE (tetra alkyne) and PEG-SH (bis thiol) in a [SH]/[YNE] ratio of 1.3.

Uniaxial compression tests were performed on cylindrical CS/PEG swollen sponges to determine the influence of PEG concentration and crosslinking on the dressing mechanical properties. The Young's modulus (E) values obtained from the compressive stress-strain curves after 24 h of swelling in PBS were plotted against the initial % of PEG in the solution (from 0 to 6 w/v%), for both un-crosslinked CS(1%)PEG(X%) and CS(1%)PEG-NH₂(X%) sponges, as well as crosslinked CS(1%)PEG-YNE/SH(X%) materials (**Fig. 9**). The un-crosslinked CS(1%)PEG-NH₂(X%) containing a 4-arm PEG-NH₂ with a similar structure than PEG-YNE served as an effective control to demonstrate that the specific mechanical properties of CS(1%)/PEG-YNE/SH(X%) sponges were due to PEG crosslinking inside the CS scaffold.

The incorporation of PEG at different concentrations was shown to slightly reduce the E value of un-crosslinked CS/PEG sponges in comparison to PEG-free sponges, but it increased the reproducibility of the compressive tests allowing formation of regular cylindrical sponges (**Fig. 5**). This drop in E modulus had already been observed in alginate/PEG sponges (Hrynyk, Martins-Green, Barron, & Neufeld, 2012) and was

attributed to the plasticizing effect of PEG which increased material flexibility. The plasticizer would reduce CS polymer-polymer interactions allowing better mobility of polymer chains (Suyatma, Tighzert, Copinet, & Coma, 2005). Crosslinking gave rise to significant improvement in the E modulus of sponges (**Fig. 9**). The increase of the E modulus with increasing the amount of PEG-YNE/PEG-SH, was a direct consequence of the chemical crosslinking between thiol and alkyne functional groups, since CS(1%)PEG-NH₂(X%) materials displayed low E modulus ($E = 5.3 \pm 0.6$ kPa), even at high PEG-NH₂ content (6 % w/v). The comparison between the Young modulus values of crosslinked CS(1%)PEG-YNE/SH(X%) sponges indicated that a crosslinked PEG network would be formed from a PEG content of 1 % w/v. The modulus reached 17.5 ± 3.7 kPa for crosslinked CS(1%)PEG-YNE/SH(2%) sponges, 8.6 ± 1.9 kPa for crosslinked CS(1%)PEG-YNE/SH(1%) sponges, against 3.3 ± 0.5 kPa for un-crosslinked CS(1%)PEG(2%) sponges, and 3.5 ± 0.8 kPa for un-crosslinked CS(1%)PEG-NH₂(2%).

Based on these compressive tests, we selected formulations with PEG content of 2, 4, and 6 % w/v to prepare crosslinked and un-crosslinked sponges in the following swelling study.

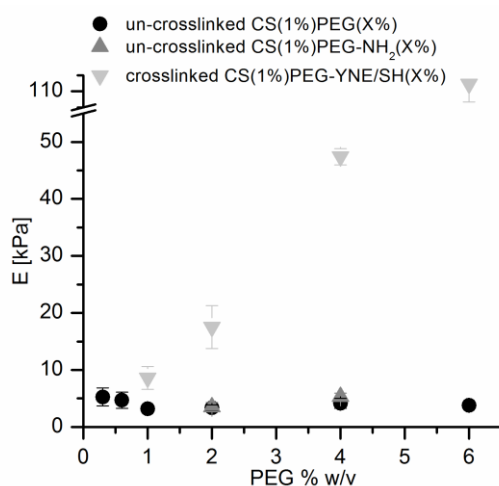


Fig. 9. Young modulus (E) of crosslinked and un-crosslinked CS/PEG sponges after 24 h of swelling in PBS, as a function of PEG concentration. PEG corresponds to PEG10k-OH, PEG-NH₂ is a tetra-PEG-NH₂, and PEG-YNE/SH is a mixture of PEG-YNE (tetra alkyne) and PEG-SH (bis thiol) in a [SH]/[YNE] ratio of 1.3.

Un-crosslinked and crosslinked CS/PEG sponges swelled rapidly in PBS and reached their swollen equilibrium state within 10 minutes after immersion (Fig. S5). **Fig. 10** displays the swelling ratio obtained 24 h after immersion for un-crosslinked and crosslinked CS/PEG sponges. Crosslinked sponges possessed higher swelling ability compared to un-crosslinked sponges. The swelling ratio of crosslinked sponges decreased with increasing the amount of PEG crosslinker. This trend was due to the network densification when PEG content increased, confirming the presence of a PEG crosslinked network. Concerning the un-crosslinked sponges, the low and non-dependence on PEG concentration of the swelling ratio was in agreement with measurements of % of PEG remaining in the material after immersion (**Fig. 8**). If the total

amount of PEG had been entrapped into the CS sponge, a higher swelling ratio would have been expected for the sponges with the higher PEG content (6 % w/v) due to the high PEG hydrophilicity. These results also confirmed the solubilization of a fixed amount of PEG trapped in the CS network for un-crosslinked materials.

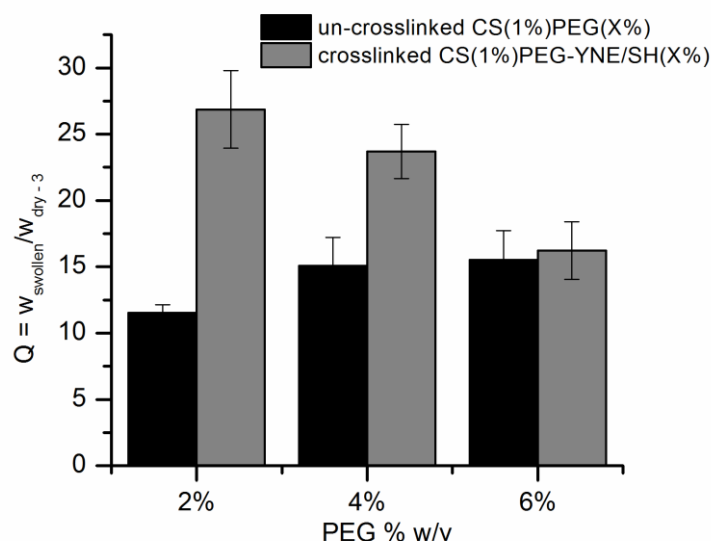


Fig. 10. Swelling ability in PBS of un-crosslinked and crosslinked CS/PEG sponges versus PEG concentration. PEG corresponds to PEG-OH, and PEG-YNE/SH is a mixture of PEG-YNE (tetra alkyne) and PEG-SH (bis thiol) in a [SH]/[YNE] ratio of 1.3.

3.5. Morphological characterizations of the un-crosslinked and crosslinked CS/PEG sponges

To investigate the sponge morphology and pore organization, the cross-sections of un-crosslinked-CS(1%)PEG(2%) and crosslinked-CS(1%)PEG-YNE/SH(2%) sponges were characterized by scanning electron microscopy (SEM) after the second freeze-drying process. The images, displayed in Figure 11(a) and (b), demonstrated microporous hydrogel structures with average pore sizes ranging from several micrometers to several tens of micrometers depending on materials. Whereas un-crosslinked CS(1%)PEG(2%) sponges had irregular and smaller pore size (Figure 11(a)), crosslinked sponges presented a structure with large interconnected pores (Figure 11(b)). The analysis of rhodamine-labelled CS distribution in crosslinked and un-crosslinked sponges by confocal microscopy (Figure 11(a') et (b')) fully supported images of the structure of the dried sponges obtained by SEM. These morphological observations were in good agreement with the swelling ratio measurements (**Fig. 10**) and the mechanical properties of sponges (Fig. 9). Indeed crosslinked sponges had higher water absorption ability attributed to the larger pore size in which water could be stored after material immersion. It has also already been reported that smaller pore size is associated with weaker compressive mechanical properties compared to sponges with larger pores

(Ikeda et al., 2014; Ma & Choi, 2001). Crosslinked CS(1%)PEG-YNE/SH sponges displayed higher modulus and pore size than un-crosslinked CS(1%)PEG(2%) sponges.

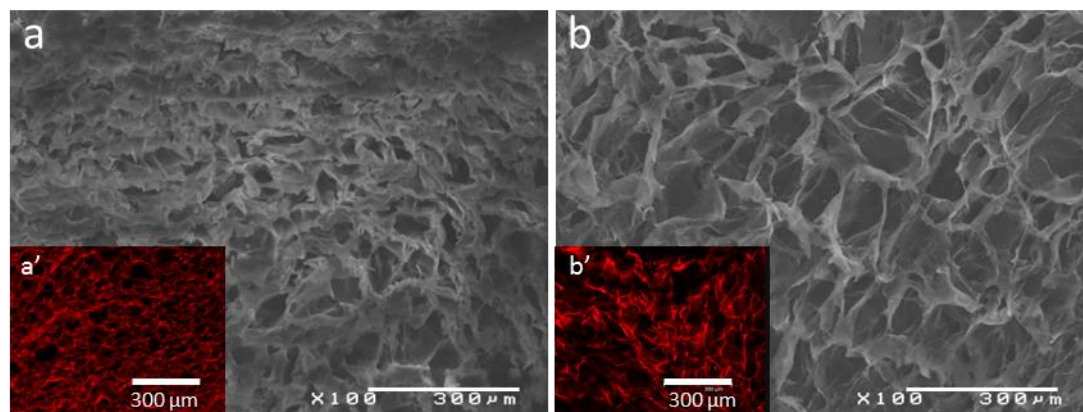


Figure 11 : Cross-sectional SEM images of (a) un-crosslinked CS(1%)PEG (2%), (b) crosslinked CS(1%)tPEG-YNE/SH(2%). PEG corresponds to PEG-OH, and PEG-YNE/SH is a mixture of PEG_{10.2k}-YNE (tetra alkyne) and PEG_{3.5k}-SH (bis thiol) in a [SH]/[YNE] ratio of 1.3.

4. Conclusion

In summary, novel crosslinked CS/PEG sponges with semi-IPN network were successfully prepared. The PEG network crosslinked via a nucleophilic thiol-yne addition was shown to improve the mechanical properties and stability of CS/PEG sponges at physiological pH. In addition, the images of the morphology of the crosslinked sponges revealed an interconnected pore network. The formation of a crosslinked PEG network were supported by FTIR analysis and by comparison of the mechanical properties of the crosslinked sponges with those of un-crosslinked sponges. The nucleophilic thiol-yne addition does not require the addition of any catalytic species, and the gelation time as well as gel properties of the simple PEG network can be tuned by varying the concentration of PEG-YNE and the ratio of functional groups [SH]/[YNE]. The long gelation time at physiological pH allowed PEG crosslinking after the first freeze-drying step and neutralization of CS. The mechanical characterization of the swollen sponges demonstrated that PEG crosslinking reaction was nearly completed at the end of the sponge process. This study indicates that this novel crosslinked-sponges with porous structure and high stability at physiological pH have potential uses in topical drug delivery.

Acknowledgements

We acknowledge the Commissariat à l’Energie Atomique et aux Energies Alternatives (CEA) for financial support. LETI/DTBS and CERMAV are part of the Arcane Labex program, funded by the French National Research Agency (ARCANE project n° ANR-12-LABX-003). The authors thank the NMR platform of ICMG

(FR2607) for its support. They also thank Thaysa Ksiaskiewicz Karam for providing CS-rhodamine and Claire Authesserre for CSLM images.

References

- Anitha, A., Sowmya, S., Kumar, P. T. S., Deepthi, S., Chennazhi, K. P., Ehrlich, H., Jayakumar, R. (2014). Chitin and chitosan in selected biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 39, 1644-1667.
- Anjum, S., Arora, A., Alam, M. S., & Gupta, B. (2016). Development of antimicrobial and scar preventive chitosan hydrogel wound dressings. *International Journal of Pharmaceutics*, 508, 92-101.
- Baldrick, P. (2010). The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 56, 290-299.
- Bencherif, S. A., Braschler, T. M., & Renaud, P. (2013). Advances in the design of macroporous polymer scaffolds for potential applications in dentistry. *J Periodontal Implant Sci*, 43, 251-261.
- Bhattarai, N., Gunn, J., & Zhang, M. (2010). Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62, 83-99.
- Brudno, Y., & Mooney, D. J. (2015). On-demand drug delivery from local depots. *Journal of Controlled Release*, 219, 8-17.
- Chatelet, C., Damour, O., & Domard, A. (2001). Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials*, 22, 261-268.
- Chen, S.-H., Tsao, C.-T., Chang, C.-H., Lai, Y.-T., Wu, M.-F., Chuang, C.-N., Hsieh, K.-H. (2013). Assessment of reinforced poly(ethylene glycol) chitosan hydrogels as dressings in a mouse skin wound defect model. *Materials Science and Engineering: C*, 33, 2584-2594.
- Chen, X.-c., Ren, K.-f., Lei, W.-x., Zhang, J.-h., Martins, M. C. L., Barbosa, M. A., & Ji, J. (2016). Self-Healing Spongy Coating for Drug "Cocktail" Delivery. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8, 4309-4313.
- Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R. M., & Chiellini, E. (2011). Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 36, 981-1014.
- Foda, N. H., El-laithy, H. M., & Tadros, M. I. (2004). Optimization of Biodegradable Sponges as Controlled Release Drug Matrices. I. Effect of Moisture Level on Chitosan Sponge Mechanical Properties. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 30, 369-379.
- Hensarling, R. M., Doughty, V. A., Chan, J. W., & Patton, D. L. (2009). "Clicking" Polymer Brushes with Thiol-yne Chemistry: Indoors and Out. *J. Am. Chem. Soc.*, 131, 14673-14675.
- Hrynyk, M., Martins-Green, M., Barron, A. E., & Neufeld, R. J. (2012). Alginate-PEG Sponge Architecture and Role in the Design of Insulin Release Dressings. *Biomacromolecules*, 13, 1478-1485.
- Ikeda, T., Ikeda, K., Yamamoto, K., Ishizaki, H., Yoshizawa, Y., Yanagiguchi, K., Hayashi, Y. (2014). Fabrication and Characteristics of Chitosan Sponge as a Tissue Engineering Scaffold. *BioMed Research International*, 2014, 8.
- Jin, J., Song, M., & Hourston, D. J. (2004). Novel Chitosan-Based Films Cross-Linked by Genipin with Improved Physical Properties. *Biomacromolecules*, 5, 162-168.
- Kavanagh, G. M., & Ross-Murphy, S. B. (1998). Rheological characterisation of polymer gels. *Progress in Polymer Science*, 23, 533-562.

- Kim, R. Y., Oh, J. H., Lee, B. S., Seo, Y.-K., Hwang, S. J., & Kim, I. S. (2014). The effect of dose on rhBMP-2 signaling, delivered via collagen sponge, on osteoclast activation and in vivo bone resorption. *Biomaterials*, 35, 1869-1881.
- Kolhe, P., & Kannan, R. M. (2003). Improvement in ductility of chitosan through blending and copolymerization with PEG: FTIR investigation of molecular interactions. *Biomacromolecules*, 4, 173-180.
- Kumar, M. N. V. R., Muzzarelli, R. A. A., Muzzarelli, C., Sashiwa, H., & Domb, A. J. (2004). Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives. *Chemical Reviews*, 104, 6017-6084.
- Lee, Y.-C., & Yalkowsky, S. H. (1999). Effect of formulation on the systemic absorption of insulin from enhancer-free ocular devices. *International Journal of Pharmaceutics*, 185, 199-204.
- Leung, H.-W. (2001). Ecotoxicology of Glutaraldehyde: Review of Environmental Fate and Effects Studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 49, 26-39.
- Lowe, A. B. (2014). Thiol-yne 'click'/coupling chemistry and recent applications in polymer and materials synthesis and modification. *Polymer*, 55, 5517-5549.
- Ma, P. X., & Choi, J. W. (2001). Biodegradable polymer scaffolds with well-defined interconnected spherical pore network. *Tissue Engineering*, 7, 23-33.
- Mati-Baouche, N., Elchinger, P.-H., de Baynast, H., Pierre, G., Delattre, C., & Michaud, P. (2014). Chitosan as an adhesive. *European Polymer Journal*, 60, 198-212.
- Ö. Tezgel, A. S.-J., R. Auzély-Velty, F. P Navarro, I. Texier. Chitosan-lipid nanoparticles (CS-LNPs): application to siRNA delivery. submitted.
- Parker, A. C., Rhodes, C., Jennings, J. A., Hittle, L., Shirtliff, M., Bumgardner, J. D., & Haggard, W. O. (2016). Preliminary evaluation of local drug delivery of amphotericin B and in vivo degradation of chitosan and polyethylene glycol blended sponges. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 104, 78-87.
- Ryan, C. K., & Sax, H. C. (1995). Evaluation of a carboxymethylcellulose sponge for prevention of postoperative adhesions. *The American Journal of Surgery*, 169, 154-160.
- Shim, J.-W., & Nho, Y.-C. (2003). Preparation of poly(acrylic acid)-chitosan hydrogels by gamma irradiation and in vitro drug release. *Journal of Applied Polymer Science*, 90, 3660-3667.
- Sung, H. W., Huang, R. N., Huang, L. L. H., & Tsai, C. C. (1999). In vitro evaluation of cytotoxicity of a naturally occurring cross-linking reagent for biological tissue fixation. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 10, 63-78.
- Suyatma, N. E., Tighzert, L., Copinet, A., & Coma, V. (2005). Effects of Hydrophilic Plasticizers on Mechanical, Thermal, and Surface Properties of Chitosan Films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3950-3957.
- Tadros, M. I., & Fahmy, R. H. (2014). Controlled-release triple anti-inflammatory therapy based on novel gastroretentive sponges: Characterization and magnetic resonance imaging in healthy volunteers. *International Journal of Pharmaceutics*, 472, 27-39.
- Truong, V. X., Ablett, M. P., Richardson, S. M., Hoyland, J. A., & Dove, A. P. (2015). Simultaneous Orthogonal Dual-Click Approach to Tough, in-Situ-Forming Hydrogels for Cell Encapsulation. *J. Am. Chem. Soc.*, 137, 1618-1622.
- Truong, V. X., & Dove, A. P. (2013). Organocatalytic, regioselective nucleophilic "click" addition of thiols to propiolic acid esters for polymer-polymer coupling. *Angewandte Chemie - International Edition*, 52, 4132-4136.
- Zivanovic, S., Li, J., Davidson, P. M., & Kit, K. (2007). Physical, Mechanical, and Antibacterial Properties of Chitosan/PEO Blend Films. *Biomacromolecules*, 8, 1505-1510.

Desig of interpenetration chitosan and poly(ethylene glycol) sponges for drug delivery applications Supporting Information

1-Synthesis of tetra-PEG-alcyne (PEG-YNE)

^1H NMR

Methyl groups of PEG-NH₂ were clearly observed in the range of 3.7 – 3.8 ppm. The proton close to the amino group appeared at 3.25 ppm. This proton signal shifts from 3.2 ppm to 3.5 ppm after grafting with propiolic acid (Fig. S1). This shift corresponds to total N-acylation of PEG-NH₂ into PEG-YNE.

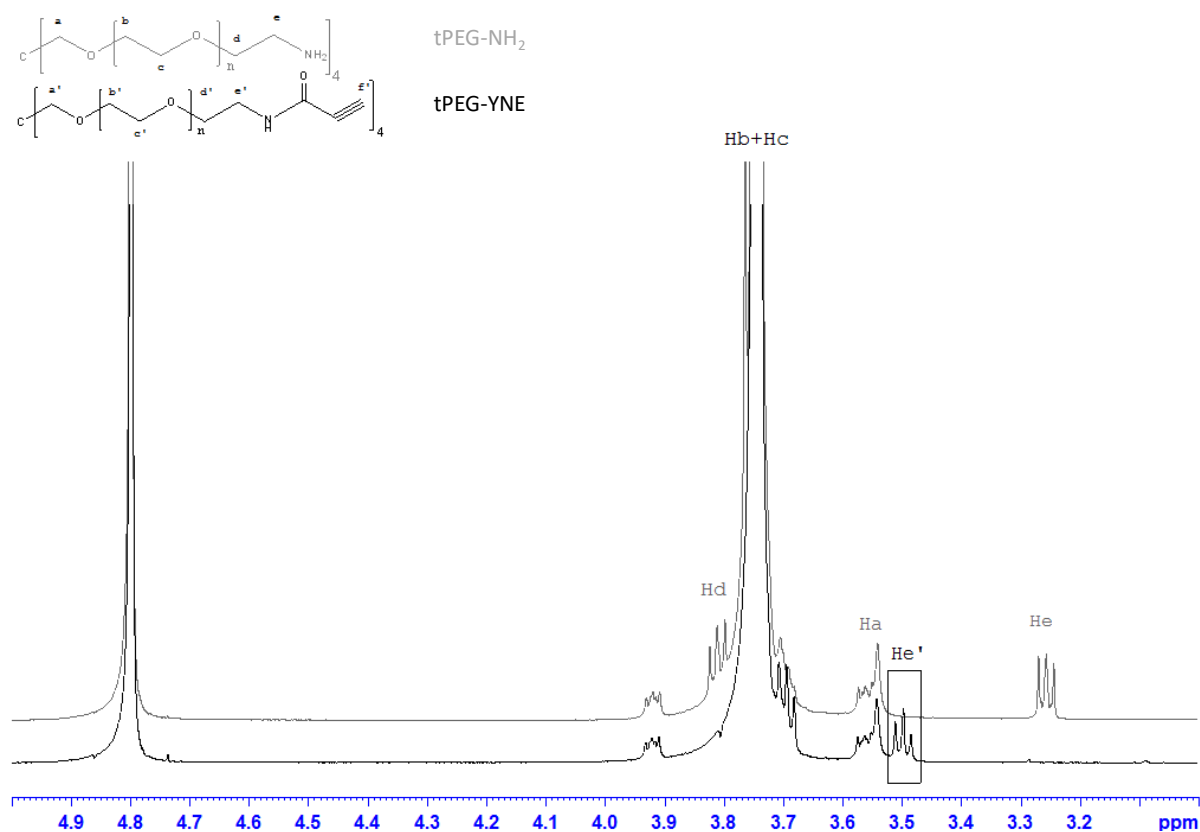


Fig. S12. ^1H NMR spectra of tPEG-NH₂ and tPEG-YNE

FTIR analysis

The comparative FTIR analysis of PEG-NH₂ (a) and PEG-YNE (b) attests the grafting of alkyne groups on initial PEG-NH₂ (Fig. S2). The absorption band at 1659 cm⁻¹ in the spectrum of PEG-YNE corresponds to the C=O stretching vibration (amide I) resulting from the reaction between the amine group of PEG-NH₂ and the carboxyl group of propiolic acid.

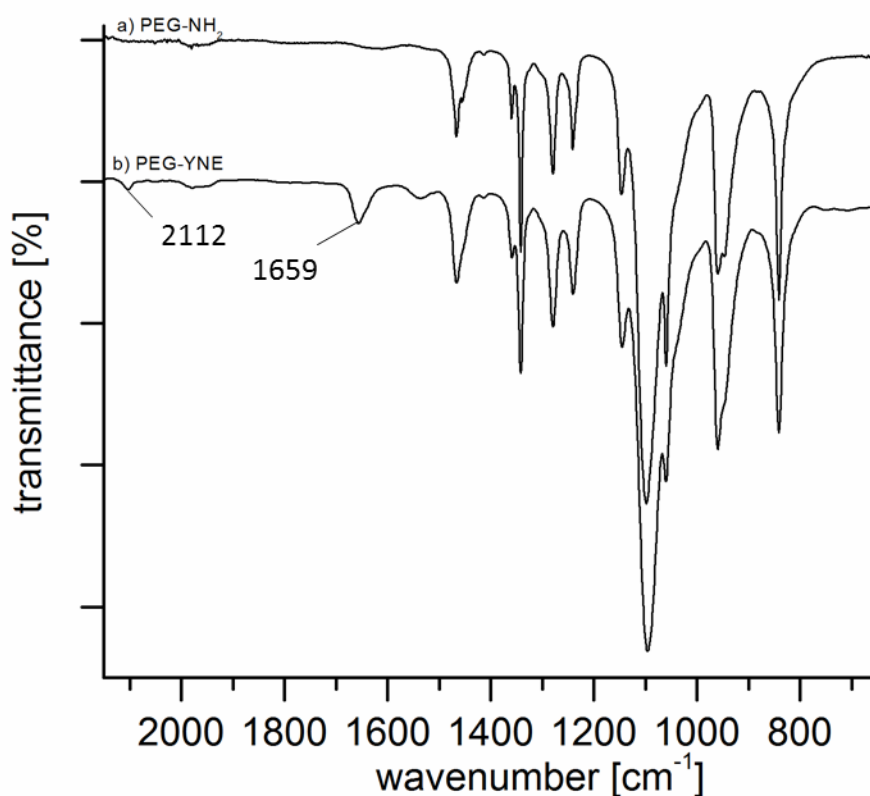


Fig. S13. FTIR spectra of a) PEG-NH₂ and b) PEG-YNE

2- Preparation and characterizations of PEG hydrogels crosslinked via thiol-yne reaction

2.1 PEG-SH/PEG-YNE hydrogel formulation

Table S7. Formulation of PEG hydrogels crosslinked via thiol-yne reaction. PEG-YNE was assimilated to tetraPEG-alkyne and PEG-SH to PEG-bis(thiol).

$C_{\text{PEG-YNE}}$ [mg/mL]	$C_{\text{PEG-SH}}$ [mg/mL]	[SH]/[YNE]	$W_{\text{PEG-total}}$ (% w/v)
115	100	1.3	21.5
57.5	50	1.3	10.7
40.25	35	1.3	7.5
115	153	2.0	26.8
115	54	0.7	16.9

2.2 Gelation kinetics

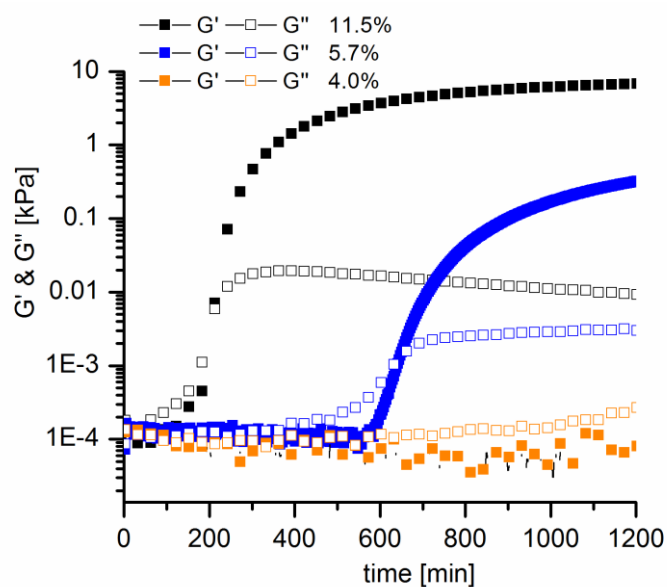


Fig. S14. Rheological analysis of the gelation of PEG-YNE and PEG-SH mixture as function of PEG-YNE concentration with a [SH]/[YNE] ratio equal to 1.3. at 25°C in degassed PBS.

2.3 FTIR analysis

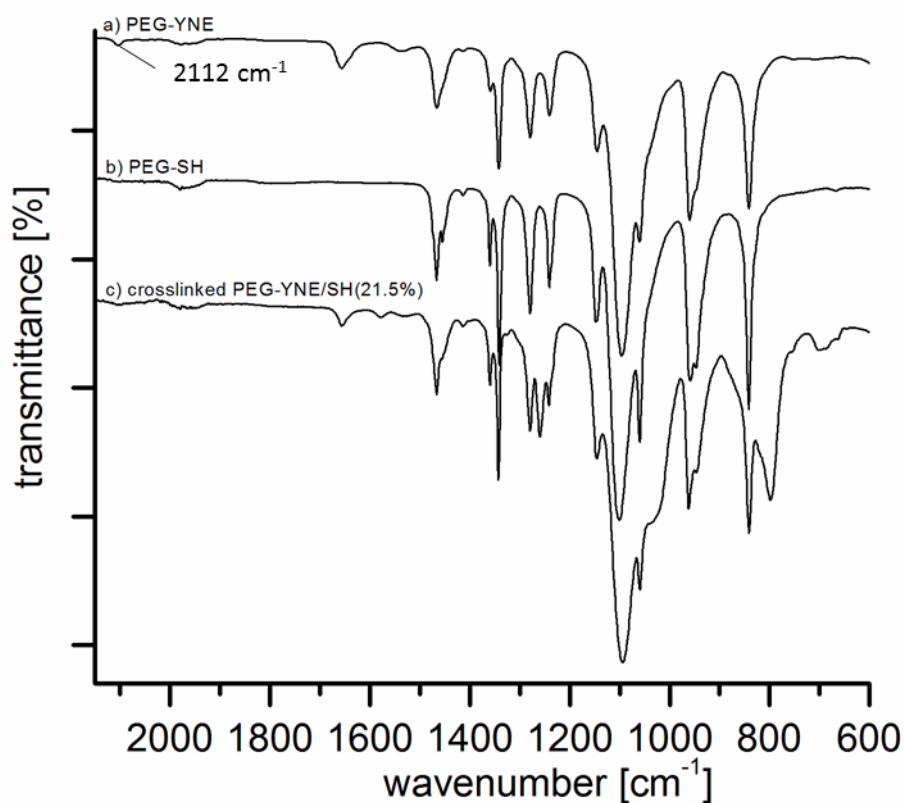


Fig. S15. FTIR spectra of a) PEG-YNE, b) PEG-SH and c) crosslinked PEG-YNE/SH(21.5%)

3. Formulation of sponges

3.1 Un-crosslinked sponges

Table S8. Formulation of un-crosslinked CS/PEG sponges. PEG was assimilated to PEG-OH.

Named	C _{CS} [mg/mL]	C _{PEG} [mg/mL]	W _{PEG-total} (% w/v)
un-crosslinked CS(1%)PEG(0.3%)	10	3	0.3
un-crosslinked CS(1%)PEG(0.6%)	10	6	0.6
un-crosslinked CS(1%)PEG(1%)	10	10	1
un-crosslinked CS(1%)PEG(2%)	10	20	2
un-crosslinked CS(1%)PEG(4%)	10	40	4
un-crosslinked CS(1%)PEG(6%)	10	60	6

Table S9. Formulation of un-crosslinked CS/PEG sponges. PEG-NH₂ was assimilated to tetraPEG-NH₂.

Named	C _{CS} [mg/mL]	C _{PEG-NH₂} [mg/mL]	W _{PEG-NH₂-total} (% w/v)
un-crosslinked CS(1%)PEG(2%)	10	20	2
un-crosslinked CS(1%)PEG(4%)	10	40	4

3.2 Crosslinked sponges

Table S10. Formulation of un-crosslinked CS/PEG sponges. PEG-YNE was assimilated to tetraPEG-alcyne and PEG-SH to PEG-bis-thiol..

Named	C _{CS} [mg/mL]	C _{PEG-YNE} [mg/mL]	C _{PEG-SH} [mg/mL]	[SH]/[YNE]	W _{CS-total} (% w/v)	W _{PEG-total} (% w/v)
crosslinked CS(1%)PEG-YNE/SH(1%)	10	5.4	4.6	1.3	1	1
crosslinked CS(1%)PEG-YNE/SH(2%)	10	10.7	9.3	1.3	1	2
crosslinked CS(1%)PEG-YNE/SH(4%)	10	21.4	18.6	1.3	1	4
crosslinked CS(1%)PEG-YNE/SH(6%)	10	32.1	27.9	1.3	1	6

3.3 Swelling behavior of chitosan sponges

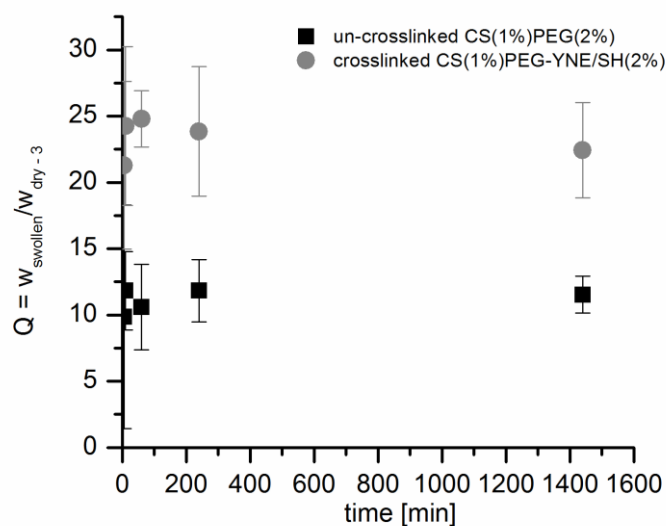


Fig. S16. swelling ability of un-crosslinked and crosslinked CS/PEG sponge after different time of immersion in PBS.

4.2.2 Résultats complémentaires sur les éponges

Certains résultats complémentaires sur la gélification de la solution de PEG-YNE/PEG-SH décrits succinctement dans l'article sont davantage détaillés dans la partie qui suit. Une analogie entre la chimie thiol-yne et thiol-ène est présentée à la fin de ces études rhéologiques. Le chapitre 5 décrit la partie expérimentale non décrite dans la publication ci-dessus.

Les LNPs ont été intégrées dans les éponges de CS/PEG réticulées et non réticulées et une étude préliminaire sur la stabilité de ces particules dans le matériau a été réalisée.

4.2.2.1 Etude rhéologique complémentaire des hydrogels de PEG (PEG-YNE/PEG-SH)

La chimie « thiol-yne », décrite dans le chapitre 1, et utilisée pour réticuler le réseau PEG des éponges CS/PEG, a été préalablement étudiée par rhéologie, afin de mieux comprendre les conditions de gélification.

Pour rappel, pour permettre cette réaction, un tétra-PEG contenant des groupements alcyne (PEG-YNE) a été synthétisé à partir d'un tétra-PEG-NH₂ (PEG-NH₂), par réaction de l'acide propiolique sur les -NH₂ du PEG en présence de DIC/HOBt, en milieu anhydre. Le PEG contenant des groupements thiol utilisé est un PEG bis thiol commercial (PEG-SH). Une représentation schématique du réseau de l'hydrogel de PEG formé par réticulation thiol-yne est présenté Figure 4-17.

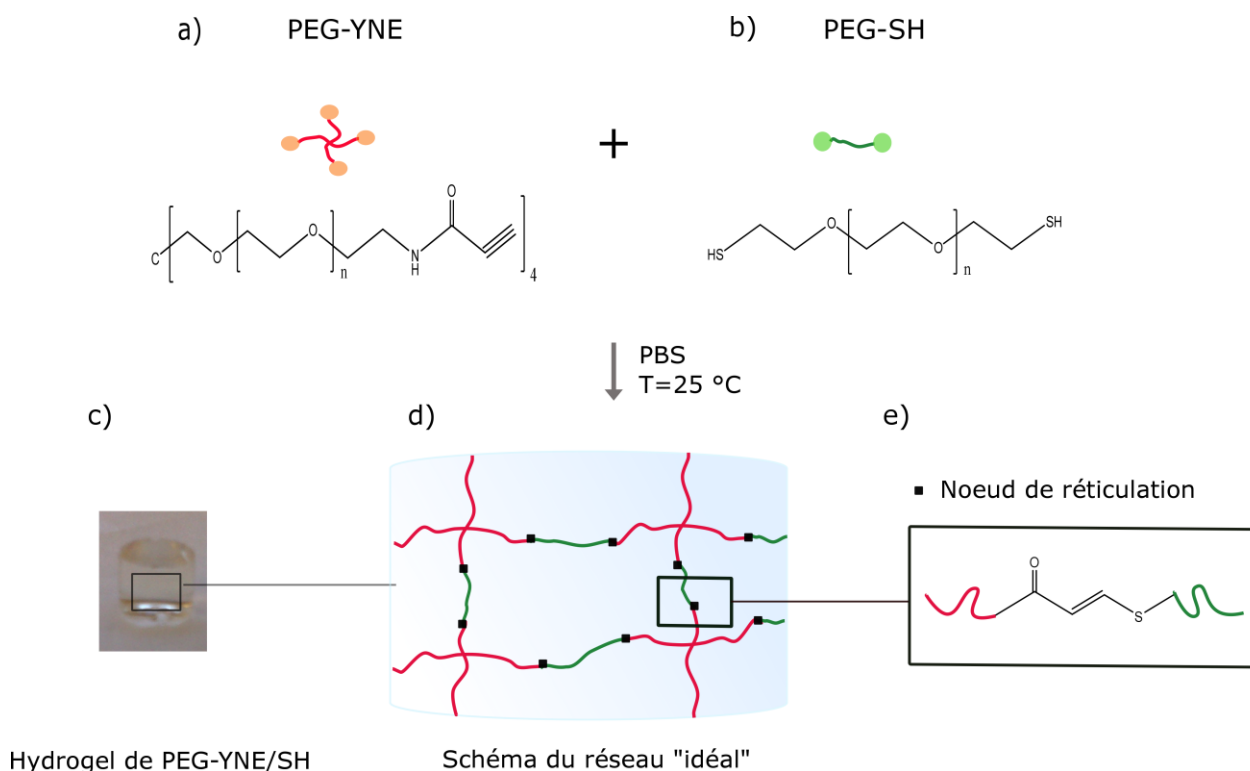


Figure 4-17: Représentation schématique de l'hydrogel de PEG formé par réaction thiol-yne dans le PBS, à partir d'un tétra-PEG-alcyne (PEG-YNE) (a), et d'un PEG-bis-thiol PEG-SH (b).

La cinétique de gélification de cet hydrogel de PEG a été étudiée par rhéologie selon différents paramètres :

- La concentration initiale en PEG-YNE (voir détails ci-dessous + publication)
- Le nombre d'équivalent [thiol]/[alcyne] ([SH]/[YNE]) (voir publication)
- Le solvant
- Les conditions de réaction radicalaire (UV + photo-amorceur)

Influence de la concentration en polymère

La relation entre le temps de gélification et la concentration en [PEG-YNE] pour un ratio fixé [SH]/[YNE] de 1,3 est présenté Figure 4-18. Les mesures ont été faites dans du PBS dégazé afin d'éviter l'oxydation des groupements thiols.

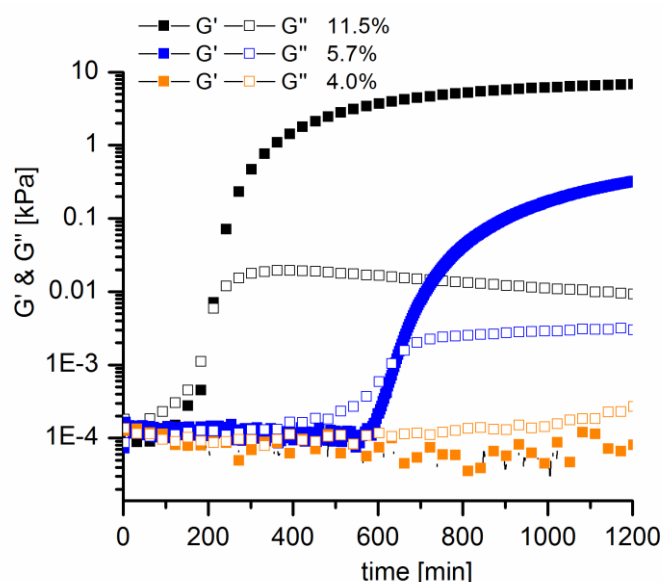


Figure 4-18: Influence de la concentration en PEG-YNE sur la cinétique de gélification de la solution de PEG-YNE/PEG-SH pour un ratio [SH]/[YNE] de 1.3 à 25°C dans le PBS dégazé.

Pour une concentration intermédiaire en [PEG-YNE] de 5,7 wt%, le temps de gélification est augmenté par rapport à celui obtenu lorsque la concentration en polymère est multipliée par 2 (11,5 wt%).

Pour la concentration étudiée de 5,7 wt%, on distingue 3 régimes différents concernant l'évolution du G' : régime I : ($t < 500$ min), G'' est supérieur au G' , le module G' augmente lentement suggérant de faibles interactions en le PEG-YNE et le PEG-SH. Régime II : le module G' augmente brusquement entre $t > 500$ min et $t < 900$ min.

Selon les critères de Winter-Chambon [4], la formation du gel débute à l'instant où

$$G' \approx G'' \approx \omega^n$$

où n est la constante de relaxation intrinsèque au système et ω la fréquence exprimée en rad.s^{-1} . Finalement, à $t > 900$ min, G' et G'' se stabilisent ce qui correspond à la fin de la gélification (Régime III).

Pour la concentration la plus élevée (11,5 wt%), seuls les régimes II et III sont visibles. Cette disparition du régime I à la concentration la plus élevée pourrait être due à la présence d'interactions physiques, liaisons hydrogènes ou enchevêtrement des chaînes de PEG, conduisant à une augmentation rapide du G' , dès les premières minutes de mesure. A cette concentration, le gel commence à se former au bout de 206 min (3h20) et le module G' atteint $9,0 \pm 1,3$ kPa après 1400 ± 23 min (23h) de mesure. Les mesures de G' en balayage de fréquences (frequency sweep test) permettent d'obtenir des informations concernant la stabilité du gel [5]. La Figure 4-19 qui présente cette mesure présente une totale indépendance de G' en fonction de la fréquence. Ce comportement est similaire à celui d'un solide. Ceci permet donc d'attester que le produit obtenu est vraiment un gel et pas simplement une solution très visqueuse.

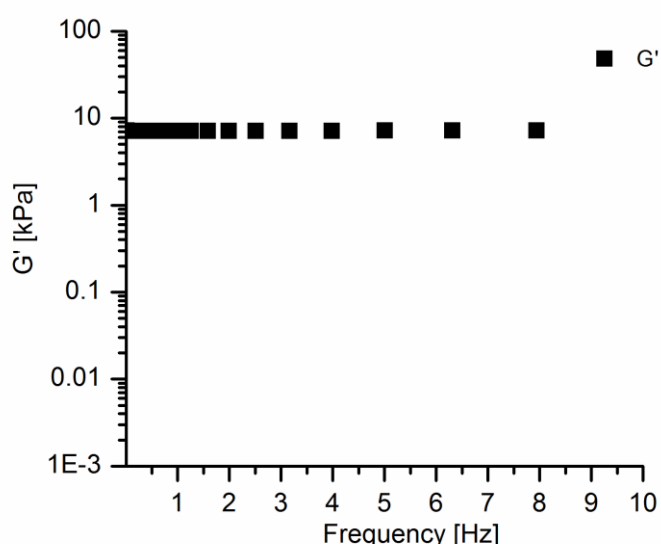


Figure 4-19: Evaluation du module G' en fonction de la fréquence (frequency sweep test)

Pour plus de visibilité, les valeurs de G' atteintes au régime III et les temps de gélification obtenus pour les 3 concentrations ont été reportées sur la Figure 4-20. On peut constater que plus la concentration est élevée plus le module G' est grand et le temps de gélification court. Car en effet, pour une concentration en polymère élevée, la probabilité qu'un groupement $-YNE$ rencontre un $-SH$ est plus grande et il y a ainsi plus de chances que ces 2 groupements réagissent entre eux et plus rapidement.

Néanmoins, lorsque la concentration en PEG-YNE est réduite de 5,7 wt% à 4,0 wt% on n'observe pas de gélification de la solution. Le G' ne dépasse pas le G'' même après 10h de mesure. Pour la suite, l'influence

du ratio $[SH]/[YNE]$ a été testé en conservant une concentration en PEG-YNE de 11,5 wt%. Ces résultats ont été détaillés dans la publication.

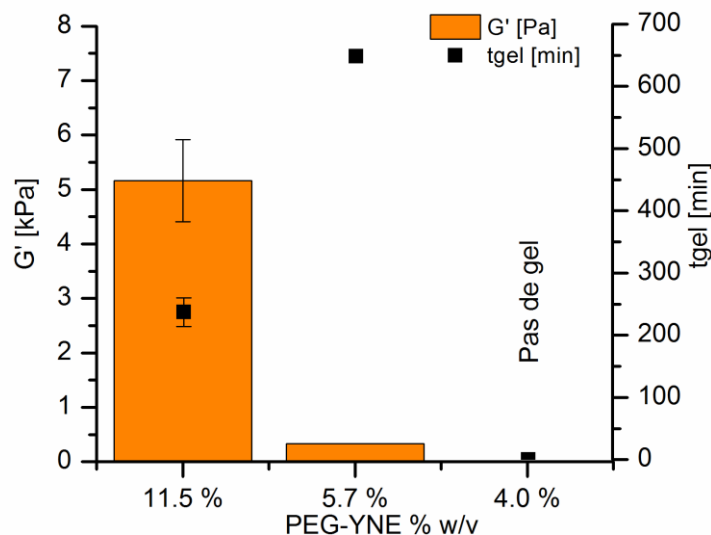


Figure 4-20: Influence de la concentration en PEG-YNE sur le module G' et le temps de gélification (t_{gel}) pour un ratio $[SH]/[YNE]$ de 1,3 à 25°C dans le PBS dégazé.

Influence du solvant

Afin d'anticiper la préparation des éponges de CS/PEG, pour lesquels les PEGs fonctionnalisés sont directement ajoutés à la solution acide de chitosane, l'efficacité de la chimie de réticulation « thiol-yne » a été testée dans l'acide acétique 1% (v/v) (pH 4.2) dégazé. L'analyse des courbes de rhéologie a montré que le PBS est le seul milieu testé permettant d'obtenir un gel. Ces tests ont été réalisés dans les conditions de rendement maximum trouvées ci-dessus ($[PEG-YNE] = 11,5$ wt% et ratio $[SH]/[YNE]$ de 1,3). Truong et al. avaient déjà démontré que la chimie thiol-yne pouvait se faire sans initiateur dans le PBS [3].

Influence des UVs

Dans ces travaux de thèse, nous avons utilisé 2 réactions différentes pour réticuler des chaînes de polymères et former des hydrogels : la chimie thiol-ène radicalaire utilisée pour réticuler la CMC-penténoate (chapitre 2) ou le CS-penténoate (chapitre 3) avec des PEG-bis-thiol et l'addition nucléophile thiol-yne utilisée dans ce chapitre pour réticuler des tétra-PEG-alcyne avec des PEG-bis-thiol). Ces 2 réactions peuvent se faire par réaction radicalaire ou par addition nucléophile selon les réactifs utilisés et les conditions de réaction.

Afin de comparer la réactivité de la chimie « thiol-yne » radicalaire à la chimie « thiol-ène » radicalaire, le comportement de la solution de PEG-YNE/PEG-SH pour un ratio $[SH]/[YNE]$ de 1,3 a été enregistré en

présence d'UVs avec et sans photoinitiateur (Irgacure 2959) directement in situ avec le rhéomètre. Les résultats sont présentés Figure 4-21.

Les UVs seuls ne permettent pas de former un gel en moins de 2 h Figure 4-21-a. Néanmoins sous UVs et en présence d'un photo-amorceur le temps de gélification est réduit de 200 min à 30 min. Cela reste supérieur au temps de gélification mesuré pour les gels de CMC/PEG ($t_{gel}=4$ min) (Figure 4-21-b). Il reste tout de même difficile de tirer une conclusion sur la réactivité de cette réaction thiol-yne radicalaire, car la nature des polymères, les concentrations ainsi que les ratios en groupements réactifs sont différents. (Ces enregistrements sous UVs ne peuvent pas se faire sur un temps trop long, car le gel se déshydrate rapidement. Contrairement aux gels étudiés sans irradiations UV, l'huile déposée sur le gel pendant la mesure pour éviter que le gel ne se déshydrate ne peut pas être ajoutée sur le plan en quartz sous irradiation).

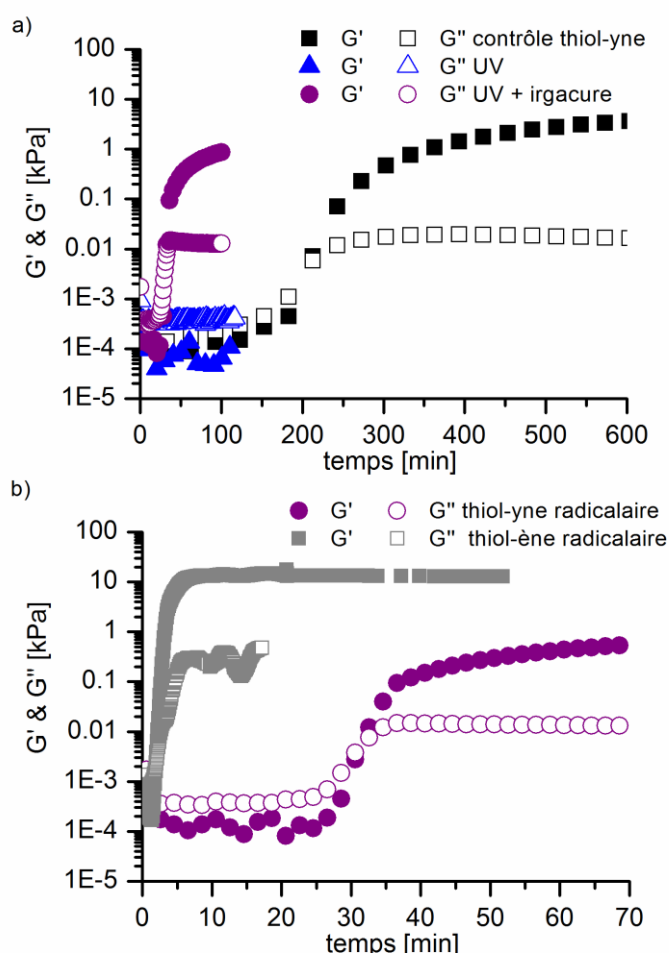


Figure 4-21 : a) Influence des UVs et du photoinitiateur sur la gélification de la solution PEG-YNE/PEG-SH (concentration en PEG-YNE de 11,5 % w/v et ratio [SH]/[YNE] de 1,3.). b) Comparaison de la chimie radicalaire thiol-ène (GEL0.3 (CMC-p/PEG)) à la thiol-yne radicalaire (PEG-SH/YNE).

Concernant l'addition nucléophile thiol-ène, avec les réactifs utilisés (PEG-bis thiol et CMC-pentenoate), nous n'avons pas observé de gélification de la solution sans la présence du photo-amorceur et des UVs, même plusieurs heures après avoir mélangé les 2 réactifs. L'addition nucléophile thiol-ène ne s'est pas produite avec ces réactifs et dans ces conditions de réaction (PBS (pH 7,4, T = 25 °C) tandis que la solution de PEG-SH/PEG-YNE gélifie en environ 200 min (3 h). Toutefois il n'est pas possible de conclure sur la réactivité comparée de ces 2 additions nucléophiles car les réactifs ne sont pas les mêmes. L'acide propiolique a volontairement été choisi pour être greffé au PEG pour sa triple liaison déficiente en électrons pour accélérer la réaction thiol-yne par addition nucléophile [6](ce qui n'avait pas été le cas pour la thiol-ène).

4.2.2.2 Inclusion des LNPs dans les éponges de CS/PEG

Après avoir caractérisé les éponges de CS/PEG, les LNPs de diamètre 120 nm ont été intégrées dans les matériaux dans le but de proposer un système composite capable de délivrer localement et de façon contrôlée un principe actif hydrophobe. Deux formulations d'éponges décrites dans la publication ont été retenues pour y intégrer les particules : éponges non-réticulées "un-crosslinked CS(1%)PEG(2%)" et éponges réticulées « crosslinked CS(1%)PEG-YNE/SH(2%) ». Les LNPs ont été ajoutées directement à la solution acide de CS/PEG (pH 4,2) à une concentration de 5 mg/mL, avant les étapes de lyophilisation, pour être sûr qu'elles soient bien piégées dans le réseau.

L'objectif de cette partie est d'évaluer la stabilité des LNPs dans ces matériaux à la fin du procédé de fabrication des éponges et d'étudier les nouvelles propriétés mécaniques de ces éponges composites réticulées ou non-réticulées.

Répartition des LNPs dans les éponges de CS/PEG réticulées ou non-réticulées

La répartition des LNPs dans les éponges de CS/PEG réticulées et non-réticulées a été étudiée par microscopie confocale, en utilisant des LNPs marquées avec un fluorophore (Dil). Les éponges en fin de procédé ont été mises à gonfler pendant 24 h dans du PBS, et une fine épaisseur (quelques micromètres) a été découpée pour être observée. La Figure 4-22 présente la répartition des LNPs fluorescentes dans les éponges non-réticulées (Figure 4-22-a) et réticulées (Figure 4-22-b). Ces images confirment la présence des LNPs dans les éponges à la fin du procédé de fabrication des éponges comportant différentes étapes critiques pour la conservation des particules. Ces particules sont réparties de façon homogène dans l'éponge réticulée (Figure 4-22-b), tandis que plus de disparités sont observées pour l'éponge non-réticulée (Figure 4-22-a). La même observation est faite quant à la répartition des LNPs sur l'axe z (100 µm d'épaisseur) (Figure 4-22 a' and b'). Cette répartition plus homogène et plus dense des LNPs dans les éponges réticulées peut être expliquée par les observations précédentes sur la structure des éponges. La

structure des éponges réticulées observée au MEB et au microscope confocale apparaissait plus aérée que celle des éponges non-réticulées avec des pores mieux définis et de tailles supérieures. Si l'on suppose que les LNPs sont présentes dans les pores des éponges cela expliquerait leur répartition plus homogène dans le matériau réticulé.

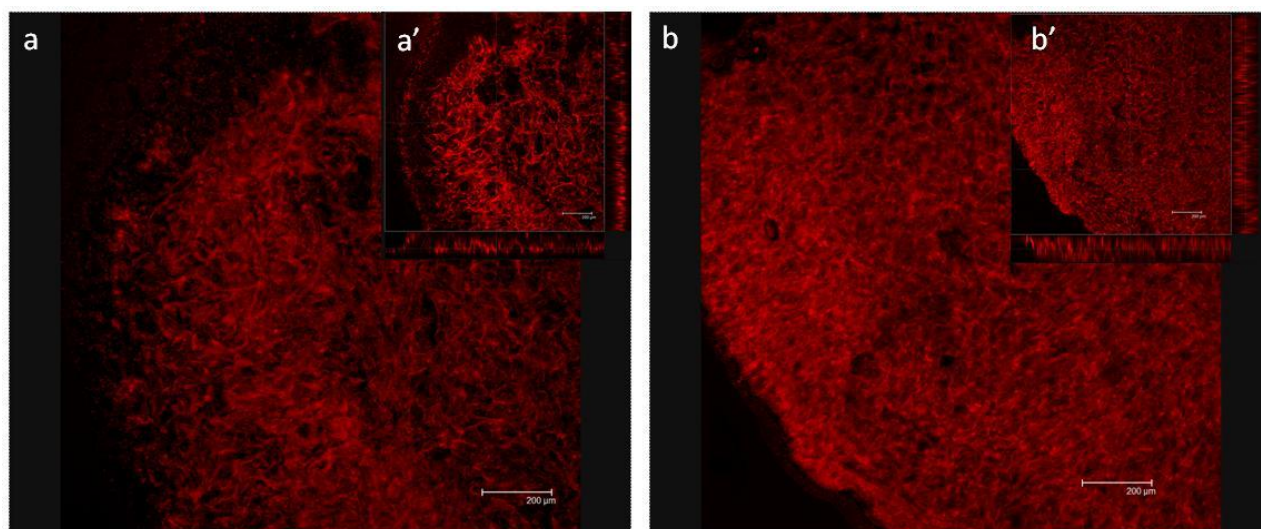


Figure 4-22: Images CSLM des éponges hydratées contenant des LNPs marquées avec un fluorophore (Dil) (a) “un-crosslinked CS(1%)PEG(2%)” et (b) “crosslinked CS(1%)PEG-YNE/SH(2%)”. Les images a' et b' représentent l'image de l'éponge au centre avec l'intensité de la fluorescence selon l'axe z sur les côtés de l'image. Cette observation permet de visualiser la répartition des LNPs selon l'axe z sur l'éponge de 100 µm d'épaisseur. Grossissement x20.

Stabilité des LNPs dans les éponges de CS/PEG

Le procédé de préparation des éponges est constitué de 2 étapes de lyophilisation ($T = -20\text{ }^{\circ}\text{C}$ et $P = 0,1\text{ mbar}$) et de conditions de traitements à des pH extrêmes (acides pH 4,2 (solubilisation du CS) et basiques pH 11,5 (neutralisation du CS)). Les LNPs étant intégrées au début du procédé de fabrication, elles subissent également toutes ces étapes de préparation critiques pour la conservation de leurs propriétés physico-chimiques. Il est donc important d'étudier leur stabilité après chacune de ces étapes.

Tout d'abord, il a été vérifié que les LNPs conservaient leurs propriétés (taille, polydispersité) dans les conditions de pH utilisées pour fabriquer les éponges. Pour cela, les LNPs (F120, $d = 120\text{ nm}$) ont été dispersées ($C_{\text{LNP}} = 4\text{ mg/mL}$) dans une solution d'acide acétique à 1 % v/v et dans une solution basique d'hydroxyde d'ammonium à 2 % v/v. Ces solutions diluées de LNPs ont été analysées par DLS pour comparer la taille et la polydispersité (Pdl) des nanoparticules avant et après traitement. Les résultats de l'analyse DLS présentés Figure 4-23 démontrent qu'il n'y pas de déstabilisation des particules dans ces conditions de pH extrêmes (pH 4,2 et pH 11,5), même après 4 jours de traitement (96 h).

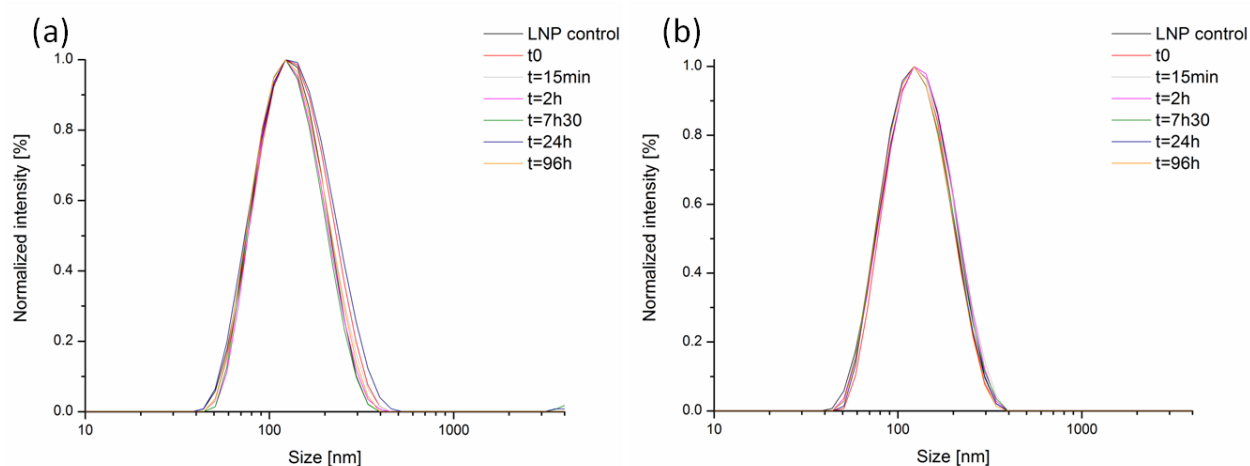
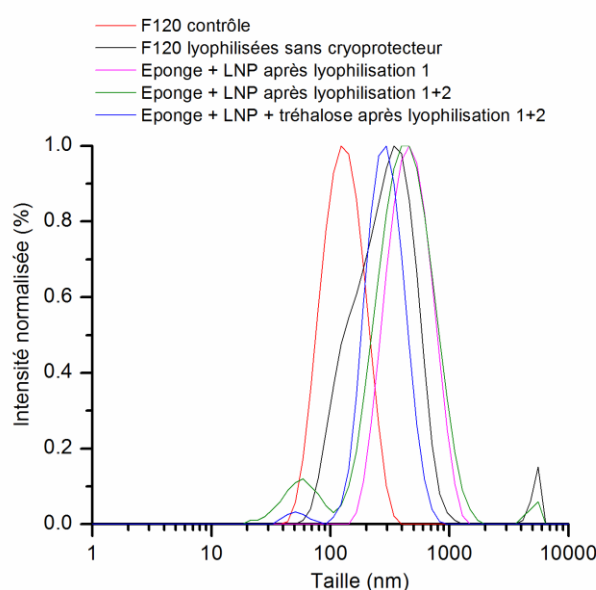


Figure 4-23: Stabilité des LNPs ($d=120$ nm) à une concentration de 4 mg/mL a) dans des conditions de pH acide (solution d'acide acétique à 1 % v/v pH = 4,2) et (b) des conditions de pH basique (hydroxyde d'ammonium à 2 % v/v pH = 11,5).

Après avoir démontré la stabilité des LNPs à ces différents pH, l'impact de la lyophilisation sur ces particules contenues dans les éponges a été étudiée. Nous avons fait l'hypothèse que la stabilité des LNPs dans les éponges après les différents traitements était indépendante du réseau de l'éponge (PEG réticulé ou pas). Par conséquent, nous avons étudié la stabilité des LNPs dans les éponges de CS/PEG non réticulées (un-crosslinked CS(1%)PEG(2%)), car les LNPs contenues dans ces éponges peuvent être facilement récupérées et analysées par DLS après dissolution totale du matériau en milieu acide. Les résultats de l'analyse DLS des LNPs récupérées dans les éponges après la 1ère ou la 2ème lyophilisation sont présentés

Figure 4-24.

a)



b)

	d [nm]	PdI
LNP contrôle	119 ± 5	0,11 ± 0,01
F120 lyophilisées sans cryoprotecteur	348	0,46
Eponge + LNP après lyophilisation 1	343 ± 68	0,43 ± 0,09
Eponge + LNP après lyophilisation 1+2	337 ± 17	0,35 ± 0,05
Eponge + LNP + cryoprotecteur après lyophilisation 1+2	250 ± 23	0,30 ± 0,01

Figure 4-24: Analyses DLS des LNPs récupérées après dissolution des éponges “un-crosslinked CS(1%)PEG(2%)” dans l’acide acétique 1 % v/v et filtration de la solution sur 0,45 µm. a) Courbes d’intensité ; (b) tableau répertoriant les données DLS : diamètre et polydispersité (PdI). (n=4).

La lyophilisation des LNPs dans le matériau affecte leur stabilité : augmentation du diamètre hydrodynamique et de l’indice de polydispersité (PdI) (

Figure 4-24). Ces augmentations de taille et de PdI observées dès la première lyophilisation des éponges, peuvent être dues à une couche de polymère (PEG ou/et CS) adsorbée à la surface des particules ou à la déstabilisation des particules lors de la lyophilisation des éponges. Notamment, lors de l’étape de congélation, des cristaux de glace se forment et exercent des contraintes importantes sur le matériau à lyophiliser qui pourraient conduire à la déstabilisation des particules, dont la stabilité colloïdale est notamment assurée par une coquille de surfactants PEG et phospholipides. Il est intéressant de noter que les LNPs récupérées dans les éponges à la fin du procédé de fabrication, qui ont donc été lyophilisées 2 fois dans le matériau, ont des propriétés similaires à celles récupérées dans les éponges lyophilisées une seule fois.

La lyophilisation des LNPs avait déjà été étudiée dans le cadre d'un autre projet, afin d'anticiper une future industrialisation de ces particules. Il avait été démontré que l'utilisation de cryoprotecteurs était nécessaire pour conserver les propriétés des LNPs lors de la lyophilisation. Le cryoprotecteur permet de limiter les contraintes générées lors de la formation de cristaux de glace en créant une phase vitreuse dans la solution à lyophiliser [7]. En comparaison avec les LNPs lyophilisées sans cryoprotecteur, la lyophilisation des LNPs dans le matériau limite leur déstabilisation. Le CS et le PEG constituant l'éponge limitent la déstabilisation des LNPs [8]. Néanmoins, pour conserver davantage les propriétés des particules lyophilisées dans le matériau, un cryoprotecteur, le tréhalose, déjà utilisé pour lyophiliser les LNPs, a été ajouté à la formulation des éponges avec un ratio tréhalose/LNPs de 4. Les analyses DLS montrent un effet positif du cryoprotecteur : diamètre et Pdl diminué (Pdl de 0,35 après 2 lyophilisations au lieu de 0,46). Le diamètre des LNPs lyophilisées dans les éponges reste cependant 2 fois supérieur au diamètre des LNPs non lyophilisées. Le Pdl reste acceptable compte tenu des chaînes de polymères qui pourraient être adsorbées à la surface des particules.

Bien que l'optimisation de la stabilité des LNPs soit importante, un autre paramètre à ne pas négliger sont les propriétés mécaniques des éponges. L'addition des LNPs et d'un cryoprotecteur pourrait dégrader les propriétés des matériaux CS/PEG.

Propriétés mécaniques des éponges composites de CS/PEG

Les propriétés mécaniques des éponges (réticulées ou non réticulées) en présence de LNPs avec ou sans cryoprotecteur, ont été comparées à celles des éponges de référence sans LNPs. La Figure 4-25 présente les modules d'Young des différentes éponges, obtenus à partir des courbes de compression contrainte vraie – déplacement. L'ajout des LNPs dans les éponges réticulées et non réticulées, à une concentration de 50 % w/w_{CS} ne modifie pas le module E des éponges compte tenu des barres d'erreur. A l'inverse, l'addition du tréhalose dans les éponges modifie considérablement leurs propriétés mécaniques. Le module E des éponges non-réticulées avec tréhalose est divisé par 2, et par 5 pour les éponges réticulées. Comme le glycérol, le tréhalose est un plastifiant qui limite les interactions polymères-polymères [7].

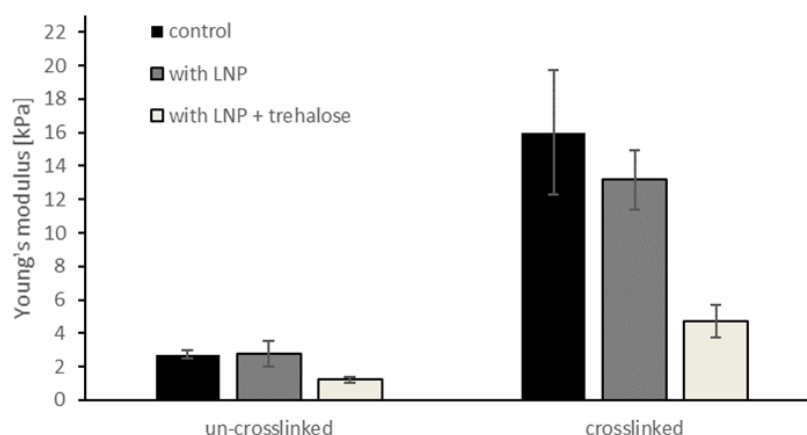


Figure 4-25 : Modules d'Young (E) des éponges non-réticulées et réticulées (un-crosslinked CS(1%)PEG(2%) / crosslinked CS(1%)PEG-YNE/SH(2%)) avec et sans LNPs à une concentration de 50 % w/w_{CS} et contenant ou pas du tréhalose (LNP/tréhalose = 4).

4.3 Conclusion

Dans ce chapitre nous nous sommes attachés à développer de nouvelles éponges de CS/PEG, stables en milieu physiologique et avec des propriétés mécaniques suffisantes pour pouvoir être proposées comme systèmes de délivrance de PA.

Dans ces éponges, le PEG a été simplement mélangé au CS ou bien réticulé chimiquement par addition nucléophile thiol-yne dans la solution de CS, formant un réseau CS/PEG semi-interpénétré. Dans un premier temps, la cinétique de gélification du réseau simple de PEG (PEG-SH/PEG-YNE) a été étudiée et des conditions optimales (concentration en PEG et équivalents en groupements fonctionnels) ont été choisies pour être utilisées dans la préparation des éponges. Les propriétés des éponges réticulées et non-réticulées ont été comparées. Les caractérisations des éponges par leurs propriétés mécaniques, leur taux de gonflement et leur stabilité dans le PBS ainsi que l'analyse par spectroscopie IR ont permis d'apporter des preuves de la réticulation du réseau PEG dans les éponges de CS. L'analyse de la morphologie des éponges réticulées par MEB à l'état déshydraté a également démontré la présence de pores bien définis dans les éponges réticulées.

Après avoir caractérisé ces éponges, des éponges composites contenant des LNPs de diamètre 120 nm ont été préparées. Pour être sûrs que les LNPs soient bien présentes dans le matériau, elles ont été ajoutées dès la première étape du procédé de fabrication des éponges. Leur présence et leur répartition homogène dans les éponges réticulées et non-réticulées a été observée par microscopie confocale. Des études préliminaires sur la stabilité des LNPs dans le matériau et sur les nouvelles propriétés mécaniques des

éponges composites ont été conduites. Il a été démontré que les LNPs résistaient aux traitements des éponges à des pH extrêmes. Néanmoins une déstabilisation des particules a été observée dès leur première lyophilisation dans le matériau. L'ajout d'un cryoprotecteur dans la formulation des éponges limite cette déstabilisation mais conduit à la dégradation des propriétés mécaniques de l'éponge, tandis que les LNPs sans tréhalose ne les modifiaient pas. La prochaine étape de ce travail aurait été d'évaluer la cinétique de libération des LNPs depuis les différentes éponges formulées.

Références

- [1] Mati-Baouche N, Elchinger P-H, de Baynast H, Pierre G, Delattre C, Michaud P. Chitosan as an adhesive. *European Polymer Journal* 2014;60:198-212.
- [2] Baldrick P. The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 2010;56:290-9.
- [3] Truong VX, Dove AP. Organocatalytic, regioselective nucleophilic "click" addition of thiols to propiolic acid esters for polymer-polymer coupling. *Angewandte Chemie - International Edition* 2013;52:4132-6.
- [4] Chambon F, Winter HH. Linear Viscoelasticity at the Gel Point of a Crosslinking PDMS with Imbalanced Stoichiometry. *Journal of Rheology* 1987;31:683-97.
- [5] Kavanagh GM, Ross-Murphy SB. Rheological characterisation of polymer gels. *Progress in Polymer Science* 1998;23:533-62.
- [6] Truong VX, Ablett MP, Richardson SM, Hoyland JA, Dove AP. Simultaneous Orthogonal Dual-Click Approach to Tough, in-Situ-Forming Hydrogels for Cell Encapsulation. *Journal of the American Chemical Society* 2015;137:1618-22.
- [7] Schwarz C, Mehnert W. Freeze-drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles (SLN). *International Journal of Pharmaceutics* 1997;157:171-9.
- [8] Lisa Racine A-CC. Lyophilisation de nanoparticules lipidiques. Rapport de stage 2013.

Chapitre 5

Matériels et méthodes complémentaires

Chapitre 5 Matériels et méthodes complémentaires	201
5.1 Caractérisations complémentaires des hydrogels de CMC-p/PEG	203
5.1.1 Caractérisations de la carboxyméthylcellulose (CMC).....	203
5.1.1.1 Détermination de la masse molaire moyenne en masse (Mw) par chromatographie d'exclusion stérique (SEC).....	203
5.1.1.2 Détermination du degré de substitution en groupements carboxyméthyles	203
5.1.2 Caractérisations des propriétés mécaniques des hydrogels de CMC-p/PEG.....	204
5.1.2.1 Rhéologie.....	204
5.1.2.2 Compression uniaxiale : mesure du module d'Young (E) à l'échelle macroscopique.....	204
5.1.2.3 Compression uniaxiale : mesure du module d'Young (E) à l'échelle nanoscopique	206
5.1.3 Analyse de la morphologie des hydrogels de CMC-p/PEG.....	209
5.1.3.1 Lyophilisation des hydrogels	209
5.1.3.2 Observation au microscope électronique à balayage (MEB)	209
5.2 Caractérisations complémentaires des éponges de CS/PEG.....	210
5.2.1 Caractérisations du chitosane	210
5.2.1.1 Détermination de la masse molaire moyenne viscosimétrique (Mv)	210
5.2.1.2 Détermination du degré d'acétylation (DA).....	211
5.2.2 Formulation et caractérisations des éponges composites de CS/PEG + LNPs	211
5.2.2.1 Formulation et préparation des éponges composites	211
5.2.2.2 Observation des éponges composites au microscope confocal	212
5.2.2.3 Etude de la stabilité des LNPs à différents pH dans les éponges.....	212
5.2.2.4 Etude de la stabilité des LNPs dans les éponges	213
5.3 Fabrication et caractérisations des films de CS/PEG.....	213
5.3.1 Matériels	213
5.3.2 Synthèse du chitosane-penténoate (CS-p)	213
5.3.3 Fabrication des films de CS/PEG	214
5.3.4 Caractérisations des films de CS/PEG	215
5.3.4.1 Mesure de l'épaisseur.....	215
5.3.4.2 Evaluation de la stabilité.....	216
5.3.4.3 Mesure du taux de gonflement	216
5.3.4.4 Spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier (FTIR).....	216
5.3.4.5 Evaluation des propriétés mécaniques.....	217
Références.....	218

5.1 Caractérisations complémentaires des hydrogels de CMC-p/PEG

5.1.1 Caractérisations de la carboxyméthylcellulose (CMC)

5.1.1.1 Détermination de la masse molaire moyenne en masse (M_w) par chromatographie d'exclusion stérique (SEC)

Cette technique donne accès à des grandeurs physiques comme la masse molaire moyenne du polymère, son rayon de giration, ou encore sa viscosité intrinsèque. La technique consiste à fractionner l'échantillon selon le volume hydrodynamique des polymères, puis à analyser les fractions à l'aide de différents détecteurs.

Seuls les échantillons de CMC ont été analysés par cette technique, car le chitosane porteur de fonction amine protonnées nécessite l'utilisation de colonnes spécifiques.

Les échantillons à analyser sont solubilisés dans le nitrate de sodium (NaNO_3) à 0.1 M, à une concentration de 2 mg/mL puis filtrés sur des membranes SARTORIUS de porosité 0.2 μm . Un volume de 100 μL est injecté à travers une colonne Shodex OHpak SB-803 HQ sur un module de séparations e2695 Alliance de Waters (débit pompe 0,5 mL/mn). En sortie de colonne, la solution est analysée par 2 détecteurs montés en série :

- un appareil de diffusion de la lumière DAWN HELEOS II de la société Wyatt Technology Corporation (Santa Barbara, USA) permettant d'accéder à la masse molaire moyenne en poids et au rayon de giration R_g à partir de la méthode de Zimm. Le programme ASTRA assure le traitement des données pour obtenir les masses molaires moyennes en nombre et en masse, ainsi que la polydispersité peut être évaluée
- un réfractomètre différentiel Optilab T-reX de la société Wyatt Technology Corporation (Santa Barbara, USA) permettant de déterminer la concentration de chaque fraction

Seuls les échantillons de CMC ont été analysés par cette technique, car le chitosane porteur de fonction amine protonnées nécessite l'utilisation de colonnes spécifiques.

5.1.1.2 Détermination du degré de substitution en groupements carboxyméthyles

Une des méthodes possibles pour déterminer le DS de la CMC est la titration par conductimétrie et pH-métrie. Pour cette méthode, 0.5 g de CMC ont été dissous dans 500 mL d'eau distillée. Pour que le dosage puisse permettre de calculer de façon quantitative ce DS, les sels de sodium de la CMC sous forme $-\text{COO}^-$ doivent être convertis en forme protonnée $-\text{COOH}$. Pour cela la solution de CMC préparée est acidifiée sur une colonne de résine amberlite acide (SO_3H). La colonne a été préalablement acidifiée avec une solution d'HCl (0,1M), puis rincée plusieurs fois à l'eau distillée jusqu'à atteindre un pH neutre. Une masse connue de CMC en solution est passée sur la colonne puis récupérée en bas de colonne. Un certain volume de cette solution

est lyophilisé afin de connaître la masse exacte de CMC contenue dans la solution récupérée, qui sera ensuite titrée par une solution de NaOH 0.1M. Le pH ainsi que la conductivité sont enregistrés en continu en fonction du volume de NaOH ajouté grâce à une sonde pH et à un conductimètre placé dans la solution. A partir des courbes de titration pH-métrique et conductimétrique, le nombre de moles de groupements carboxylique par gramme de CMC, et ainsi le degré de substitution de ce polymère peuvent être calculés.

5.1.2 Caractérisations des propriétés mécaniques des hydrogels de CMC-p/PEG

5.1.2.1 Rhéologie

Pour évaluer les propriétés dissipatives des hydrogels, leurs propriétés viscoélastiques linéaires ont été étudiées avec un rhéomètre AR2000EX (TA Instrument) à contrainte imposée. Une lampe UV ($\lambda=365$ nm) est intégrée au rhéomètre pour mesurer l'évolution des propriétés durant la réticulation. Une géométrie plane en aluminium de 20 mm de diamètre a été utilisée. 300 μ L de la solution de CMC-p/PEG dans le PBS sont déposés sur le plan en quartz du rhéomètre puis la géométrie haute est abaissée jusqu'à atteindre une distance d'environ 800 μ m. Les mesures ont été réalisées à force normale nulle ($F_N=0 \pm 0.1$ N). Une première mesure en balayage de déformation (strain sweep) a été réalisée entre 1% et 15 % à une fréquence de 1 Hz. Puis les modules de stockage (G') et de perte (G'') ont été enregistrées en fonction du temps pendant 36 min à une déformation fixe de 3,5% à une fréquence de 1 Hz. Durant l'enregistrement, 1,5 min après avoir débuté la mesure, la solution est irradiée ($\lambda = 365$ nm, $P=20$ mW/cm²) pendant 35 min. Une dernière mesure en balayage de fréquence est réalisée pour s'assurer que la réticulation du gel est bien complète en fin de mesure. (Le premier balayage en contrainte permet de définir une déformation dans le domaine linéaire pour

5.1.2.2 Compression uniaxiale : mesure du module d'Young (E) à l'échelle macroscopique

Essais réalisés avec le rhéomètre

Les tests en compression ont été réalisés sur des hydrogels de forme cylindrique ($d=0,6$ cm et $h_0=0,5$ cm), juste après préparation, à l'aide d'un rhéomètre AR2000EX (TA instrument) équipé d'une cellule de force de 50 N en utilisant le mode « squeeze test ». Le gel est placé sur le plateau du rhéomètre et la géométrie haute, de diamètre 20 mm est abaissée jusqu'à être en contact avec le gel et atteindre une force normale de 0.03 N. Les essais ont été réalisés à une vitesse de 10 μ m/s. Durant la mesure, la force normale (F_N) et la position de la géométrie sont enregistrés dans le temps. A partir de ces données brutes et des dimensions du gel, la contrainte nominale et la contrainte vraie ont été calculées [1] :

$$\sigma_{nominale} = \frac{F}{S_0} \quad (1)$$

avec S_0 la section initiale du gel.

La contrainte vraie a ensuite été calculée pour tenir compte du caractère incompressible du gel, et donc de la déformation de la surface du gel durant la mesure (le volume des gels avant et après compression sont supposés être les mêmes).

$$\sigma_{vraie} = \frac{F}{S} = \frac{F}{S_0} \lambda' \quad (2)$$

$$\lambda' = \frac{h}{h_0} \quad (3)$$

avec h la hauteur du gel à l'instant t et h_0 la hauteur du gel avant le début de la mesure.

Sur la Figure 5-1 est représenté σ_{vraie} en fonction du déplacement λ' . La pente de la courbe qui modélise σ_{vraie} pour de faibles déplacement correspond au module d'Young E selon la loi de Hooke ($\sigma = E\epsilon$) (représenté en noir sur la courbe ci-dessous).

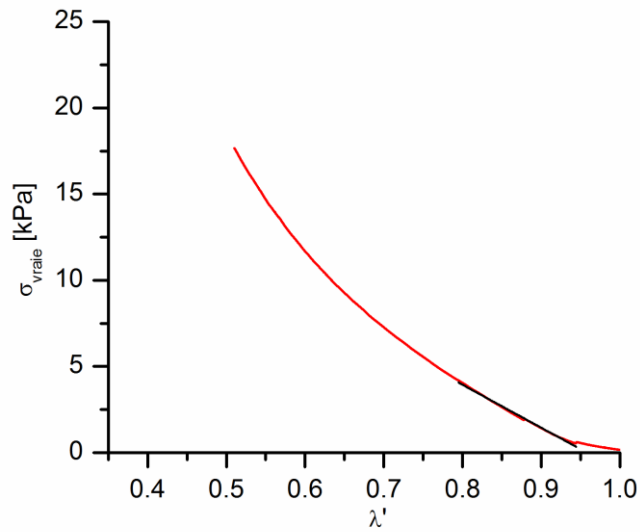


Figure 5-1: Détermination du module d'Young (E) à partir de la courbe σ_{vraie} – déplacement λ' .

Pour chaque type de matériau, les essais ont été reproduits sur environ 6 échantillons différents.

Essais réalisés avec le texturomètre

Des essais de compression ont également été réalisés avec un texturomètre SHIMADZU EZ-X équipé d'une cellule de 5 N. Le protocole qui a été utilisé est similaire à celui décrit pour le rhéomètre. Les hydrogels de forme cylindrique ($d=0,6$ cm et $h=0,5$ cm) sont placés entre les 2 plateaux du texturomètre et mis en contact

avec la géométrie plane de diamètre 20 mm, jusqu'à atteindre une force normale de 0.03 N. Les mesures ont été faites à une vitesse de 10 $\mu\text{m/s}$. La force normale et le déplacement de la géométrie sont enregistrés. A partir de ces données et de la méthode décrite précédemment, une courbe contrainte vraie – déformation ($\sigma_{\text{vraie}} = f(\lambda')$) est générée, et la pente de la tangente sur la partie linéaire de la courbe correspond à la valeur du module E. Pour chaque type de matériau, les essais ont été reproduits sur environ 6 échantillons différents, jusqu'à atteindre 50% de déformation.

5.1.2.3 Compression uniaxiale : mesure du module d'Young (E) à l'échelle nanoscopique

Mesures en microscopie à force atomique (AFM) en milieu liquide

La microscopie à force atomique (AFM) est un profilomètre mécanique à l'échelle du nanomètre. Une pointe, placée à l'extrémité d'un levier souple, interagit avec la surface de l'échantillon à imager. Cette interaction engendre un mouvement de l'extrémité du levier appelé déflexion. Après détection optique, la mesure de la déflexion alimente une boucle de contre-réaction qui maintient constante ce déplacement de l'extrémité du levier, via la polarisation d'une céramique piézo-électrique (axe z). Pour obtenir une image, la pointe solidaire de son porte pointe est montée sur une piézo-tube (en PZT) qui permet de réaliser le balayage dans le plan (axes x & y). Dans l'instrumentation que nous utilisons (Dimension ICON de Bruker), l'échantillon est donc fixe et la pointe se déplace. Le schéma de principe de la tête de mesure AFM utilisée dans ce travail est présenté Figure 5-2 [2].

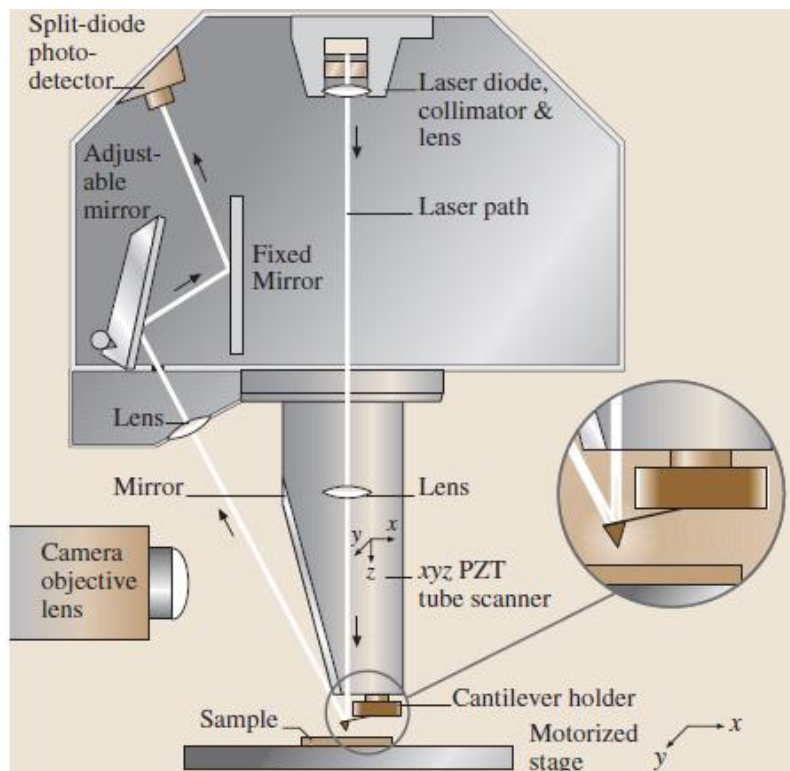


Figure 5-2: Schéma de la tête de mesure AFM utilisée dans ce travail [2].

Pour ces travaux, nous utilisons l'AFM pour estimer les propriétés mécaniques des hydrogels, dans le but de les comparer aux valeurs obtenues avec un rhéomètre ou un texturomètre.

Pour ce faire une courbe « déflexion-distance » est enregistrée à chaque pixel de la cartographie des propriétés mécaniques (mode « Force-Volume »). Il s'agit d'enregistrer la déflexion du levier en fonction de la distance entre la pointe et l'échantillon quand ceux-ci se rapprochent ou s'éloignent. Une déflexion de consigne est sous le contrôle de l'utilisateur, elle donne la force maximale appliquée entre la pointe et l'échantillon.

La relation entre Force (P) [N] et déflexion (D) [m] est obtenue par la loi de Hook :

$$P = k.D \quad (4)$$

où k [N/m] est la constante de raideur du levier à l'aplomb de la pointe, c'est-à-dire au point d'indentation. Il est important de noter que cette déflexion correspond à l'indentation de la pointe dans le matériau à caractériser, mais également au mouvement de flexion du levier induit par la raideur du matériau sous la pointe. Pour réaliser cette expérience, nous utilisons donc des leviers suffisamment raides pour indenter le matériau (et, *in fine*, réaliser une modélisation mécanique du contact pointe échantillon) tout en restant suffisamment souples pour garantir une bonne sensibilité à la détection du mouvement (et donc, au contrôle de force). Préalablement aux mesures sur les hydrogels, une courbe de référence sur un matériau indéformable (saphir) est réalisée avec le levier utilisé dans la suite des expériences. Elle permet de calibrer la sensibilité de la photodiode et de convertir ensuite les courbes « déflexion-distance » en courbes « force - indentation » (Figure 5-3-a), car seule la déflexion due à l'indentation de la pointe dans le matériau nous intéresse. Les modèles présentés ci-dessous seront appliqués à la courbe « force-indentation » (Figure 5-3-b).

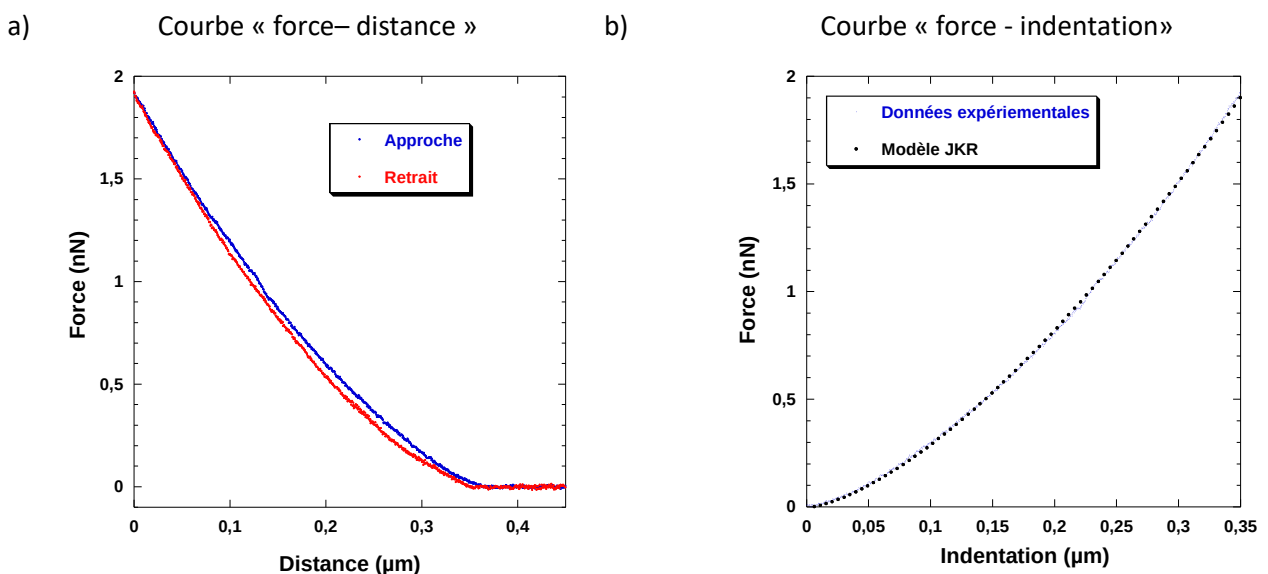


Figure 5-3 : a) données « force – distance », obtenues à partir des données brutes « déflexion - distance » et b) « force – indentation » sur laquelle le modèle JKR (détaillé ci-dessous est appliqué).

Toutes nos données expérimentales AFM sont traitées dans le logiciel Atomic J [3]. Celui-ci inclut plusieurs modèles de mécanique du contact entre pointe et échantillon. Avec nos conditions expérimentales, notamment la forme « sphérique » et la taille de l'indenteur utilisé, les approches retenues sont les modèle de sphère-Hertz [4], Johnson-Kendall-Roberts (JKR) [5], hyperboloïde [6], et sphère-Sneddon [7].

Dans le cas du modèle sphère-Hertz, la courbe force-indentation peut être modélisée par l'équation suivante :

$$P = \frac{4E}{3(1-\nu^2)} \sqrt{R} \delta^{\frac{3}{2}} \quad (5)$$

P est la force [N], E le module d'Young [Pa], ν le coefficient de Poisson, R le diamètre de la sphère de la pointe [m] et δ la profondeur d'indentation [m]. Ce modèle est valable lorsque le rayon de la sphère en contact avec la matériau est négligeable devant le rayon de la sphère, c'est-à-dire lorsque $\nu(R\delta) \ll R$

Le modèle de sphère-Sneddon ne nécessite pas $\nu(R\delta) \ll R$ et est défini par l'équation suivante :

$$P = \frac{E}{(1-\nu^2)} \left(\frac{R^2 + a^2}{2} \text{Log} \left(\frac{R+a}{R-a} \right) - aR \right) \quad \delta = \frac{a}{2} \text{Log} \left(\frac{R+a}{R-a} \right) \quad (6)$$

où a [m] est l'aire de contact.

Afin de tenir compte de l'adhésion entre la pointe et l'échantillon le modèle JKR a aussi été utilisé :

$$P = \frac{4Ea^3}{3R(1-\nu^2)} - 2\sqrt{2\pi \frac{E\gamma a^3}{(1-\nu^2)}} \quad \delta = \frac{a^2}{R} - \sqrt{\frac{2\pi a\gamma}{E(1-\nu^2)}} \quad (7)$$

où γ représente l'énergie de surface. Ce modèle est approprié pour les mesures de matériaux souples, avec un rayon R large et une grande énergie d'adhésion [8].

Enfin un dernier modèle a été utilisé, le modèle hyperboloïde décrit par l'équation suivante :

$$P = \frac{Ea^3}{(1-\nu^2)R} \left[\xi^2 + \frac{\xi}{2}(1-\xi^2) \left(\frac{\pi}{2} + \text{ArcTan} \left[\frac{1}{2\xi} - \frac{\xi}{2} \right] \right) \right] \text{ where } \xi = \frac{R \text{Cot}[\theta]}{a} \quad \delta = \frac{a^2}{2R} \xi \left(\frac{\pi}{2} + \text{ArcTan} \left[\frac{1}{2\xi} - \frac{\xi}{2} \right] \right) \quad (8)$$

Il faut noter que dans cette étude à l'AFM, nous cherchons à dégager des tendances sur les propriétés élastiques de nos hydrogels en fonction de leur réticulation et/ou de la présence de LNPs. Même s'ils sont très utilisés dans la littérature, la validité des modèles d'indentation classique pour des expériences AFM restent à valider et débattre. Nous rappelons qu'ils ne sont valables que pour des matériaux homogènes,

continus et infinis. Notamment, les effets de peau et les propriétés viscoélastiques ne sont pas prise en compte dans cette étude à visée comparative.

Protocole de mesure AFM :

Pour chaque hydrogel, une épaisseur d'un millimètre a été fixée de manière covalente à une lamelle de verre préalablement traitée. La lamelle sur laquelle le gel est fixé est ensuite immergée dans une solution de PBS puis analysée par AFM. Les mesures sont faites sur les gels gonflés à l'équilibre.

La raideur du levier AFM utilisé pour toutes les mesures est de 0.094 N/m (mesure par vibrométrie laser, données du fabricant). Ces leviers sont choisis pour avoir une trainée hydrodynamique minimale dans le milieu liquide. Le rayon de courbure (R) est de 65 nm.

Les cartographies (mode « Force-Volume ») des propriétés mécaniques sont obtenus sur $(16\ \mu\text{m})^2$ avec un échantillonnage de $(16\ \text{pixels})^2$.

Le déplacement imposé entre la pointe et l'échantillon est de 300 nm à 500 nm, la vitesse d'approche et de retrait est constante et identique à l'aller comme au retour : 300 à 500 nm/s. Chaque courbe (approche ou retrait) est échantillonnée avec 1024 points.

Deux déflexions de consigne ont été utilisées : 10 nm ou 20 nm, donnant respectivement des forces maximales de 0.94 nN ou 1.88 nN.

5.1.3 Analyse de la morphologie des hydrogels de CMC-p/PEG

5.1.3.1 Lyophilisation des hydrogels

Les pièces cylindriques d'hydrogels de CMC-p/PEG réticulés ($d=0.6\text{cm}$, $h=0.5\text{cm}$), ont été mises à gonfler dans 1 mL de PBS pendant 1 h, éponnées pour éliminer l'excès d'eau, et congelées à -20°C . Après 12h de congélation à -20°C , l'eau est éliminée par sublimation ($P=0,06\ \text{mbars}$).

5.1.3.2 Observation au microscope électronique à balayage (MEB)

La microstructure des gels lyophilisés a été observée au microscope à balayage (MEB, S-4100 Hitachi High Technologies America) travaillant à 20 kV. Une section du gel lyophilisé a été découpée au scalpel et recouverte d'une fine couche de platine pour accentuer le signal (10 nm). La taille moyenne des pores a été estimée pour 2 échantillons, pour un grossissement $\times 100$, sur 2 zones différentes du gel. Les pores n'ayant pas une forme sphérique, la taille de pores est définie comme étant la plus grande longueur de pore mesurable. Le logiciel ImageJ a été utilisé pour déterminer la taille des pores.

5.2 Caractérisations complémentaires des éponges de CS/PEG

5.2.1 Caractérisations du chitosane

5.2.1.1 Détermination de la masse molaire moyenne viscosimétrique (Mv)

Rappels sur la viscosité

La viscosité d'un fluide se manifeste par sa résistance à la déformation sous l'effet d'une contrainte en cisaillement ou élongationnelle. Elle dépend de la masse molaire du polymère, de sa concentration, de sa structure, et des interactions avec le solvant. Newton fut le premier à formuler une description mathématique de la viscosité, qu'il définit comme étant le rapport entre la contrainte de cisaillement τ et la vitesse de cisaillement $\dot{\gamma}$:

$$\eta_{cis} = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} \quad (9)$$

Une solution de macromolécules a une viscosité supérieure à celle du solvant dans lequel est elle sont dissoutes.

Plusieurs grandeurs physiques sont liées à la viscosité :

La viscosité relative η_r , est sans dimensions et représente la viscosité de la solution normalisée par la viscosité du solvant :

$$\eta_r = \frac{\eta}{\eta_0} \quad (10)$$

- la viscosité spécifique η_{sp} , également sans dimension caractérise l'augmentation de viscosité due à la solubilisation de macromolécules

$$\eta_{sp} = \frac{(\eta - \eta_0)}{\eta_0} \quad (11)$$

- la viscosité réduite η_{red} , en g/mL représente la viscosité du fluide relative à sa concentration :

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{c} \quad (12)$$

- la viscosité intrinsèque $[\eta]$ (exprimée en mL/g) est la limite de la viscosité réduite lorsque la concentration en macromolécules tend vers 0.

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{(\eta - \eta_0)}{\eta_0} \quad (13)$$

- la viscosité intrinsèque $[\eta]$, mesurée en régime dilué, et la constante de Huggins k' sont reliées par la relation de Huggins:

$$[\eta_{red}] = [\eta] + k'[\eta]^2 c \quad (14)$$

La coefficient k' est sans dimension et dépend de la température et des interactions spécifiques polymères – solvant.

A partir de la viscosité intrinsèque, il est possible de calculer la masse molaire moyenne viscosimétrique à partir de l'équation de Mark-Houwink-Sakurada :

$$[\eta] = KM^a \quad (15)$$

où M représente la masse molaire moyenne viscosimétrique de la macromolécule, K et a sont des coefficients empiriques (Mark-Houwink) qui dépendent du polymère, du solvant et de la température et $[\eta]$ la viscosité intrinsèque.

Protocole

Un viscosimètre capillaire SCHOTT AVS 360 de type Ubbelohde a été utilisé pour mesurer la viscosité intrinsèque $[\eta]$ du chitosane (CS). On mesure le temps d'écoulement d'un volume défini de solution, placé dans un tube introduit dans bain thermostaté (25 °C). Ce système est également équipé d'un ViscoDoser AVS20 permettant la préparation de différentes concentrations automatiquement.

Le chitosane natif est solubilisé à 0,4 mg/mL dans une solution d'acide acétique 0.3 M/acétate de sodium 0,1 M, filtré sur des membranes SARTORIUS de porosité 0.2 µm. 15 mL de cette solution de chitosane sont placés dans le tube, puis le ViscoDoser est réglé pour faire 5 dilutions (3 à + 1 mL et 2 à +2 mL) avec le solvant utilisé pour faire la dilution à T=25°C.

5.2.1.2 Détermination du degré d'acétylation (DA)

Le degré d'acétylation du chitosane (CS) est déterminé par Résonance Magnétique Nucléaire du proton (^1H RMN) sur un appareil Bruker Avance 400 opérant à une fréquence de 400 MHz. Une masse de 5 mg de CS à analyser est solubilisée dans une solution d'acide acétique deutéré (CD_3COOD) à 1% v/v. L'échantillon préparé est ensuite analysé à 353K (80°C). La référence utilisée est alors le pic résiduel de l'eau étalonné à 4,2 ppm pour une température de 353 K.

5.2.2 Formulation et caractérisations des éponges composites de CS/PEG + LNPs

5.2.2.1 Formulation et préparation des éponges composites

Les nanoparticules lipidiques ont été intégrées aux éponges réticulées et non-réticulées préparées à partir d'une solution de PEG à 2 % w/v. Les particules ont été ajoutées à la solution de PEG et de CS avant la première étape de lyophilisation des éponges. Des éponges contenant un cryoprotecteur, le tréhalose, ont

également été préparées afin d'améliorer la stabilité des LNPs dans les éponges durant les 2 lyophilisations. Les formulations des différentes éponges sont présentées dans les tableaux ci-dessous.

Eponges hybrides non-réticulées

Tableau 5-1: Formulation des éponges non-réticulées contenant des LNPs avec et sans tréhalose. (Le PEG utilisé est un PEG-OH linéaire (Mw=10 000 g/mol)).

Nom	C _{CS} [mg/mL]	C _{PEG} [mg/mL]	C _{LNP} [mg/mL]	C _{tréhalose} [mg/mL]
un-crosslinked CS(1%)PEG(2%)+ LNP	10	20	5	-
un-crosslinked CS(1%)PEG(2%) + LNP + tréhalose	10	20	5	20

Eponges hybrides réticulées

Tableau 5-2: Formulation des éponges réticulées contenant des LNPs avec et sans tréhalose. (Le PEG-YNE utilisé est un tétraPEG-alcyne (Mw=10 200 g/mol) et le PEG-SH est un PEG-bis(thiol) (Mw=3 500 g/mol)).

Nom	C _{CS} [mg/mL]	C _{PEG-YNE} [mg/mL]	C _{PEG-SH} [mg/mL]	C _{LNP} [mg/mL]	C _{tréhalose} [mg/mL]
crosslinked CS(1%)PEG-YNE/SH(2%) + LNP	10	10,7	9,3	5	-
crosslinked CS(1%)PEG-SH/YNE(2%) + LNP + tréhalose	10	10,7	9,3	5	20

5.2.2.2 Observation des éponges composites au microscope confocal

Les éponges contenant des LNPs encapsulant un fluorophore (Dil), réticulées et non-réticulées, ont été observées au microscope confocal inversé (Leica DMiRE2 microscope). Une fine rondelle d'environ 1 mm d'épaisseur a été découpée des éponges pour être observée. L'échantillon a été observé à un grossissement x20 et le Dil (λ_{ex} =549 nm et λ_{em} =565 nm) encapsulé dans le cœur des LNPs a été excité avec le laser de 543 nm.

5.2.2.3 Etude de la stabilité des LNPs à différents pH dans les éponges

La taille et la polydispersité des LNPs dans les différentes solutions utilisées pour traiter les éponges ont été mesurées par diffusion de la lumière (DLS, Zeta Sizer Nano ZS, Malvern Instrument). Les LNPs ont été préparées à 4 mg/mL dans l'AcOH 1 % v/v (pH = 4,2) et dans l'hydroxyde d'ammonium (pH = 11,5) et les mesures de DLS ont été réalisées à t=0, t=15 min, t=7h30, t=24h et t=96 h.

5.2.2.4 Etude de la stabilité des LNPs dans les éponges

La taille et la polydispersité des LNPs présentes dans les éponges non-réticulées, ayant subi 2 lyophilisations et des traitements à des pH extrêmes ont été mesurés par diffusion de la lumière (DLS, Zeta Sizer Nano ZS, Malvern Instrument). Les particules ont été récupérées des éponges après dissolution du matériau dans une solution acide (AcOH 1 % v/v). Avant de réaliser la mesure, la solution récupérée est filtrée sur 0,45 µm pour éliminer le polymère qui ne serait pas dissous. Les mesures ont été réalisées à 25 °C sur 6 échantillons différents où chaque mesure est la moyenne de 3 mesures indépendantes.

5.3 Fabrication et caractérisations des films de CS/PEG

5.3.1 Matériels

Le CS utilisé pour préparer les films provient de chez Sigma Aldrich et a été caractérisé par son DA (0.14) et sa masse molaire viscosimétrique ($M_v=60\,000$ g/mol) dans le chapitre 3. Le PEG-OH (PEG, $M_w = 4\,000$ g/mol) a été fourni par la société Fluka et le PEG-bis(thiol) (PEG-SH, $M_w=3\,400$ g/mol) par la société Creative PEGWorks (USA). Le 1-[4-(2-hydroxyéthoxy)-phényl]-2-hydroxy-2-méthyl-1-propane-1-one (Irgacure 2959) provient de chez Ciba Specialty Chemicals (Basel, Switzerland). L'anhydride penténoïque, le N,N-diméthylformamide (DMF), le tampon phosphate salin (PBS, pH 7,4) et les autres produits chimiques ont été achetés chez Sigma-Aldrich-Fluka (L'Isle d'Abeau, France).

5.3.2 Synthèse du chitosane-penténoate (CS-p)

0,4 g de CS est dissous dans 90 mL d'acide acétique à 0,2 M. La solution est placée à 4°C sous agitation durant toute une nuit. 88 mL de méthanol sont ajoutés à la solution de CS et la solution est remplacée sous agitation durant 1h. 88 µL d'anhydride sont préalablement dilués dans 3 mL de méthanol, puis ajoutés goutte à goutte à la solution de CS. La concentration en CS dans la solution est alors de 2,2 mg/mL. On laisse réagir pendant 2 h à température ambiante, puis un certain volume de NaOH 1 M est ajouté jusqu'à précipitation du CS (la solution se trouble). Le CS est ensuite rincé avec un gradient eau/éthanol et centrifugé plusieurs fois :

Centrifugation 7000rpm, 20min, 4°C

3/2 EtOH/H₂O - centrifugation 7000rpm, 20min, 4°C

7/3 EtOH/H₂O - centrifugation 7000rpm, 20min, 4°C

9/1 EtOH/H₂O - centrifugation 7000rpm, 20min, 4°C

EtOH - centrifugation 7000rpm, 20min, 4°C

La solution est filtrée sur fritté n°4 pour obtenir le chitosane sous forme de poudre blanchâtre. Le produit est séché pendant 2 jours à l'étuve à 50 °C ($m_{\text{recupérée}}=0.365$ mg). Les quantités de réactifs utilisés sont présentées dans le Tableau 5-3.

Tableau 5-3 : Tableau récapitulatif des quantités de réactifs utilisés pour la synthèse du CS-p

Produit	Mw [g/mol]	Eq	n [mol]	m [g]	V [mL]	d
Chitosan Sigma (Mv=60 kDa)	165	1	0,00121212	0,2	-	-
Anhydride	182	0,8	0,0009697	0,17648485	0,1770159	0,997
AcOH 0,2M	-	-	-	-	45	-
MeOH	-	-	-	-	44 + 1	-

5.3.3 Fabrication des films de CS/PEG

Les films de chitosane sont préparés en coulant une solution de chitosane dans un moule suivi par une étape d'évaporation du solvant.

Films de CS pur

Le chitosane est mis à solubiliser durant toute une nuit dans une solution d'acide acétique à 1 % v/v pour obtenir une solution de chitosane à 10 mg/mL. La solution visqueuse est placée durant 5 min dans un bain à ultrasons pour éliminer les bulles d'air. 10 mL de cette solution sont coulés sur une boîte de pétri en verre de 6 cm de diamètre et placés à l'étuve ventilée (BINDER) à 50°C pendant 3h30. Le film de diamètre 6 cm est délicatement décollé du moule en verre.

Films de CS/PEG

Des films de CS/PEG à des teneurs en PEG de 20 % w/w_{CS} et 50 % w/w_{CS} ont été fabriqués. Le protocole de préparation de ces films est similaire à celui des films de CS pur. Néanmoins, le PEG est préalablement solubilisé dans l'acide acétique avant d'être ajouté à la solution de chitosane. Il faut donc tenir compte de ce volume de PEG ajouté lors de la préparation de la solution de CS initiale. La composition de la solution finale est présentée dans le Tableau 5-4.

Tableau 5-4: Composition finale de la solution permettant de fabriquer des films de CS/PEG. Les % utilisés dans l'appellation des films représentent le % masse/volume.

Noms	C _{CS} [mg/mL]	C _{PEG} [mg/mL]
CS(1%)	10	0
CS(1%)PEG(0,2%)	10	2
CS(1%)PEG(0,5%)	10	5

Films de CS-p/PEG-SH réticulés

Des films réticulés de CS-p/PEG-SH à 20 % w/w_{CS} (0,2 % w/v dans la solution initiale, ratio [SH]/[=] de 0,12) et à 50 % w/w_{CS} (0,5 % w/v dans la solution initiale ratio [SH]/[=] de 0,32) ont été préparés.

Du CS-pentenoate (CS-p) (DS 0,2) est mis à solubiliser dans une solution d'acide acétique à 1 % (v/v) durant toute une nuit. Après solubilisation du CS-p, le PEG-SH est mis à solubiliser pendant 5 min dans un certain volume d'acide acétique puis est ajouté à la solution de chitosane. Le photoinitiateur, l'irgacure 2959, préparé à une concentration de 10 mg/mL est finalement ajouté. La composition finale de la solution qui servira à former le film est détaillée dans le tableau Tableau 5-5. Cette solution est placée durant 5 min dans un bain à ultrasons, puis 10 mL de cette solution sont coulés dans une boîte de pétri en verre (diamètre 6 cm). L'ensemble est placé à l'étuve ventilée (BINDER) durant 1h à 50 °C. Après évaporation d'une partie du solvant, la solution visqueuse est placée dans un four UV (four DELO, $\lambda=365$ nm, $P=46$ mW/cm²) durant 10 min afin de permettre la réaction radicalaire thiol-ène. Le gel fin ainsi obtenu est replacé à l'étuve à 50 °C durant 2h15. Le film de diamètre 6 cm est décollé délicatement du moule en verre.

Tableau 5-5 : Composition finale de la solution permettant de fabriquer des films réticulés. Le CS utilisé est un CS fonctionnalisé avec des groupements alcène (CS-p) et le PEG est un PEG-bis(thiol).

Noms	C _{CS} [mg/mL]	C _{PEG-SH} [mg/mL]	R [SH]/[=]	C _{irg} [mg/mL]
CS(1%)PEG(0,2%)	10	2	0.12	1
CS(1%)PEG(0,5%)	10	5	0.31	1

5.3.4 Caractérisations des films de CS/PEG

5.3.4.1 Mesure de l'épaisseur

L'épaisseur des films est mesurée à l'aide d'un micromètre (Heindenhein). Pour chaque type de films, l'épaisseur a été mesurée à 6 endroits différents sur le film entier de diamètre 6 cm. L'épaisseur d'un film est alors la moyenne de ces 6 valeurs. Ces mesures ont été faites sur 2 films différents de 6 cm de diamètre.

5.3.4.2 Evaluation de la stabilité

Les films secs ($m \approx 15$ mg), découpés à partir des films de 6 cm de diamètre, non-réticulés et réticulés sont pesés (m_{sec-1}). Ils sont ensuite trempés dans une solution d'hydroxyde d'ammonium (NH_4OH) à 2 % v/v, pour éliminer l'acide acétique restant et éviter que le film ne se dissolve. Les films sont rincés avec une solution de PBS, puis immergés dans 2 mL de PBS frais. Après 24h, les films sont retirés de la solution de PBS et séchés pendant 48 h à l'étuve à 50 °C. Les films secs sont pesés pour la seconde fois (m_{sec-2}). La stabilité des films dans le PBS peut être alors exprimée par l'équation suivante :

$$S = \frac{m_{sec-2}}{m_{sec-1}} \quad (16)$$

S est la fraction de film restant après immersion dans le PBS. m_{sec-1} et m_{sec-2} sont les masses des films secs avant et après immersion. Chaque mesure a été reproduite 3 fois.

5.3.4.3 Mesure du taux de gonflement

Les films secs ($m \approx 15$ mg), découpés à partir des films de 6 cm de diamètre, non-réticulés et réticulés ont été pesés (m_{sec-1}). Ils ont ensuite été trempés dans une solution d'hydroxyde d'ammonium (NH_4OH) à 2 % v/v, pour éliminer l'acide acétique restant et éviter que le film ne se dissolve. Les films ont ensuite été rincés avec une solution de PBS puis immergés dans 2 mL de PBS. Le film à l'état gonflé a été pesé ($m_{hydraté}$) à différents intervalles de temps, en prenant soin d'éponger l'excès d'eau avec un filtre à papier. Le taux de gonflement a été mesuré pour 6 bouts de films provenant de 2 films différents de diamètre 6 cm. Le taux de gonflement a été calculé de la façon suivante :

$$Q = \frac{m_{hydraté}}{m_{sec-1}} \quad (17)$$

Q représente le taux de gonflement, $m_{hydraté}$ est la masse du film hydraté mesuré à un instant t, m_{sec-1} est la masse du film sec mesurée avant de le tremper dans la solution basique d'hydroxyde d'ammonium.

Pour les films réticulés les mesures de gonflement ont également été réalisées dans l'acide acétique à 1 % v/v selon le même protocole.

5.3.4.4 Spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier (FTIR)

Les spectres IR des films de chitosane ont été obtenus à l'aide d'un spectromètre Perkin Elmer FTIR spectrum two, avec une résolution de 8 cm^{-1} , dans une gamme de 4000-400 cm^{-1} . Le film sec a directement été déposé sur le plateau du spectromètre.

5.3.4.5 Evaluation des propriétés mécaniques

Les essais en traction ont été réalisés sur des films secs, rectangulaires, de longueur environ 5 cm et de largeur 1 cm. Ces films ont été proprement découpés dans les films circulaires initialement formés ($d=6$ cm). Un texturomètre (Shimadzu, EZ-X, Japon) monté avec une cellule de 500 N a permis de réaliser ces essais. Le taux d'extension a été fixé à 1 mm/min et un pré-chargement à 0,2 N a été imposé pour s'assurer que le film soit bien tendu avant de démarrer le test. Les films ont été étirés jusqu'à atteindre la rupture. Des mors pneumatiques ont été utilisés pour fixer les 2 extrémités du film ($P=1$ bar). A partir des courbes contraintes - déformation, le pourcentage d'élongation à la rupture ainsi que la contrainte à la rupture des films secs ont pu être déterminés. Un exemple de courbe obtenue avec cette procédure est présenté est Figure 5-4. Les essais ont été réalisés sur 4 films rectangulaires extraits de 2 films circulaires différents.

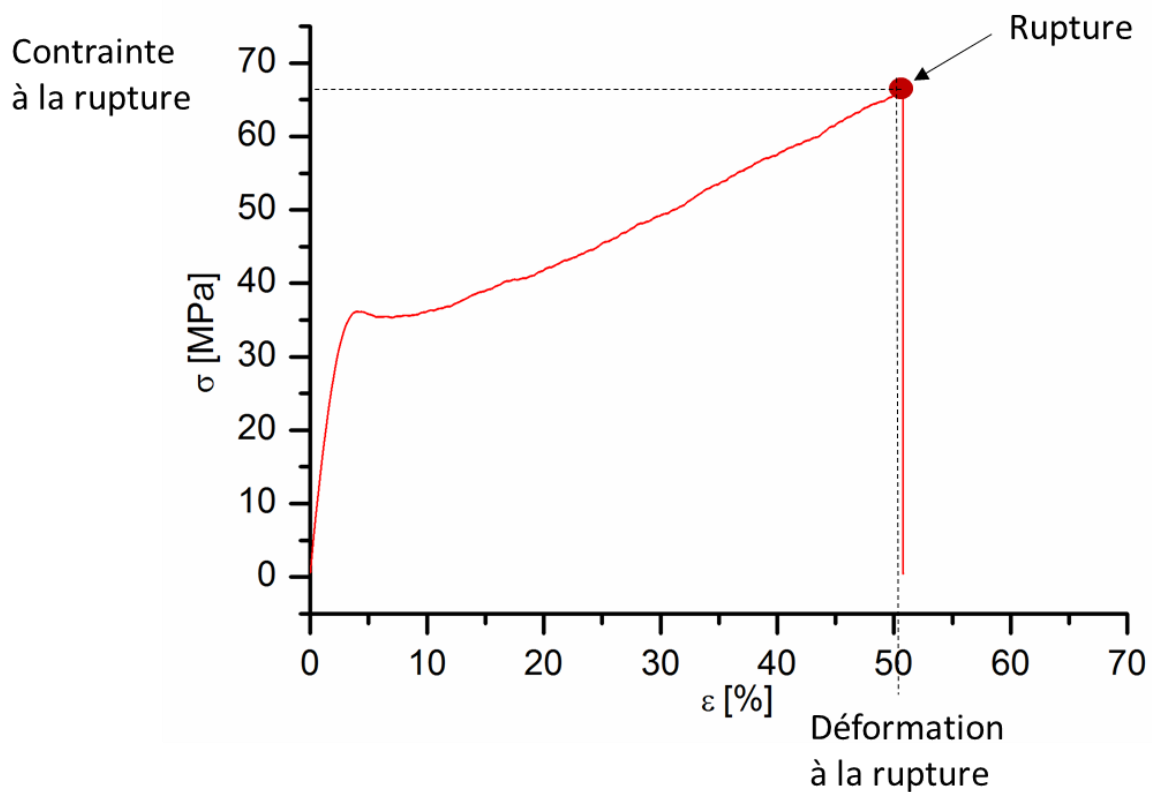


Figure 5-4: Essais de traction : contrainte σ en fonction de la déformation ε . (exemple du film réticulé CS(1%)PEG(0,2%)).

Références

- [1] Lin W-C, Fan W, Marcellan A, Hourdet D, Creton C. Large Strain and Fracture Properties of Poly(dimethylacrylamide)/Silica Hybrid Hydrogels. *Macromolecules* 2010;43:2554-63.
- [2] Bhushan B, Marti O. Scanning Probe Microscopy – Principle of Operation, Instrumentation, and Probes. In: Bhushan B, editor. *Springer Handbook of Nanotechnology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2004. p. 325-69.
- [3] Hermanowicz P. AtomicJ: An open source software for analysis of force curves. *Review of Scientific Instruments* 2014;85, 063703
- [4] Hertz H. Ueber die Berührung fester elastischer Körper. *Journal für die Reine und Angewandte Mathematik* 1882;1882:156-71.
- [5] Kendall K. The adhesion and surface energy of elastic solids. *Journal of Physics D: Applied Physics* 1971;4:1186-95.
- [6] Akhremitchev BB, Walker GC. Finite sample thickness effects on elasticity determination using atomic force microscopy. *Langmuir* 1999;15:5630-4.
- [7] Sneddon IN. The relation between load and penetration in the axisymmetric boussinesq problem for a punch of arbitrary profile. *International Journal of Engineering Science* 1965;3:47-57.
- [8] Maugis D. Adhesion of spheres: The JKR-DMT transition using a dugdale model. *Journal of Colloid and Interface Science* 1992;150:243-69.

Conclusion générale

L'objectif de ces travaux de thèse était d'élaborer de nouveaux matériaux capables de délivrer de façon prolongée un principe actif hydrophobe. Notre approche a alors été de développer des matériaux composites, en intégrant des nanoparticules lipidiques (LNPs), capables d'encapsuler un principe actif hydrophobe, dans des hydrogels à base de polysaccharides.

Une première étude a d'abord été conduite à partir de CMC, modifiée par des groupements alcènes (CMC-p), et de PEG-bis(thiol) (PEG-SH), réticulés par chimie thiol-ène radicalaire. L'avantage de cette chimie, qualifiée de chimie clic, et déclenchée sous UV en présence d'un photo-amorceur, est qu'elle est rapide, permet un contrôle spatio-temporel de la réticulation et conduit à des hydrogels homogènes. Les LNPs sont intégrées à cet hydrogel avant l'étape de réticulation, jusqu'à un ratio de 50 % w/w_{CMC}. Les caractérisations mécaniques et les mesures de gonflement des nouveaux hydrogels composites ont démontré que les LNPs ne gênaient pas la réticulation et que les hydrogels conservaient leurs propriétés initiales. Nous nous sommes ensuite particulièrement intéressés à l'étude de la libération de ces particules depuis cette matrice hydrogel. Cette étude a été conduite par spectroscopie de fluorescence en utilisant des LNPs marquées avec un fluorophore. Bien que la taille du réseau des gels soit du même ordre de grandeur que la taille des LNPs, les LNPs diffusent vers l'extérieur du gel. La diffusion des particules a été en partie attribuée à la déformation élastique des chaînes de polymères constituant le réseau. Le profil de libération a été modulé en fonction de la structure du réseau, de la taille et de la charge surfacique des particules. Il a été démontré que la vitesse initiale de libération est davantage impactée par la taille des particules, tandis que la structure des gels et la charge surfacique des LNPs ont une influence sur la quantité finale de LNPs délivrées en fin d'utilisation du système. Un modèle mathématique développé à partir de la seconde loi de Fick et établi à partir du volume occupé par les particules a été utilisé pour prédire des profils de libération des particules. Ce modèle, qui tient compte des propriétés du gel et des LNPs est en bonne adéquation avec les résultats expérimentaux. Bien qu'il ait été démontré qu'une partie des LNPs était déstabilisée une fois libérées, ce système remplit sa mission qui était d'encapsuler un principe actif hydrophobe et de le délivrer de façon prolongée (libération de l'actif durant les 7 premiers jours). Cette première étude nous a permis de corréler les propriétés structurales de la matrice hydrogel et celles des particules aux profils de libération.

A partir de cette première étude approfondie du système composite (CMC/PEG + LNP), de nouvelles matrices hydrogels ont été développées à partir de chitosane (CS), choisi pour ses propriétés biologiques et pour les diverses possibilités de le mettre en forme. Nous nous sommes attachés principalement à développer ces nouvelles matrices et à en évaluer leurs propriétés en lien avec l'application visée : évaluation de la porosité, des propriétés mécaniques, de la stabilité en milieu physiologique, et du taux de gonflement.

Deux stratégies différentes ont été abordées pour créer des hydrogels avec des propriétés mécaniques suffisantes et stables durant toute la durée de leur utilisation : le CS a été mélangé à un autre polymère, ou/et les polymères ont été réticulés chimiquement. Le PEG, un polymère synthétique, biocompatible et déjà utilisé comme agent réticulant dans la première étude, a été choisi pour être mélangé au CS. L'étude bibliographique nous a conduit à élaborer des hydrogels innovants de par leurs mises en forme, et les chimies de réticulation utilisées.

Les propriétés filmogènes du CS ont été utilisées pour préparer des films de CS /PEG. La chimie thiol-ène radicalaire a été de nouveau appliquée pour réticuler ces films, apportant une réelle amélioration de leurs propriétés. Alors que les films non-réticulés apparaissaient opaques et cassants, les films réticulés sont transparents et extensibles. Ces films réticulés ont également l'avantage d'être insolubles en milieu acide ($\text{pH}_{\text{surface peau}} \approx 5,2$).

Cette étude a également permis de mieux comprendre les interactions physiques entre le CS et le PEG, et de discuter du comportement du PEG dans ces matériaux hybrides. L'aspect opaque des films non réticulés a été attribué à la présence de cristaux de PEG dans le réseau. La réticulation des films permet de s'affranchir de ces problèmes de cristallisation.

Le dernier système tire avantage de la non solubilité du CS à pH physiologique pour préparer une nouvelle matrice hydrogel. L'élaboration de ce nouveau gel a été réfléchi pour permettre une diffusion plus rapide des particules dans le réseau et limiter la quantité de particules piégées dans le système en fin d'utilisation. Ainsi des hydrogels macroporeux ont été fabriqués par lyophilisation d'une solution de CS/PEG, conduisant à l'obtention d'un matériau spongieux.

Une nouvelle chimie de réticulation, la chimie thiol-yne par addition nucléophile, a été étudiée pour remplacer la chimie thiol-ène radicalaire et s'affranchir des radicaux libres pouvant interférer avec le principe actif encapsulé. Cette chimie a été appliquée pour réticuler le PEG contenu dans les éponges, conduisant à un réseau semi-interpénétré. La réticulation du PEG dans ces éponges apporte une meilleure stabilité du matériau en milieu physiologique, et améliore ses propriétés mécaniques. Néanmoins, les caractérisations IR des éponges réticulées, par analogie aux films réticulés par chimie thiol-ène, laissent supposer que la réticulation du PEG dans les éponges n'est pas totale. Cela peut être justifié par la cinétique lente de la réaction de la chimie thiol-yne additionnée à la gêne stérique causée par le réseau de CS.

Des premières preuves de concept ont été réalisées en intégrant les LNPs dans ces matériaux hybrides CS/PEG. Les résultats sont encourageants. Les premiers tests ont montré que les LNPs ne modifiaient pas les propriétés des films et des éponges. Bien que le processus de préparation des éponges puisse endommager les particules, celles-ci conservent une polydispersité acceptable dans le matériau éponge.

Une étude de la stabilité des LNPs dans les films reste à effectuer pour justifier de l'intérêt du film composite.

En conclusion, l'intégration des LNPs dans les hydrogels a permis la conception de systèmes composites pouvant délivrer un principe actif hydrophobe, et d'ajouter de nouvelles possibilités de moduler la cinétique de libération de la molécule active. Le développement de nouveaux matériaux offre d'intéressantes perspectives. Le travail sur les éponges rend compte de la difficulté à former des hydrogels doubles réseaux homogènes sans utiliser d'agents toxiques dans les réactions de réticulation. Une étude sur la capacité des éponges et des films à délivrer les particules de manière prolongée reste à approfondir.