



**HAL**  
open science

# Biomatériaux pour application chirurgicale : élaboration et fonctionnalisation pour une bioadhésion thermorégulée

Guillaume Conzatti

## ► To cite this version:

Guillaume Conzatti. Biomatériaux pour application chirurgicale : élaboration et fonctionnalisation pour une bioadhésion thermorégulée. Médecine humaine et pathologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2017. Français. NNT : 2017TOU30159 . tel-01938955

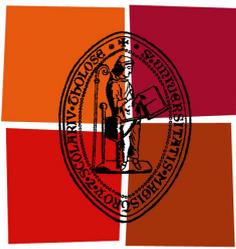
**HAL Id: tel-01938955**

**<https://theses.hal.science/tel-01938955>**

Submitted on 29 Nov 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.



Université  
de Toulouse

# THÈSE

En vue de l'obtention du

**DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE**

Délivré par : *l'Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)*

---

---

Présentée et soutenue le 20 octobre 2017 par :

**GUILLAUME CONZATTI**

**Biomatériaux pour application chirurgicale : Elaboration et  
fonctionnalisation pour une bioadhésion thermorégulée**

---

---

## JURY

MATHIAS DESTARAC	Université Paul Sabatier	Président du Jury
SOPHIE MONGE-DARCOS	Université de Montpellier	Rapporteur
BENJAMIN NOTTELET	Université de Montpellier	Rapporteur
EMMANUEL BELAMIE	Université de Montpellier	Examineur
JÉRÔME TORRISANI	Université Paul Sabatier	Membre invité

---

### École doctorale et spécialité :

*BSB : Biotechnologies, Cancérologie*

### Unité de Recherche :

*CRCT (UMR 1037) / CIRIMAT (UMR 5085)*

### Directeur(s) de Thèse :

*Nicolas CARRERE et Audrey TOURRETTE DIALLO*

### Rapporteurs :

*Sophie MONGE-DARCOS (Université de Montpellier)  
et Benjamin NOTTELET (Université de Montpellier)*



---

# Remerciements

Ce manuscrit de thèse est l'aboutissement de trois années et n'aurait pu être possible sans la participation et le soutien de nombreuses personnes que je souhaite remercier ici.

Ces travaux ont été réalisés sur plusieurs sites, dans les laboratoires du CIRIMAT et du CRCT. Je remercie ainsi les différents directeurs de laboratoire du CIRIMAT Francis Maury et Christophe Laurent ainsi que du CRCT Jean-Jacques Fournié et Gilles Favre pour m'avoir accueilli au sein de leurs laboratoires.

Je tiens à remercier chaleureusement mes directeurs de thèse, Nicolas CARRERE et Audrey TOURRETTE-DIALLO pour m'avoir fait confiance pour ce projet. Vous m'avez offert l'opportunité de travailler sur un projet pluridisciplinaire enrichissant et stimulant. Vos connaissances et vos conseils précieux ont permis de faire avancer ce projet ainsi que de me faire évoluer dans cet univers qu'est la recherche. J'adresserai une mention spéciale pour Audrey qui a cru en moi tout au long de ce projet et qui, grâce à ses encouragements jour après jour, a fait de ces trois années une expérience plus que plaisante.

Mon temps s'étant principalement déroulé au sein du CIRIMAT, je tiens sincèrement à remercier toute l'équipe PPB pour son accueil et sa bonne humeur. Bien entendu, je ne remercierais jamais assez Sandrine Cavalié pour tout son soutien, technique, administratif, commercial et j'en passe. Tu fais tourner l'équipe pharmacie et ce fut un plaisir d'interagir avec toi au jour le jour. Je remercie bien entendu tous les autres membres de l'équipe : Sophie Cazalbou, Fabien Brouillet, Christophe Drouet, Olivier Marsan, Cédric Chavillat, Jérémy Soulié, Ghislaine Bertrand, Sophie Girot-Fullana, Stéphanie Sarda et Christian Rey. Un merci tout particulier pour Christèle Combes qui m'a pris sous son aile ponctuellement et, grâce à ses conseils précieux, permit de finaliser mon premier article. Big-Up à David Grossain qui m'a permis de voler à l'autre bout du monde pour découvrir de nouveaux horizons de recherches et de vivre des expériences personnelles uniques, le tout dans la bonne humeur. J'en profite ainsi pour remercier Bessim Ben-Nissam pour son accueil chaleureux au sein de son équipe à l'Université de Sydney. Vous m'avez tous apporté soutien, conseils et je pense sincèrement que ce fut une chance de passer ma thèse au sein de votre équipe.

Cette bonne humeur je la dois aussi aux autres doctorants. Maëlach, tu étais notre aînée, tu nous as montré la voie, tu m'as refilé un appartement et je suis heureux de t'avoir rencontré. Tu es une personne simple, honnête et agréable. Tu as connu quelques galères et quelques doutes mais tu n'as pas eu peur de prendre des risques : un bel avenir t'attend!

---

Clémentine, tu nous as rejoints par la suite et tu étais de ce fait notre petite sœur. J'espère que nous avons pu t'apporter toute l'aide dont tu avais besoin. Je ne me fais pas de soucis pour la réussite de ton projet : tu verras, ça paraît insurmontable, mais pas après pas on y arrive! Je suis aussi content d'avoir pu partager cette dernière année avec toi : tu es bio, écoresponsable, autosuffisante, et même si tu n'es pas locale je t'accorde le label « Demeter ». Bien entendu, le prix du public revient à Sylvain. Nous avons commencé notre thèse ensemble, et nous la finissons (presque) ensemble. Nous avons partagé les mêmes étapes, galères et fou-rires. Cette thèse n'aurait pas eu la même saveur sans toi et, malgré ton côté sauvage, tu mérites à être connu. Nonobstant tes doutes, je suis persuadé que tu es un bon scientifique. Lorsque tu ouvriras ton école, n'oublie pas de m'appeler!!!

Il convient de remercier chaudement l'équipe d'accueil du CRCT, notamment Pierre Cordelier, chef d'équipe, et Jérôme Torrisani, qui m'ont ouvert les portes de leur laboratoire chaleureusement. Jérôme, tu as pris le temps de me former à la culture cellulaire, tu m'as aidé à mettre en place des expériences délicates et tu as consenti à passer quelques débuts de soirée avec moi au microscope. La caractérisation biologique était une étape importante pour moi et ma formation, et je te remercie sincèrement de l'avoir permis.

Bien entendu, je remercie toutes les personnes qui m'ont apporté conseils, m'ont formé ou m'ont permis de réaliser certaines expériences : Florence Gayet, Nicolas Causset, Barbara, Pascale. Un certain nombre de manipulations n'aurait pu être fait, ou du moins pas dans les temps, sans votre aide. Votre concours aura été enrichissant.

Il ne serait pas juste de ne pas mentionner les différents stagiaires qui ont participé à ce projet. Jason (ou plutôt "Jaysonne"), tu as été le premier. Malgré mes errances tu as su m'épauler efficacement. Ton travail détendu mais sérieux a mis sur les rails une bonne partie de ce projet. Déborah, tu fus la seconde. Tu as effectué un travail important, de qualité et, tu le sais, je suis très content d'avoir pu t'encadrer pendant ton stage. Ta contribution a été indispensable à ce projet et j'espère que tu finiras par faire une thèse, tu serais plus que douée!

J'adresse enfin toutes mes salutations aux membres du jury qui ont accepté de consacrer leur temps à l'évaluation de ce travail. Ainsi, je remercie Sophie Monge-Darcos et Benjamin Nottelet qui ont accepté la lourde tâche de rapporteur, de même que Mathias Destarac, président du jury, et Emmanuel Belamie, examinateur. Vos remarques seront sans nul doute un plus pour la suite de ce projet ainsi que pour mes futurs travaux. Je vous remercie de la bienveillance et du sérieux que vous avez apporté à l'appréciation de ma thèse. C'est certes avec appréhension mais surtout avec plaisir que j'ai partagé cette fin de thèse avec vous.

La thèse n'est que l'aboutissement de longues études et j'adresse un grand merci à toute ma famille pour m'avoir permis de les réaliser. Ce fut long, mais nous sommes arrivés au bout, et c'est grâce à vous. Vous êtes venu assister à la soutenance et m'épauler pour son organisation et m'avez mis à l'aise pour affronter ce moment fatidique.

Je finirais par remercier ma Belle Chérie, qui m'a soutenu et encouragé tout au long

---

de cette thèse. Tu m'as supporté lors des phases difficiles sans (trop) rechigner, tu m'as motivé, m'as écouté, parfois conseillé et je suis heureux de t'avoir rencontré. Ce n'est que le début de l'aventure et j'espère la poursuivre avec toi pour un moment!



# Table des matières

<b>Table des matières</b>	<b>vii</b>
<b>Liste des figures</b>	<b>ix</b>
<b>Liste des tableaux</b>	<b>xv</b>
<b>Liste des acronymes</b>	<b>1</b>
<b>Introduction générale</b>	<b>5</b>
<b>1 Contexte scientifique et réglementaire</b>	<b>9</b>
1.1 Contexte médical . . . . .	10
1.2 La matrice absorbante . . . . .	18
1.3 Biologie cellulaire, bioadhésion et surfaces . . . . .	24
1.4 Modification de surface et bioadhésion thermorégulée . . . . .	31
1.5 Réglementation des dispositifs médicaux . . . . .	47
1.6 Développement du biomatériau pour application chirurgicale : vers la mise en œuvre . . . . .	55
Références . . . . .	56
<b>2 Optimisation et caractérisations physico-chimiques de la matrice absorbante</b>	<b>75</b>
2.1 Introduction . . . . .	75
2.2 Caractérisation des biopolymères . . . . .	76
2.3 Formation du complexe polyélectrolyte avant sa mise en forme . . . . .	86
2.4 Mise en forme des films : influence du séchage sur les propriétés physico- chimiques de la matrice absorbante . . . . .	92
2.5 Vers la compréhension des xérogels . . . . .	109
2.6 Conclusion . . . . .	121
Références . . . . .	121
<b>3 Modification chimique pour une bioadhésion thermorégulée</b>	<b>129</b>
3.1 Introduction . . . . .	129
3.2 Synthèse de PNIPAM fonctionnalisé : contrôle de la longueur de chaîne . . .	132
3.3 Modifications chimiques . . . . .	145

3.4 Conclusion . . . . .	181
Références . . . . .	182
<b>4 Propriétés de surface : influence du greffage de PNIPAM</b>	<b>189</b>
4.1 Introduction . . . . .	189
4.2 Etudes <i>in vitro</i> . . . . .	191
4.3 Vers l'adhésion de surface . . . . .	196
4.4 Conclusion . . . . .	203
Références . . . . .	204
<b>5 Matériel et méthodes</b>	<b>207</b>
5.1 Introduction . . . . .	208
5.2 Chapitre 2 . . . . .	208
5.3 Chapitre 3 . . . . .	216
5.4 Chapitre 4 . . . . .	223
Références . . . . .	228
<b>Conclusion générale</b>	<b>229</b>
<b>Publications associées</b>	<b>233</b>
<b>Glossaire</b>	<b>I</b>

## Liste des figures

1.1	Structure classique d'un épithélium reposant sur un tissu conjonctif. . . . .	11
1.2	Le pancréas : morphologie et place dans la cavité abdominale. . . . .	12
1.3	Représentation schématique du pancréas. . . . .	12
1.4	Pancréatectomie : exemple de la DPC. . . . .	14
1.5	Après ablation et sutures, un pansement pourrait être utilisé afin de prévenir les fuites pancréatiques. . . . .	16
1.6	Structure proposée pour le pansement chirurgical. . . . .	18
1.7	Structure de l'alginate. . . . .	19
1.8	Chaînes d'alginate réticulées selon le modèle «boite d'œufs». . . . .	20
1.9	Structure du chitosane. . . . .	21
1.10	Formation des PECs. . . . .	23
1.11	La structure d'adhésion d'une cellule. . . . .	25
1.12	Les différentes phases de l'adhésion cellulaire et fibroblaste adhérent sur une surface synthétique. . . . .	26
1.13	Structure en peigne ou en champignon en fonction de la distance entre les chaînes de polymères (L) et du rayon de giration ( $R_g$ ). . . . .	27
1.14	Principe simplifié de la pince optique. . . . .	30
1.15	Structure en peigne d'un polymère greffé sur une surface. . . . .	32
1.16	Trois types d'interactions protéines/substrats sont possibles. . . . .	33
1.17	Principe de la NMP. . . . .	35
1.18	Les deux différentes stratégies permettant d'obtenir une structure en peigne. . . . .	35
1.19	Mécanismes d'ATRP avancées catalysés par le couple Cu(I)/Cu(II). . . . .	36
1.20	Mécanisme de la polymérisation RAFT. . . . .	40
1.21	Structure du PNIPAM. . . . .	43
1.22	Récapitulatif indicatif des règles d'attribution construit à partir de l'annexe VIII du Règlement 2017/745 relatif aux dispositifs médicaux. . . . .	50
1.23	Structure proposée pour l'élaboration du pansement chirurgical. . . . .	55
2.1	Structure du biomatériau étudié dans cette thèse. . . . .	76
2.2	Principe de la viscosimétrie capillaire. . . . .	78
2.3	Etude viscosimétrique (viscosimétrie capillaire) de gels d'alginate. . . . .	79

2.4	Etude rhéologique (rotation cône/plan) de gels d'alginate. . . . .	80
2.5	Conformations possibles de l'alginate et leurs attributions en RMN. . . . .	81
2.6	Etudes rhéologiques de gels de chitosane. . . . .	83
2.7	Spectre infrarouge (ATR-FTIR) du chitosane. . . . .	84
2.8	La structure du chitosane avec la numérotation des carbones et leurs assignations en RMN. . . . .	85
2.9	Principe de l'analyse de texture. . . . .	86
2.10	Courbe type d'une analyse de texture. . . . .	87
2.11	Courbes de textures de l'alginate, du chitosane et des PECs, avant et après passage à l'UT. . . . .	88
2.12	Plasticité, consistance et adhésivité des gels d'alginate, de chitosane et des PECs, avant et après passage à l'UT. . . . .	89
2.13	Structure d'un PEC en cœur/coquille ou pelote en fonction du ratio de charge net $K_{(-/+)}$ . . . . .	90
2.14	Contrainte de compression de PECs (PEC-UT) en fonction du temps de réticulation par une solution de $CaCl_2$ à 1 % m/v. . . . .	91
2.15	Les trois matériaux obtenus : Xéro, Lyoph et SCC-Mat. . . . .	94
2.16	Images MEB des sections transversales du Xéro, Lyoph et SCC-Mat. . . . .	94
2.17	Diagramme de phase pression/température du $CO_2$ . . . . .	95
2.18	Isothermes d'adsorption et de désorption des Lyoph et SCC-Mat. . . . .	97
2.19	Tracés BET permettant la détermination de la constante $C_{BET}$ . . . . .	98
2.20	Pourcentages de gonflement dans l'eau des xérogels, lyophilisats et SCC-Mat en termes de masse et volume après 24 H. . . . .	100
2.21	Influence du médium sur les taux de gonflement. . . . .	101
2.22	Spectres ATR-FTIR de Xéro, Lyoph et SCC-Mat après différents traitements. . . . .	103
2.23	Pourcentages de gonflement et de dégradation dans un milieu pancréatique simulé. . . . .	105
2.24	Cinétiques de libération d'éosine en pourcentage d'éosine incorporée. . . . .	107
2.25	Tracés logarithmiques des cinétiques de libération d'éosine et leurs régressions linéaires. . . . .	108
2.26	Film PEC (xérogel) avant décollage de sa boîte de Pétri. . . . .	110
2.27	Images AFM de la face inférieure, en contact avec la boîte de Pétri et supérieure d'un PEC. . . . .	111
2.28	Structures chimiques de l'alginate et du chitosane. . . . .	111
2.29	Spectres FTIR de films de chitosane après différents traitements basiques. . . . .	114
2.30	Spectres FTIR de films d'alginate non réticulés et réticulés au $CaCl_2$ après différents traitements acides. . . . .	115
2.31	Spectres FTIR de films PECs non réticulés et réticulés au $CaCl_2$ après différents traitements acides et basiques. . . . .	117

2.32 Spectres FTIR de films PECs réticulés traités 1 h dans H <sub>2</sub> O, HCl pH 2,5 puis trempé dans DMSO pendant 3 h. . . . .	119
2.33 Modèle du comportement des matrices PECs lors de différents traitements. . . . .	120
3.1 Structure du biomatériau étudié dans cette thèse. . . . .	130
3.2 Micrographies MEB et spectres FTIR de PECs-PNIPAM élaborés par «dip coating». . . . .	131
3.3 Stratégies de greffage chimique du PNIPAM sur la surface des PECs. . . . .	132
3.4 Rappel du mécanisme de la polymérisation RAFT, développé dans la section 1.4.2.2. . . . .	133
3.5 Polymérisation RAFT du PNIPAM. . . . .	134
3.6 Suivi cinétique d'une polymérisation RAFT dans le THF. . . . .	137
3.7 Analyse par SEC d'un polymère obtenu dans le THF ( $M_{n_{th}} = 25\ 000$ ). . . . .	139
3.8 Analyse par SEC d'un polymère obtenu dans le THF ( $M_{n_{th}} = 60\ 000$ ). . . . .	141
3.9 Dosages pH-métrique du PNIPAM polymérisé par RAFT. . . . .	142
3.10 Spectroscopie RMN du PNIPAM polymérisé par RAFT. . . . .	144
3.11 Stratégie d'élaboration de la modification de surface. . . . .	145
3.12 Réaction d'amidification entre un acide carboxylique et une amine. . . . .	146
3.13 Synthèse biochimique des polypeptides par amidification. . . . .	147
3.14 Structure chimique d'un halogénure d'acyle. . . . .	147
3.15 Mécanisme d'action du chlorure de thionyle sur l'acide carboxylique. . . . .	148
3.16 Formation de l'amide par action du chlorure d'acyle sur l'amine. . . . .	148
3.17 Mécanisme d'action du CDI. . . . .	149
3.18 Schéma réactionnel du couplage NHS/EDC. . . . .	151
3.19 Greffage du PNIPAM sur des gels d'alginate et de chitosane via la formation d'amides. . . . .	153
3.20 Modification chimique du chitosane par du PNIPAM-COOH ( $M_n = 5000$ ) via amidification NHS/EDC. . . . .	154
3.21 Spectres FTIR du gel de chitosane initial, du PNIPAM et des gels modifiés dans l'eau, un tampon et du DMSO. . . . .	155
3.22 A gauche, un gel greffé PNIPAM à température ambiante et, à droite, chauffé à 50 °C. . . . .	156
3.23 Etude spectroscopique de l'absorbance des différents gels de chitosane greffés, en dessous et au-dessus de la LCST du PNIPAM. . . . .	156
3.24 Modification chimique des gels d'alginate. . . . .	157
3.25 Spectres FTIR des gels d'alginate modifiés dans l'eau. . . . .	159
3.26 Spectres FTIR des gels d'alginate modifiés dans un tampon comparé à la réaction faite dans l'eau. . . . .	160
3.27 Spectres FTIR des gels d'alginate modifiés dans du DMSO comparé à la réaction faite dans l'eau. . . . .	161

3.28 Etude spectroscopique de l'absorbance des différents gels d'alginate modifiés, en dessous et au-dessus de la LCST du PNIPAM. . . . .	163
3.29 Structures chimiques de EDC, NHS et CDI. . . . .	163
3.30 Stratégie de greffage de PNIPAM-NH <sub>2</sub> sur des films d'alginate. . . . .	164
3.31 Conditifions de réactions, hypothèses et spectres XPS des films d'alginate initiaux et modifiés via NHS/EDC. . . . .	167
3.32 Conditifions de réactions, hypothèses et spectres XPS des films d'alginate initiaux et modifiés via CDI. . . . .	168
3.33 Stratégie générale du greffage du PNIPAM-COOH sur les matrices PECs composées d'alginate/chitosane par amidification. . . . .	170
3.34 Schéma réactionnel de la première série de modifications de surface, avec les différents paramètres étudiés. . . . .	171
3.35 Pontage de la diamine entre deux fonctions carboxyliques de l'alginate. . . . .	175
3.36 Greffage du PNIPAM-COOH sur les matrices PECs composées d'alginate et chitosane par amidification. . . . .	176
3.37 Spectroscopies XPS des échantillons avant et après greffage de PNIPAM-COOH, avec ou sans diamine. . . . .	178
3.38 Libération d'éosine, en pourcentage d'éosine incorporée, en fonction du temps, à 37 °C, avant et après modification de surface. . . . .	181
4.1 Stratégies de greffage du PNIPAM sur les surfaces PECS. . . . .	190
4.2 Quantification, en pourcentage, du nombre de cellules hPNE après 4 jours de culture en présence d'un biomatériau comparé à un contrôle, sans biomatériau. . . . .	191
4.3 Microscopie à fluorescence des surfaces, après culture pendant 8 H et rinçage. . . . .	193
4.4 Quantification en nombre de cellules par unité de surface à deux températures. . . . .	194
4.5 Angle de contact, à 25 °C, d'une goutte d'eau sur les PECs avant et après modification. . . . .	196
4.6 Caractérisation des surfaces modèles avec l'angle de goutte d'eau sur les différentes surfaces modèles, à 25 °C, et les micrographies MEB des surfaces associées. . . . .	198
4.7 Mesure de l'adhérence entre des surfaces modèles et les PECs, à 25 °C et 40 °C, sans et avec modifications de surface. . . . .	199
4.8 A droite, un foie et, à gauche, un pancréas de porc. . . . .	202
4.9 Mesure de l'adhérence, <i>ex vivo</i> , entre des tissus et les PECs, à 25 °C et 40 °C, avant et après modification. . . . .	202
5.1 Courbe d'étalonnage de l'absorbance ( $\lambda = 517$ nm) réalisée pour la détermination de la concentration d'éosine dans PBS. . . . .	215

5.2 Spectres RMN 1 H du NIPAM et d'un aliquot prélevé lors d'une polymérisation (mélange de NIPAM et PNIPAM). . . . .	222
5.3 Etapes du traitement d'image pour le comptage cellulaire. . . . .	227



# Liste des tableaux

1.1	Critère de gradation des fistules comme défini par l'ISGPF . . . . .	15
1.2	Exemples de modifications de surfaces par greffage de PNIPAM via les procédés ATRP ou RAFT. . . . .	39
1.3	Grades de réactivité (réaction cellulaire) pour les tests de diffusion ou par contact direct. . . . .	55
2.1	Les différentes fractions de l'alginate, déterminées par RMN. . . . .	82
2.2	Caractéristique de l'alginate et du chitosane utilisés. . . . .	85
2.3	Conditions utilisées pour le séchage des PECs. . . . .	93
2.4	Propriétés structurales des matériaux. . . . .	96
2.5	Module de stockage ( $E'$ ), de perte ( $E''$ ) et $\tan \delta$ de Lyoph et SCC-Mat à 37 °C. . . . .	100
2.6	Les différents milieux de gonflement utilisés : pH et concentration en ions $\text{Na}^+$ . . . . .	102
2.7	Ratios Ca/Na mesurés par EDX à la surface de Xero, Lyoph et SCC-Mat après 24 H dans différents milieux. . . . .	104
2.8	Compositions atomiques, en pourcentages, de différents films déterminées par XPS. . . . .	111
2.9	Solutions utilisées pour l'étude de l'influence du pH sur les films d'alginate, de chitosane et de PECs. . . . .	112
3.1	Paramètres d'élaboration de la matrice absorbante. . . . .	129
3.2	Polymérisation du NIPAM dans différents solvants. . . . .	134
3.3	Données cinétiques concernant la polymérisation du NIPAM dans différents solvants. . . . .	135
3.4	Conditions expérimentales utilisées pour la polymérisation du NIPAM dans le THF . . . . .	139
3.5	Résultats de la polymérisation du PNIPAM réalisée dans différentes conditions, en visant 25 000 g/mol. . . . .	140
3.6	Résultats de la polymérisation du PNIPAM réalisée dans différentes conditions, en visant 60 000 g/mol. . . . .	141
3.7	Détermination du nombre d'acides carboxyliques par chaîne de PNIPAM ( $\text{COOH}/\text{PNI}$ ) à partir de la quantité de soude à l'équivalence $n_{eq}$ . . . . .	143

---

3.8	Exemples de l'utilisation du CDI sur des polysaccharides. . . . .	150
3.9	Exemples de l'utilisation du couple NHS/EDC. . . . .	152
3.10	Conditions expérimentales pour le greffage de PNIPAM-COOH sur des gels de chitosane, dans différents solvants. . . . .	154
3.11	Première étape : conditions expérimentales pour le greffage de la diamine sur des gels d'alginate pour former Alg-NH <sub>2</sub> , dans différents solvants. . . . .	158
3.12	Deuxième étape : conditions expérimentales pour le greffage du PNIPAM-COOH sur des gels Alg-NH <sub>2</sub> , dans différents solvants pour former Alg-PNI. . . . .	158
3.13	Conditions expérimentales pour le greffage du PNIPAM-NH <sub>2</sub> sur des films d'alginate. . . . .	165
3.14	Compositions atomiques, en pourcentages, mesurées par XPS. . . . .	165
3.15	Environnements chimiques du carbone (C1s) des films d'alginate . . . . .	169
3.16	Première étape : conditions expérimentales pour le greffage de la diamine sur les surfaces PECs. . . . .	172
3.17	Deuxième étape : conditions expérimentales pour le greffage du PNIPAM-COOH (M <sub>n</sub> = 5 000 g/mol) sur les surfaces PECs. . . . .	172
3.18	Compositions atomiques, en pourcentages, mesurées par XPS. . . . .	173
3.19	Conditions expérimentales pour le greffage de l'EDA sur les surfaces PECs. . . . .	176
3.20	Conditions expérimentales pour le greffage du PNIPAM-COOH sur les surfaces PECs aminées (PEC-EDA) ou non. . . . .	177
4.1	Dénomination des échantillons. . . . .	190
5.1	Solutions utilisées pour l'étude de l'influence du pH sur les films d'alginate, de chitosane et de PECs. . . . .	216
5.2	Conditions expérimentales pour le greffage de l'EDA sur les surfaces PECs. . . . .	224
5.3	Conditions expérimentales pour le greffage du PNIPAM-COOH sur les surfaces PECs aminées ou non. . . . .	224

# Liste des acronymes

- ACVA** *acide 4,4'-Azobis(4-cyanopentanoïque)*. 38
- AFM** *microscopie à force atomique*. 29, 42, 44, 110, 204
- AGET-ATRP** *ATRP générée par transfert d'électron*. 37
- AIBN** *azobisisobutyronitrile*. 38
- AMD** *analyse mécanique dynamique*. 99, 101
- AMFC** *ampérométrie avec microélectrode en fibre de carbone*. 29, 43
- ARGET-ATRP** *ATRP régénérée par transfert d'électron*. 37
- ASB** *albumine de sérum bovin*. 44
- ASH** *albumine de sérum humain*. 46, 47
- ATR-IRTF** *réflectance totale atténuée*. 43
- ATRP** *atom rransfert radical polymerization*. 34, 36–38, 40, 45
- BET** *Brunauer, Emmett et Teller*. 97, 100, 106
- BIBB**  *$\alpha$ -Bromoisobutyryl bromide*. 37, 38
- CDI** *1,1'-carbonyldiimidazole*. 147, 149
- CES** *chromatographie d'exclusion stérique*. 41, 77, 135, 140
- CTA** *agent de transfert de chaîne, aussi appelé agent RAFT*. 40, 41, 133–136, 138–140, 143, 181
- DA** *degré d'acétylation*. 22, 24, 82–84, 90, 92, 121
- DMF** *diméthylformamide*. 39
- DP** *degré de polymérisation*. Voir glossaire : *degré de polymérisation*
- DPC** *duodéno pancréatectomies céphaliques*. 13, 14
- EDA** *éthylènediamine*. 153
- EDC** *1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide*. 32, 147, 149
- EDX** *analyse dispersive en énergie*. 102
- FC** *feuillet cellulaire*. 31, 45, 47

- FP** *fistule pancréatique*. 10, 14, 15, 104, 130
- FPH** *fibroblaste de prépuce humain*. 26, 45
- FTIR** *infrarouge à transformée de Fourier*. 41, 42, 83, 84, 118
- HDA** *1,6-hexanediamine*. 153
- IP** *indice de polydispersité*. 34, 40, 133, 135, 136, 138, 140–143, 181, *Voir glossaire : indice de polydispersité*
- ISGPF** *international study group of PF*. 14
- LCST** *"Lower Critical Solution Temperature" (ou, en français, température critique inférieure de solubilité)*. 31, 44–47, 130, 155, 156, 162, 192, 197, 198, 200, 201, 203, 204
- MEB** *microscopie électronique à balayage*. 26, 97, 197, 200
- MEC** *matrice extra cellulaire*. 10, 11, 24–26, 28, 33, 45
- MES** *acide 2-(N-morpholino)éthanesulfonique*. 154
- NHS** *N-hydroxysuccinimide*. 32, 147, 149
- NIPAM** *N-isopropylacrylamide*. 40, 132, 133, 181
- NMP** *nitroxide mediated polymerization*. 34, 36, 38
- PBS** *tampon phosphate salin*. 154
- PCL** *poly( $\epsilon$ -caprolactone)*. 39
- PEC** *complexe polyélectrolyte*. 18, 23, 24, 55, 56, 76, 84, 86–89, 91–94, 96, 98–102, 104, 106, 108–112, 116, 118–121, 130–133, 138, 139, 142, 145, 146, 149–151, 153, 157, 164, 169–172, 174–177, 179–182, 189, 194–198, 200, 201, 203, 204
- PEG** *polyéthylène glycol*. 26, 27
- PEGMA** *poly(ethylene glycol) monomethacrylate*. 45
- PET** *polyéthylène téréphtalate*. 39
- PIS** *polymérisation initié en surface*. 28, 35, 36
- PLA** *acide polylactique*. 28, 30
- PMMA** *polyméthylméthacrylate*. 28
- PNIPAM** *poly(N-isopropylacrylamide)*. 29, 31–34, 38, 40–47, 130–134, 138, 139, 142–145, 150, 151, 155–157, 161, 162, 164, 166–170, 172, 175–177, 179–181, 189–192, 194, 195, 197, 198, 200, 201, 203, 204
- PP** *pancréatine porcine*. 104
- PRC** *polymérisation radicalaire contrôlée*. 32, 34
- PS** *polystyrène*. 45

- RAFT** *polymérisation radicalaire contrôlée par transfert de chaîne réversible par addition-fragmentation.* [34](#), [36](#), [38](#), [40](#), [41](#), [132–134](#), [136](#), [138–140](#), [142](#), [145](#), [181](#), [182](#), [191](#)
- RGD** *Arginylglycylaspartic acid, contraction de L-arginine, glycine, et acide L-aspartique.* [21](#), [25](#)
- RMN** *résonance magnétique nucléaire.* [41](#), [80](#), [83](#), [84](#), [136](#)
- SCC** *CO<sub>2</sub> supercritique.* [92](#), [93](#), [95](#), [101](#)
- SI-ATRP** *ATRP initiée en surface).* [38](#), [45](#), [46](#)
- SIMS** *spectrométrie de masse à ionisation secondaire.* [43](#)
- SI-RAFT** *RAFT initiée en surface.* [40](#), [41](#), [45](#)
- SPR** *résonance des plasmons de surface.* [42](#)
- TA** *température ambiante.* [40](#)
- XPS** *spectrométrie photoélectronique X.* [43](#), [110](#), [145](#), [163](#), [165](#), [166](#), [168](#), [172](#), [177](#), [179](#), [180](#), [195](#), [197](#), [198](#)
- XRR** *réflectométrie des rayons X.* [42](#)



# Introduction générale

Bien que l'espérance de vie humaine ne cesse d'augmenter ces dernières années, le cancer se présente toujours comme un enjeu bien actuel pour la société civile. La mortalité des cancers est toutefois variable, en fonction de la localisation de la tumeur et de la précocité du diagnostic.

Au sein de l'Union européenne, il a été estimé en 2012 qu'un quart des décès de causes cancéreuses était lié au cancer du pancréas. Si l'on considère que l'incidence de ce type de cancer est en augmentation, le traitement des tumeurs pancréatiques se pose comme une problématique non négligeable dans l'amélioration de la prise en charge médicale.

Difficile à diagnostiquer, le cancer du pancréas peut toutefois être traité par chirurgie digestive : il convient alors d'exciser la partie tumorale de l'organe. Le pancréas est cependant une glande primordiale impliquée dans différents rôles biologiques comme la régulation de la glycémie ou la digestion. L'exérèse s'accompagne ainsi nécessairement du maintien en activité de l'organe. La suture du moignon pancréatique, ou encore l'anastomose pancréatico-digestive (connexion entre le pancréas et l'estomac, dans le but de reconstruire la continuité digestive) font donc partie intégrante du traitement. Comme pour toute opération chirurgicale, un risque pour le patient est présent bien que le taux de mortalité reste relativement bas (5 %). Toutefois, les complications sont fréquentes et, même si elles n'entraînent pas systématiquement la mort, celles-ci alourdissent grandement le traumatisme subi par le patient. Parmi ces complications, les fistules pancréatiques sont majoritaires avec une incidence pouvant atteindre 30 %. Ces fistules induisent la fuite de liquide pancréatique, riche en enzymes digestives, au travers des sutures chirurgicales : les dégâts causés peuvent alors être conséquents avec des risques de complications infectieuses ou hémorragiques.

Ce travail de thèse ne porte pas sur le traitement du cancer à proprement parler mais se propose de tenter de nouvelles approches pour apporter un soutien à la chirurgie pancréatique. La prévention des fistules par le biais de l'utilisation d'un dispositif médical sous forme de matrice absorbante, implantée au contact de l'organe et capable de limiter les fuites enzymatiques, se pose comme une solution intéressante.

En plus de capacités absorbantes, le matériau doit être résistant aux enzymes digestives sécrétées par le pancréas, tout en se dégradant lentement au cours du temps puisque une seconde intervention chirurgicale consistant à retirer le dispositif serait lourde pour le patient.

Il semble évident que l'approche nécessaire à l'élaboration et à la validation d'un dispositif médical impose diverses conditions quant à l'innocuité des matériaux utilisés. Le choix de ces matériaux et des techniques d'élaboration est donc restreint; une thèse précédente a permis d'identifier des matériaux biosourcés prometteurs, à savoir l'alginate et le chitosane [1].

Ces deux polymères disposent chacun de leurs caractéristiques propres et peuvent être combinés sous forme de complexes polyélectrolytes, c'est-à-dire un mélange intime des deux polymères, pour constituer la matrice absorbante. Il a déjà été montré que le ratio des polymères pouvait entre autres avoir un impact sur les propriétés physico-chimiques obtenues [2]. Le contrôle de la structure et notamment de la porosité de la matrice, point clef des propriétés d'absorption, reste cependant à étudier. Ce travail porte donc dans un premier temps sur l'optimisation de l'élaboration de cette matrice par l'étude de l'amélioration du procédé de préparation afin de prendre en compte les autres propriétés d'usage, à savoir la résistance aux enzymes pancréatiques et la cinétique de libération d'actif [3]. De plus, la pose aisée de la matrice absorbante est un critère majeur. Une adhésion contrôlée à l'organe permettrait de maîtriser la pose du dispositif : lors de l'opération, un matériau peu adhésif faciliterait une pose optimale tandis qu'une adhésion postopératoire assurerait le maintien sécurisé du dispositif.

Les connaissances actuelles en science des matériaux offrent une large gamme de fonctionnalités sensibles à des stimuli extérieurs : on parle de matériaux « intelligents ». Parmi les disponibilités et au vu de l'application visée, le développement d'un matériau répondant à une variation de température semble cohérent. En effet, pendant l'opération, la température du corps se trouve être inférieure à la température corporelle habituelle de 37 °C. Le poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM) est un polymère possédant des propriétés thermosensibles, avec une température de transition intéressante pour cette application. De nature hydrophile à basse température, il devient hydrophobe au-delà de 32 °C. Il est connu dans la littérature scientifique que, lorsque du PNIPAM est disposé à la surface de matériaux, ces changements de propriétés ont un impact sur les interactions surface du matériau/cellules vivantes, notamment en termes de (bio)adhésion.

Il paraît donc judicieux d'envisager le greffage du PNIPAM à la surface de la matrice absorbante afin de lui conférer des propriétés de bioadhésion thermocontrôlée. Les phénomènes liés à la bioadhésion sont cependant complexes et encore mal connus. Certains facteurs impactants sur les interactions matériaux/cellules sont toutefois identifiés : l'hydrophilicité de surface du matériau, son élasticité ou encore plus généralement sa composition chimique. Dans tous les cas, les phénomènes de bioadhésion sont liés à des interactions spécifiques entre les cellules et des protéines présentes dans le milieu extracellulaire. Dans le cas de matériaux recouverts de PNIPAM, la taille des chaînes du PNIPAM ainsi que sa densité en surface sont des paramètres clefs pour obtenir une bioadhésion thermocontrôlée. **Le principal défi de ce projet de thèse consiste à étudier si la fonctionnalisation en surface du biomatériau par du PNIPAM permettra une bioadhésion**

**thermorégulée à l'organe.** C'est donc sur l'hypothèse que les propriétés d'adhésion cellulaire contrôlées en fonction de la température pourraient être transférées à un organe tel que le pancréas que repose ce travail.

Ce projet s'articule donc autour de trois axes. Dans un premier temps, il s'agit d'optimiser et de comprendre les matériaux absorbants composés d'un complexe polyélectrolyte à base d'alginate et de chitosane. La modification de surface, c'est-à-dire le greffage du PNIPAM sur ces matériaux, doit ensuite être maîtrisée afin d'apporter des propriétés de surface contrôlées. Enfin, les propriétés des surfaces obtenues, et notamment la bioadhésion, sont étudiées.

La compréhension des enjeux applicatifs, le choix des matériaux utilisés et une mise au point des connaissances actuelles en termes de bioadhésion sont les éléments de départ de ce projet. Avant de s'attarder sur les résultats expérimentaux, un état de l'art tente donc de mettre en exergue les différents aspects impliqués tout au long de ce travail (Chapitre 1) [4].

Le deuxième chapitre porte quant à lui sur l'étude et l'optimisation de la matrice absorbante, à base d'alginate et de chitosane. Entre autres, différents procédés de séchage sont comparés pour observer l'influence sur les propriétés physico-chimiques des matériaux obtenus (Chapitre 2).

Le troisième chapitre s'attarde sur la modification de surface à proprement parler, c'est-à-dire le greffage du PNIPAM sur les matrices d'alginate/chitosane. La synthèse de ce polymère y est présentée et les stratégies menées pour effectuer un greffage efficace à la surface des matrices sont exposées (Chapitre 3).

Dans le quatrième chapitre, les matériaux élaborés à l'issue des chapitres précédents sont étudiés. Il s'agit notamment de s'intéresser aux propriétés de bioadhésion (Chapitre 4).

Bien que l'aspect applicatif du sujet soit fortement présent, ce travail de thèse s'attarde également sur des problématiques plus fondamentales telles que la compréhension des propriétés physico-chimiques des biomatériaux dans différents milieux. Pour ce faire, une description des expériences réalisées est directement décrite dans le texte des différents chapitres. Toutefois, une partie expérimentale plus complète fournit toute information manquante nécessaire à la compréhension (Chapitre 5). Enfin, une liste des acronymes employés est disponible en début de manuscrit tandis qu'un glossaire ainsi que les publications associées à ce travail se trouvent à la fin du manuscrit.

## Références

- [1] M. Castel. *Mise en forme et caractérisation de biomatériaux pour la prévention des fistules pancréatiques après pancréaectomies*. Thèse, Université de Toulouse III - Paul Sabatier, 2017. 6

- [2] M. Castel-Molieres, G. Conzatti, J. Torrisani, A. Rouilly, S. Cavalie, N. Carrere, et A. Tourrette. Influence of Homogenization Technique and Blend Ratio on Chitosan/Alginate Polyelectrolyte Complex Properties. *Journal of Medical and Biological Engineering*, In press, 2017. [6](#)
- [3] G. Conzatti, D. Faucon, M. Castel, F. Ayadi, S. Cavalie, et A. Tourrette. Alginate/chitosan polyelectrolyte complexes : A comparative study of the influence of the drying step on physicochemical properties. *Carbohydrate Polymers*, 172 :142–151, 2017. [6](#)
- [4] G. Conzatti, S. Cavalie, C. Combes, J. Torrisani, N. Carrere, et A. Tourrette. PNIPAM grafted surfaces through ATRP and RAFT polymerization : Chemistry and bioadhesion. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, 151 :143–155, 2017. [7](#)

---

# Chapitre 1

## Contexte scientifique et réglementaire

### Sommaire

---

<b>1.1 Contexte médical</b> . . . . .	<b>10</b>
1.1.1 Rappel : les tissus vivants . . . . .	10
1.1.2 Le pancréas . . . . .	11
1.1.3 Les fistules pancréatiques . . . . .	13
1.1.4 Vers la prévention des fistules : cahier des charges . . . . .	15
<b>1.2 La matrice absorbante</b> . . . . .	<b>18</b>
1.2.1 Alginate . . . . .	18
1.2.2 Chitosane . . . . .	21
1.2.3 Les complexes polyélectrolytes (PEC) . . . . .	23
<b>1.3 Biologie cellulaire, bioadhésion et surfaces</b> . . . . .	<b>24</b>
<b>1.4 Modification de surface et bioadhésion thermorégulée</b> . . . . .	<b>31</b>
1.4.1 Les structures en peigne . . . . .	32
1.4.2 Les méthodes de greffages . . . . .	34
1.4.3 Vers une adhésion thermorégulée : PNIPAM . . . . .	43
<b>1.5 Réglementation des dispositifs médicaux</b> . . . . .	<b>47</b>
1.5.1 Classification . . . . .	48
1.5.2 Mise sur le marché . . . . .	51
1.5.3 Les ISO : une référence sur le plan national et international . . . . .	53
<b>1.6 Développement du biomatériau pour application chirurgicale : vers la mise en œuvre</b> . . . . .	<b>55</b>
<b>Références</b> . . . . .	<b>56</b>

---

La chirurgie dispose aujourd’hui de nombreux outils de hautes technologies. Ces supports lui permettent de diagnostiquer les pathologies de manière précoce. Dans le cas du développement de tumeurs, les technologies actuelles ne permettent toutefois pas de prédire avec une suffisante fiabilité de leurs caractères bénins ou malins lorsque celles-ci se situent au niveau du pancréas.

De ce fait, la chirurgie pancréatique (pancréatectomie) est souvent utilisée de manière préventive. Les complications sont cependant souvent lourdes. Si l'un des enjeux actuels consiste ainsi à développer des outils diagnostiques, la prévention des complications postopératoires est aussi un axe de recherche majeur pour améliorer la prise en charge des patients. Les complications de la chirurgie pancréatiques sont dominées par la *fistule pancréatique* (FP) et ses conséquences : il s'agit d'un écoulement intra-péritonéal postopératoire de liquide pancréatique aux conséquences potentiellement graves voire mortelles (infection, hémorragie).

Afin de répondre à la problématique que posent les fistules, il est important de comprendre les enjeux médicaux concernant les pancréatectomies. En partant de ce contexte, un cahier des charges pourra être défini, dans l'optique de développer un biomatériau préventif face aux FPs.

## 1.1 Contexte médical

L'élaboration d'un biomatériau dans le but de limiter l'impact des FPs lors de pancréatectomies nécessite de comprendre ce qu'est le pancréas et quelles sont les problématiques liées à sa chirurgie. Néanmoins, avant de rentrer dans le détail, il convient de rappeler quelques considérations biologiques fondamentales.

### 1.1.1 Rappel : les tissus vivants [1]

Dans le monde du vivant, les cellules s'organisent ensemble pour former des tissus. L'histologie, la science qui étudie ces tissus, les classe alors en quatre types : épithélial, conjonctif, nerveux et musculaire.

Les tissus épithéliaux peuvent être perçus comme des barrières dont le rôle est de protéger le corps contre toute pénétration externe, notamment par des microbes, virus ou des composés toxiques. La figure 1.1 montre la structure classique d'un épithélium. Les épithélia glandulaires, comme la partie endocrine du pancréas (cf. section 1.1.2), peuvent produire des hormones (p. ex. l'insuline, régulatrice du glucose) ou des protéines (p. ex. la mucine, que l'on retrouve dans les muscles). On reconnaît les tissus épithéliaux par diverses spécificités. On notera ainsi que (1) les cellules de ces tissus sont polaires. En d'autres termes, ces cellules sont orientées avec une partie externe (pôle apical) et une partie interne (pôle basal). Ces deux zones sont différentes dans leur organisation intracellulaire et intercellulaire. Au niveau du pôle basal, on remarque ainsi (2) la présence de ponts intercellulaires qui permettent d'isoler la lame basale de l'environnement extérieur. Cette dernière est (3) connectée à un tissu conjonctif. En fait, la lame basale est accolée à une lame réticulaire, une *matrice extra cellulaire* (MEC) riche en fibres de collagène qui prend part au tissu conjonctif sous-jacent. Pour finir, les épithélia sont (4) avasculaires et (5) ont un pouvoir régénérateur élevé.

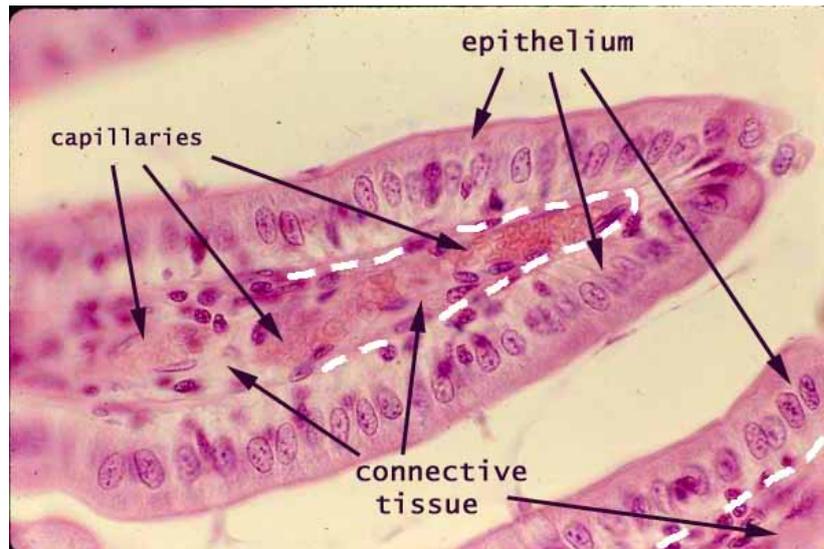


FIGURE 1.1 – Structure classique d'un épithélium reposant sur un tissu conjonctif. En ligne pointillée : la lame basale

Le tissu le plus abondant est le tissu conjonctif, qui représente environ 15 % de la masse du corps humain. Le sang, les os, les cartilages sont autant de tissus conjonctifs, en plus des tissus conjonctifs propres (adipeux ou fibreux). Ces tissus supportent, maintiennent, protègent isolent et transportent les substances nécessaires au fonctionnement cellulaire. Ce sont eux qui fournissent par exemple les nutriments et l'oxygène aux épithélia. Contrairement à ces derniers, les tissus conjonctifs sont principalement composés de MEC dans laquelle les cellules vivent. Le ratio MEC/cellules varie cependant fortement en fonction du tissu considéré, tout comme le degré de vascularisation. Quoi qu'il en soit, dans le cas des tissus conjonctifs propres, les fibroblastes sont les cellules majoritaires. Ils produisent la majeure partie des protéines de la MEC.

Ces deux types de tissu, épithélial et conjonctif, composent le pancréas.

## 1.1.2 Le pancréas

Le pancréas est une glande abdominale d'approximativement 80 g qui joue un rôle important à la fois dans la digestion et la régulation du métabolisme (homéostasie) (figure 1.2). Il est composé de deux parties, endocrine et exocrine (figure 1.3) [2].

### 1.1.2.1 Pancréas endocrine : régulation de la glycémie [3]

La partie endocrine du pancréas joue un rôle dans la régulation du métabolisme, notamment dans la régulation de la glycémie. Les cellules endocrines, groupées dans ce qu'on appelle les îlots de Langerhans, sur la surface externe du pancréas, produisent entre autres l'insuline et le glucagon. Ces deux protéines ont des rôles importants dans la régulation de la glycémie; leurs modes d'action sont variés et complexes. Grossièrement,

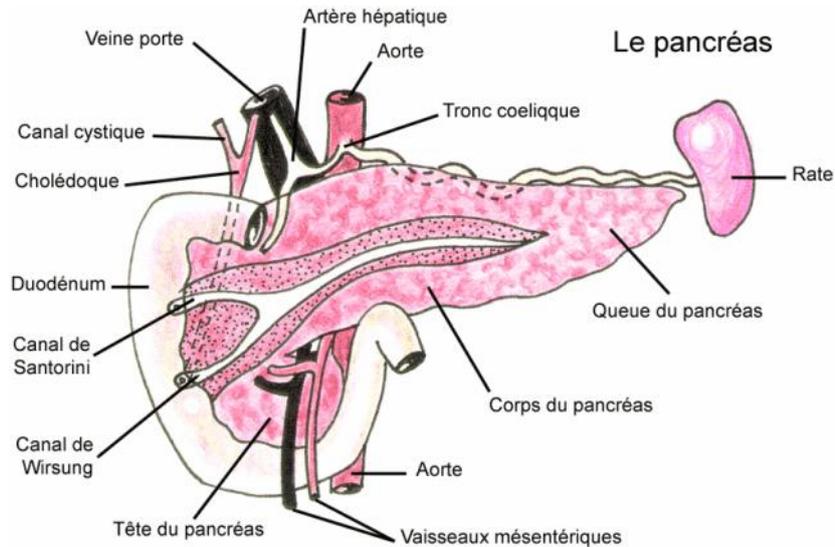


FIGURE 1.2 – Le pancréas : morphologie et place dans la cavité abdominale. Source : blog de «médecin», Le Pancréas, <http://medecin.skyrock.com/551472830-Le-Pancreas.html>

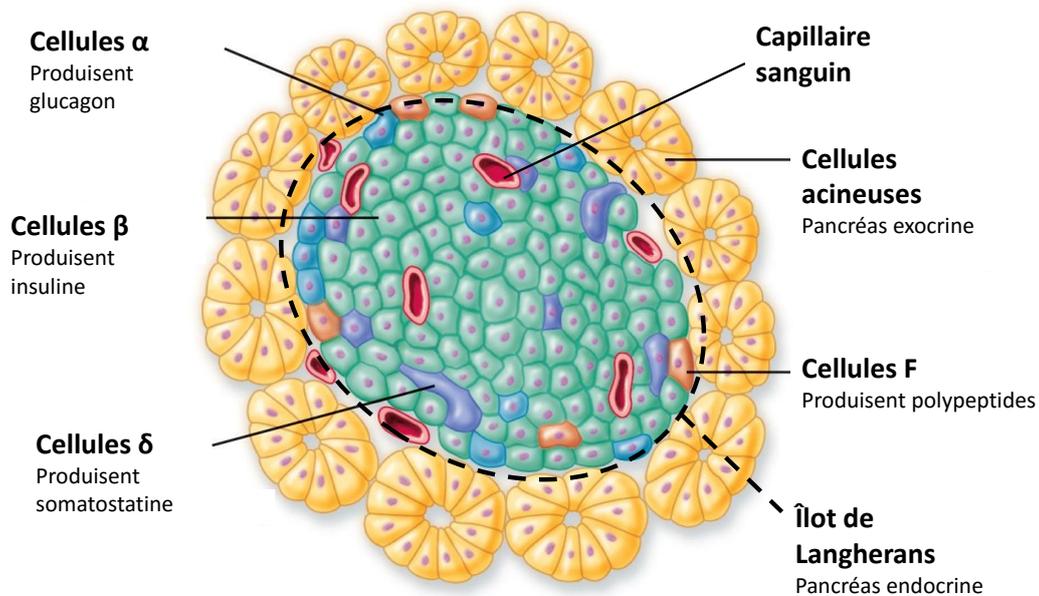


FIGURE 1.3 – Représentation schématique du pancréas. Les cellules acineuses (connectées au canal pancréatique) sont responsables des sécrétions exocrines (digestion) tandis que les îlots de Langherans produisent les sécrétions endocrines (insuline et glucagon, entre autres). Source : R. Droual, cours en ligne, Physiologie, chapitre 6, <http://droualb.faculty.mjc.edu>

l'insuline favorise l'absorption du sucre dans les cellules et inhibe sa production (hypoglycémiant). Le diabète sucré (hyperglycémie) est directement relié à ces phénomènes de régulation. Une baisse d'activité insulinaire est en effet responsable de l'augmentation du glucose dans le sang. Le glucagon quant à lui a pour rôle d'augmenter le taux de sucre (hyperglycémiant) à partir, entre autres, des adipocytes. Le pancréas endocrinien n'est pas relié au tube digestif, contrairement à sa partie exocrine, et ses sécrétions se font directement dans le sang (tissu conjonctif).

### 1.1.2.2 Pancréas exocrine : le jus pancréatique [3, 4]

Le jus pancréatique, une sécrétion exocrine produite par la glande, est un liquide incolore, plus ou moins visqueux en fonction de sa concentration en protéine. Ce jus est produit par les cellules acineuses ainsi que les cellules épithéliales formant la paroi du canal pancréatique. Le volume excrété quotidiennement est compris entre 1 et 2 L. Son pH est légèrement alcalin, de l'ordre de 7 à 8,4. Le jus pancréatique est une solution électrolytique composée principalement de  $\text{Na}^+$  (approximativement  $150 \text{ mEq.L}^{-1}$ ),  $\text{Cl}^-$  et  $\text{HCO}_3^-$ . Le bicarbonate est prépondérant, mais la teneur totale en anion se maintient aux alentours de  $150 \text{ mEq.L}^{-1}$ , afin d'assurer la neutralité électrolytique. La concentration en chlore augmente d'autant plus que la sécrétion est importante.  $\text{HCO}_3^-$  est le principal responsable de l'alcalinité du jus.  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  sont aussi présents, tout comme des composés sulfurés ( $\text{SO}_4^-$ ) et phosphorés ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ). La majorité des protéines présentes sont des enzymes (approximativement 90 %), bien que leur composition ne soit pas constante. Dans le cas des êtres humains, la concentration moyenne en protéines est de l'ordre de  $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ . Les enzymes principales sont la lipase, la trypsine, l'amylase, la chymotrypsine, la collagénase et la ribonucléase.

La partie externe du pancréas est recouverte par un fin tissu conjonctif. Aussi, le pancréas est partiellement recouvert par le péritoine (sa tête, son coup et son corps sont dits rétropéritonéens). Ainsi, des vaisseaux sanguins, adipocytes, fibroblastes ou encore des cellules mésothéliales peuvent être trouvées à la surface du pancréas.

Les fistules pancréatiques consistent en la communication anormale entre le canal pancréatique (par lequel le jus pancréatique est sécrété) et la cavité abdominale, conduisant à des fuites, sources de complications médicales sévères.

### 1.1.3 Les fistules pancréatiques

Lorsqu'une tumeur se développe au niveau du pancréas, la seule option curative est la chirurgie. L'ablation de la partie tumorale du pancréas, ou pancréatectomie (composé du suffixe grec -ektomê signifiant excision) est alors envisageable uniquement dans le cas de diagnostics précoces.<sup>2</sup> La partie tumorale peut se situer à différents endroits et l'on distinguera notamment les tumeurs se situant sur la tête, le corps ou la queue du pancréas (figure 1.2), donnant lieu respectivement à des pancréatectomies dites céphaliques, corporeales ou caudales. La pancréatectomie peut être totale si le pancréas est entièrement retiré ce qui conduit à une absence de production autonome d'insuline et au diabète sucré.

Il est parfois nécessaire d'enlever certains autres organes : le duodénum et la vésicule biliaire sont fréquemment retirés dans le cas des *duodéno pancréatectomies céphaliques (DPC)*, la rate peut parfois être aussi excisée, par exemple pour les spléno pancréatecto-

1.  $\text{mEq} = \text{mmol/valence}$

2. Dans les cas de stades trop avancés, la chimiothérapie est préconisée.

mie corporéo-caudale. Les techniques chirurgicales sont donc nombreuses en fonction de la localisation de la tumeur. Il est aussi nécessaire, dans le cas des DPC, de reconstruire la continuité digestive par anastomose (suture inter organe, figure 1.4) et le choix de la méthode est laissé au chirurgien, selon son jugement et son habitude. Le choix de la technique d'ablation (par exemple la pancreaticogastrostomie, duodéno pancréatectomie ou pancréaticojéjunostomie) ou de la reconstruction a peu d'incidence sur le taux de complications postopératoires (morbidité), oscillant entre 30 et 40 %, pouvant conduire à la mort du patient dans 2 à 5 % des cas. Certains auteurs parlent alors du talon d'Achille de la chirurgie abdominale [5–7].

Parmi les complications postopératoires on retrouve infections, stress gastrique ou encore la FP. Chacune de ces complications entraîne, outre une augmentation de la mortalité, un allongement du temps d'hospitalisation ce qui représente un coût financier et psychologique non négligeable. La FP est le problème le plus fréquent et a un rôle central dans le développement d'autres complications. Elle correspond à une communication anormale entre le canal pancréatique et la cavité péritonéale conduisant à des fuites de jus pancréatique. La définition exacte de la fistule a été, pendant longtemps, subjective et les critères définissant l'apparition ou non de la fistule pouvaient varier selon les études. En conséquence, sur un groupe de patients donné, son incidence pouvait être estimée entre 10 à 30 %, en fonction des définitions choisies [8]. En 2005, un groupe de travail international (l'*international study group of PF (ISGPF)*) composé de 37 chirurgiens de renom a donc défini des critères pouvant servir de référence au diagnostic des FP [9], même si plus récemment des modifications ont été suggérées par certains auteurs [10]. Quoiqu'il en soit, l'*ISGPF* a permis de définir des critères universels tels que, entre autres,

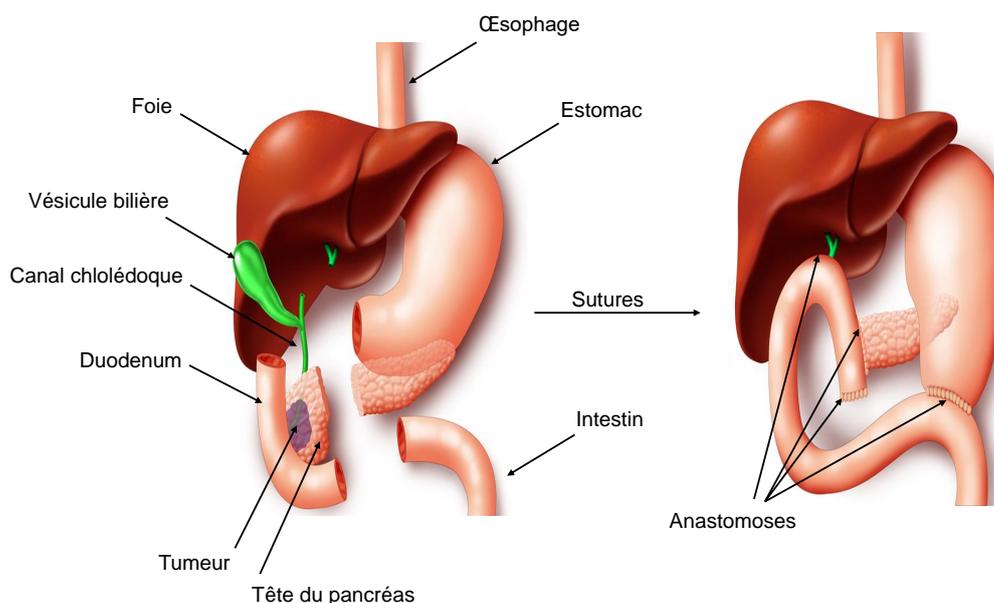


FIGURE 1.4 – Pancréatectomie : exemple de la DPC. Après l'ablation de la partie tumorale, la continuité digestive est reconstruite par l'anastomose entre le pancréas et l'intestin.

le taux d'amylase dans le sérum drainé ou de potentiels signes d'infections, et de grader la gravité de la fistule, de A à C (tableau 1.1). Le terme de fistule est donc défini par la présence de fuites plus ou moins importantes (cette terminologie sera utilisée dans ce manuscrit). Grâce à cette harmonisation des définitions, le taux d'apparition des FP a pu être estimé comme allant de 3 à 30 %, en fonction de la zone de résection.

TABLEAU 1.1 – Critère de gradation des fistules comme défini par l'ISGPE

Critère	Pas de fistule	Grade A	Grade C	Grade D
Taux d'amylase	< 3 fois le taux normal	> 3 fois le taux normal	> 3 fois le taux normal	> 3 fois le taux normal
Condition clinique	Bonne	Bonne	Souvent bonne	Maladie apparue
US/TDM <sup>1</sup>	Négatif	Négatif	Négatif/positif	Positif
Drainage persistant (> 3 semaines)	Non	Non	Souvent oui	Oui
Signes d'infection	Non	Non	Oui	Oui
Réadmission	Non	Non	Oui/non	Oui/non
Sepsis	Non	Non	Non	Oui
Ré-opération	Non	Non	Non	Oui
Mort reliée à la fistule	Non	Non	Non	Oui

<sup>1</sup> US, ultrasonographie; TDM, tomodensitométrie, si disponible

Différentes solutions ont été testées afin de réduire l'impact des FP sur la santé des patients. Les fuites peuvent être importantes, allant de 50 mL à plus de 200 mL par jour, mais le drainage permet de contrôler les possibles complications, avec des taux de succès de l'ordre de 90 % [7]. Néanmoins, la nécessité d'un suivi clinique important représente un coût non seulement économique, mais aussi psychologique pour le patient. En 2012, il a été estimé que le cancer du pancréas représente la quatrième cause de décès par cancer dans l'Union européenne, et l'on sait que l'incidence de ce cancer tend à augmenter [11]. De ce fait, la prévention des FP revêt une certaine importance sanitaire non négligeable et s'inscrit dans la volonté globale de limiter l'apparition de physiopathologies humaines.

#### 1.1.4 Vers la prévention des fistules : cahier des charges

A ce jour, aucune solution médicale n'a été trouvée pour prévenir l'apparition des FP, malgré différentes tentatives, telles que l'utilisation de glues à base de fibrine [12, 13], patches [14], agrafes chirurgicales ou bien le recours à l'électrocoagulation [13], et seul le drainage des excréments permet de limiter l'impact des fuites. De plus, peu importe le choix de la technique chirurgicale employée (*p. ex.* la *pancreaticogastrostomie*), le taux d'incidence des FP semble surtout fonction de l'expérience du chirurgien [6].

Dans ce contexte, un biomatériau intelligent pourrait servir de pansement chirurgical, en complément des drainages classiquement réalisés, et permettre de minimiser davantage l'impact des FP (figure 1.5). L'application de ce biomatériau autour de la zone de suture aurait pour objectif d'empêcher les fuites pancréatiques, c'est-à-dire les FP.

En accord avec l'équipe chirurgicale, il a été défini que le matériau développé doit

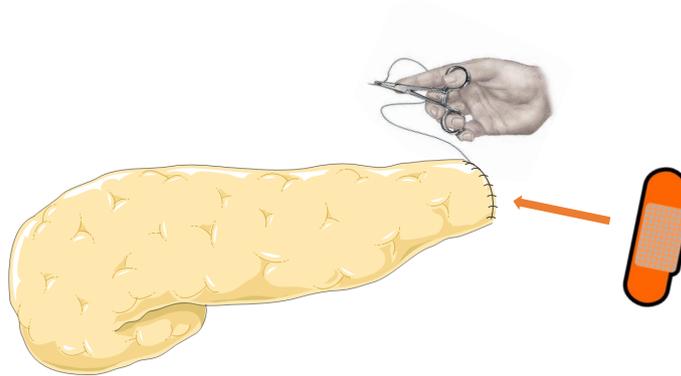


FIGURE 1.5 – Après ablation de la queue du pancréas (exemple de la pancréatectomie caudale), le chirurgien suture le moignon pancréatique. Un pansement pourrait alors être utilisé afin de prévenir les fuites pancréatiques.

posséder un certain nombre de propriétés afin de répondre aux problématiques biomédicales en jeu :

1. le matériau doit être biocompatible et stérilisable : le développement de la médecine a donné naissance à de nouveaux biomatériaux impliquant des stratégies innovantes dans le traitement des pathologies. Ces matériaux se doivent de remplir certaines caractéristiques, en fonction de leur rôle, mais dans tous les cas la *biocompatibilité* est un point crucial qui doit être anticipé très tôt dans la conception. La biocompatibilité est un vieux concept : en 1994, Ikada *et al.* distinguent le concept de «biocompatibilité» du concept de «non-toxicité». Selon les auteurs, la «biocompatibilité» implique la non-toxicité du matériau lui-même alors que la «non-toxicité» se réfère généralement aux fuites ou à la dégradation de ce dernier en composés toxiques [15]. Les auteurs pointent aussi que la surface d'un matériau, en tant qu'interface entre le corps (système immunitaire, sang, cellules) et le biomatériau, est un paramètre clef pour la biocompatibilité. Aujourd'hui, la biocompatibilité est définie comme la capacité d'un biomatériau à remplir une fonction spécifique avec une réponse appropriée de l'hôte. Aussi, si la notion de biocompatibilité inclut la non-toxicité, ces deux concepts restent différenciés. La biocompatibilité inclut en effet la réponse même de l'hôte en la considérant comme adéquate ou non. Les produits de dégradations, les éventuelles excréctions du matériau doivent donc être pensés et adaptés en fonction de l'application voulue. Le choix des matériaux initiaux n'est donc pas uniquement primordial afin d'obtenir les fonctionnalités souhaitées, mais aussi afin de garantir une bonne intégration dans l'organisme du patient. Dans notre cas, le choix de matériaux absorbants, souples et résistants

aux enzymes pancréatiques doit se combiner à la nécessité de partir de matériaux biocompatibles qui peuvent être stérilisés.

2. il doit être absorbant : les excréments pancréatiques doivent pouvoir être absorbés par le matériau. Le matériau n'a pas vocation de remplacer les drains, mais à apporter un soutien à l'absorption des fuites. Il s'agit alors d'utiliser un matériau hydrophile capable de gonfler en milieu aqueux. Les fuites absorbées ne doivent en outre pas être relarguées par la suite : une couche imperméable à l'arrière du biomatériau peut être nécessaire.
3. il doit être biorésorbable, c'est-à-dire se dégrader dans le corps du patient afin d'éviter une intervention chirurgicale supplémentaire tout en maintenant ses propriétés tout au long de la cicatrisation (> 2 semaines) : la chirurgie abdominale est en effet très traumatisante pour le patient. Une seconde intervention n'est pas envisageable et le biomatériau développé doit pouvoir se dégrader dans le corps du patient. Malgré cet aspect résorbable, la capacité de gonflement doit être maintenue pendant le temps de cicatrisation (2 semaines) et il s'agira donc d'obtenir un équilibre entre la dégradation du matériau et le maintien de ses propriétés fonctionnelles.
4. sa pose doit être facilitée par une adhésion à l'organe contrôlée : le positionnement du pansement est une phase critique durant laquelle le chirurgien doit pouvoir repositionner le matériau au besoin. L'adhésion de ce dernier doit donc intervenir dans une seconde phase, lorsque l'intervention est finie. L'adhésion thermorégulée est une possibilité intéressante : lors de la pose, l'environnement du bloc opératoire est à relative basse température (entre 19 °C et 26 °C [16]), le positionnement du matériau se fait «à froid». Une fois posé et l'opération terminée, la température du dispositif devrait augmenter rapidement. Un matériau dont la bioadhésion, c'est-à-dire la capacité à adhérer à un système vivant, est thermocontrôlée semble donc tout à fait adapté.

De plus, la libération d'un principe actif depuis le biomatériau permettrait de limiter le risque d'infection au niveau des sutures chirurgicales. Afin de remplir tous ces critères, un système multicouche a été pensé : une matrice absorbante, chargée en principe actif, sera recouverte d'une couche imperméable, à l'arrière du pansement, et d'un polymère à même d'offrir les propriétés d'adhésion contrôlée sur la surface en contact avec l'organe (figure 1.6). L'élaboration et la caractérisation de la matrice absorbante ainsi que l'incorporation d'une couche supérieure imperméable ont été étudiées au cours d'une thèse précédente [17].

La matrice absorbante précédemment élaborée est donc le point de départ de la présente étude. Elle porte alors, d'une part, sur l'optimisation de la matrice absorbante, notamment via le procédé de séchage (chapitre 2), et, d'autre part, sur la modification de surface de cette matrice afin de contrôler la bioadhésion en fonction de la température (chapitres 3 et 4).

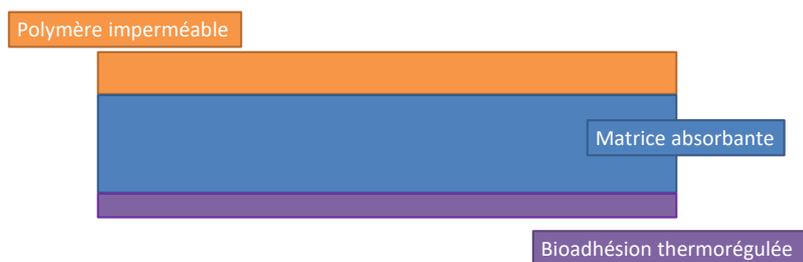


FIGURE 1.6 – Structure proposée pour le pansement chirurgical.

## 1.2 La matrice absorbante

La matrice absorbante est une partie importante du matériau. Celle-ci doit en effet être capable d'absorber les fuites et de se dégrader tout en gardant son intégrité suffisamment longtemps. La nécessité d'utiliser des matériaux de bases biocompatibles limite les choix possibles. La famille des polysaccharides présente un certain nombre de polymères biosourcés biocompatibles. Deux polysaccharides ont été identifiés lors du travail de thèse précédent : l'alginate et le chitosane [17]. Ces deux polysaccharides peuvent être utilisés sous forme de *complexe polyélectrolyte* (PEC) et sont bien tolérés par le système immunitaire [18, 19].

### 1.2.1 Alginate

L'alginate est un polymère naturel obtenu à partir d'algues brunes (Phaeophyceae), notamment de *Laminaria hyperborea*, *Laminaria digitata*, *Laminaria japonica*, *Ascophyllum nodosum* ou encore de *Macrocystis pyrifera*, via des traitements alcalins [18, 20].

L'extraction de l'alginate peut se décrire en 3 étapes [21]. En premier lieu, les algues sont placées dans une eau froide légèrement acide (HCl dilué) jusqu'à ce que les sels marins soient éliminés. Cette étape peut, si nécessaire, être répétée. Secondement, les algues sont traitées par une solution alcaline, par exemple de carbonate de sodium (de 2 à 4 % par rapport à la masse d'algues) pendant 40 minutes, en chauffant jusqu'à obtention d'une pâte épaisse. La troisième étape consiste à diluer le mélange dans de l'eau froide qui sera ensuite filtrée. Le filtrat obtenu contient alors l'alginate de sodium. Il est ensuite précipité grâce à l'ajout d'ions calcium  $\text{Ca}^{2+}$ . Cependant, ce dernier contient des impuretés *mitogènes* et *cytotoxiques* et n'est donc pas utilisable directement pour les applications biomédicales [20]. Pour un traitement à grande échelle, on utilise des ions  $\text{Ba}^{2+}$ , plus affins envers l'alginate que les ions  $\text{Ca}^{2+}$  [22]. Les gels de type Ba-alginate sont très stables dans les milieux neutres ou acides contenant des agents chélatants tels que les citrates, phosphates ou encore l'acide éthylènediaminetetraacétique (plus connu sous le nom d'EDTA). Les billes de Ba-alginate sont alors lavées dans différentes solutions, par exemple du citrate de sodium à 500 mM, puis  $\text{Ba}^{2+}$  est remplacé par  $\text{Na}^{2+}$  dans une so-

lution alcaline contenant de l'EDTA à laquelle NaCl est ajouté, avant que l'alginate de sodium ainsi purifié ne soit précipité dans l'alcool.

Plus qu'un polymère, l'alginate en fait une classe de polymères. «Les alginates» sont en effet composés de deux sous unités appelées acide guluronique (G) et mannuronique (M) (figure 1.7). Ces unités s'associent en motifs GGGG (blocs G), MMMM (blocs M) ou MGMGMG (blocs MG) [18, 23]. De la répartition de ces blocs dépendent les propriétés de l'alginate. Par exemple, les blocs G sont plus disponibles pour former des interactions ioniques fortes et une importante proportion de ces blocs résulte ainsi en un gel plus rigide lors de la gélification par le calcium. Les séquences G et M dépendent de la source d'alginate employée. Afin de contrôler ces séquences, des procédés de biosynthèses faisant appel à des bactéries ont été développés [24].

L'alginate de sodium est soluble dans l'eau sous forme carboxylate  $R-COO^-$  (pKa allant de 3,4 à 4,5 en fonction des caractéristiques du polymère) [25]. Outre sa tenue mécanique faible, l'alginate, sous forme de films, se dissout ainsi rapidement en milieu aqueux. Ainsi, il est souvent utilisé sous forme réticulée, typiquement par des ions divalents :  $Pb^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  ou encore  $Mn^{2+}$  [20]. Ces ions vont interagir avec les fonctions  $COO^-$  pour ponter les chaînes d'alginate entre elles. Les ions calcium sont cependant majoritairement utilisés pour des raisons évidentes de disponibilité (faible prix) et de compatibilité pour les applications à portée biomédicale. La réticulation peut se faire selon deux méthodes distinctes [18, 20, 26]. En réticulation externe, Na-alginate est mis en contact avec une solution contenant des ions  $Ca^{2+}$ , typiquement introduits sous forme de  $CaCl_2$ . La diffusion des ions se fait alors de l'extérieur vers l'intérieur du gel d'alginate. Un gradient de réticulation se met ainsi en place. La deuxième méthode permet d'éviter ce phénomène en internalisant la source d'ions. Par exemple, on utilise le sel  $CaCO_3$ , non soluble, qui peut alors, en solution, être internalisé par le gel sans pour autant interagir. En variant le pH, on libère les ions  $Ca^{2+}$  de manière uniforme,

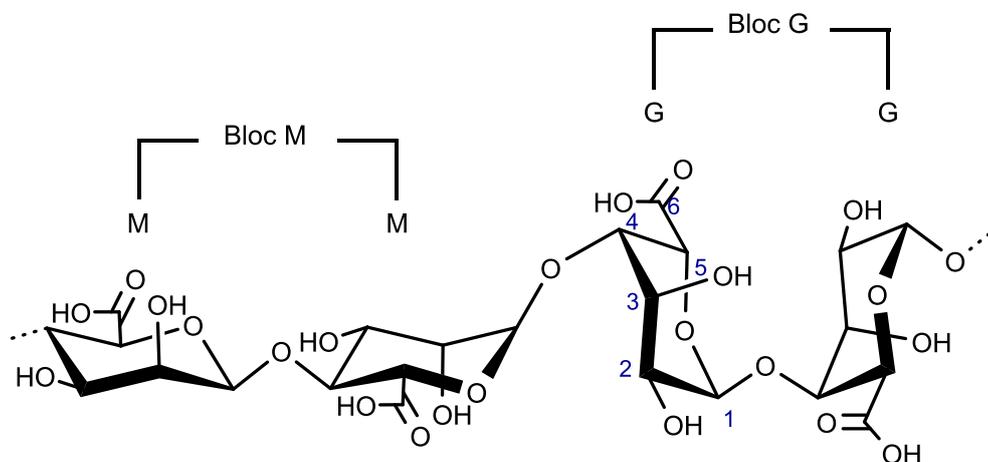


FIGURE 1.7 – Structure de l'alginate, composé d'unités guluroniques (G) et mannuroniques (M), s'associant en blocs. Les unités sont liées par des liaisons  $\beta$  (1-4).

directement depuis l'intérieur du gel. Au vu du caractère divalent des ions calcium, on pourrait s'attendre à une coordination linéaire de 2. Il n'en est rien puisqu'il a été montré que l'interaction entre les unités G et  $\text{Ca}^{2+}$  suit un modèle appelé «boîte à œufs» (figure 1.8, gauche) [18, 27]. La diffraction des rayons X sur des alginates riches en blocs G semble de plus indiquer que les chaînes d'alginate impliquent chacune deux unités G adjacentes (donc 4 en tout) dans la coordination d'un ion calcium pour former des dimères au niveau des zones de jonction [28].

On sait aujourd'hui que les sous-unités G ne sont pas seules à jouer un rôle dans la formation des gels Ca-alginate. Entre autres, malgré une affinité envers les cations calcium moindre, les blocs MG sont impliqués dans la coordination. L'utilisation d'épimérase AlgE4 permet de produire des polymères alternant des séquences MG en convertissant les blocs M. Dans une étude de Donati *et al.*, des alginates composés uniquement d'alternances MG sont alors comparés à des alginates composés uniquement d'unités M [29]. Les deux gels sont traités par du  $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$  (non hydrosoluble) et du D-glucono- $\delta$ -lactone. La lactone s'hydrolyse lentement au cours du temps, abaissant le pH et entraînant la libération des ions  $\text{Ca}^{2+}$  (réticulation interne). On remarque alors que la présence d'alternance MG permet la réticulation (figure 1.8, droite, a) tandis que la seule présence d'unités M ne conduit pas à la formation d'un gel (figure 1.8, droite, b). La formation de jonctions MG/MG est de plus responsable de la contraction du gel, conduisant à son l'essorage (expulsion d'eau). Les forces de friction à l'intérieur du réseau augmentent alors proportionnellement à la longueur des blocs MG. Enfin, cette étude démontre aussi la formation de jonctions G/MG.

D'un point de vue applicatif, l'alginate est utilisé dans de nombreux domaines bio-

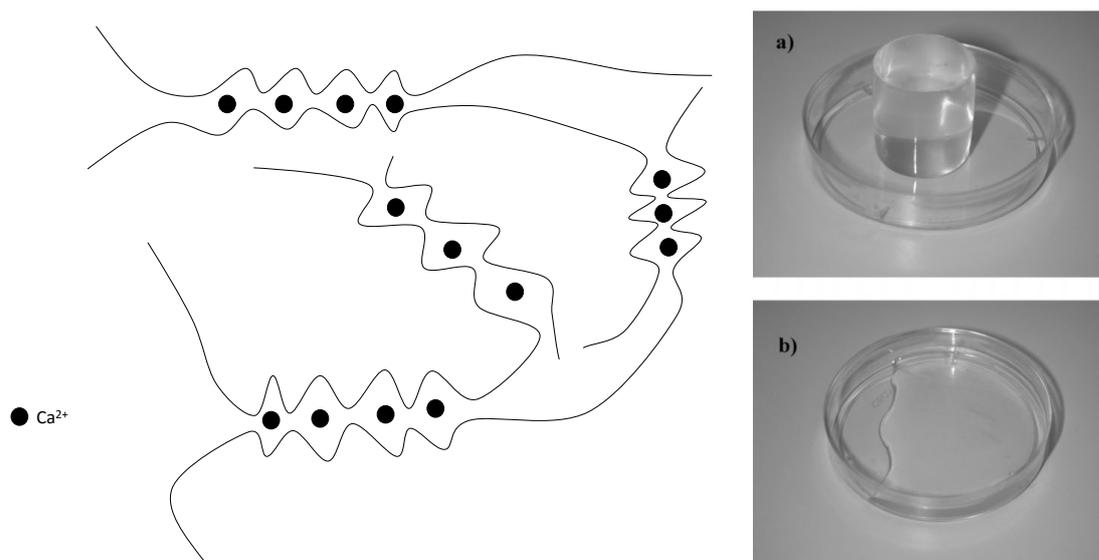


FIGURE 1.8 – (Gauche) chaînes d'alginate réticulées par des ions calcium selon le modèle «boîte à œufs» : chaque ion  $\text{Ca}^{2+}$  est coordonné par 4 unités G. (Droite, a) alginate composé uniquement de séquences MG et (droite, b) d'unités M, tous les deux traités  $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ /D-glucono- $\delta$ -lactone (réticulation interne), extrait de la Ref [29].

médicaux [18]. Entre autres, on peut noter la libération de principes actifs, de protéines ou même de cellules. Simple, rapide et facile à produire, les surfaces d'alginate sont peu affines pour les protéines et les cellules n'ont pas de récepteurs sensibles à ce polysaccharide. Il en résulte une faible fixation des cellules ce qui a permis de nombreuses études portant sur l'implication des protéines de couplage (type RGD, voir section 1.3) sur la fixation, la prolifération et la différenciation cellulaire. D'un point de vue commercial, l'alginate est couramment utilisé sous forme de pansements ou de compresses d'alginate de calcium, comme répertorié par le VIDAL qui met en avant ses propriétés hémostatiques et absorbantes<sup>3</sup>.

Quoi qu'il en soit, l'intérêt ici porté à l'alginate repose sur ses propriétés absorbantes intéressantes. En outre, en tant que polyanion et afin d'améliorer ses propriétés mécaniques, l'alginate est souvent combiné avec des polycations tels que le chitosane.

### 1.2.2 Chitosane

Tout comme l'alginate, le chitosane est un polysaccharide biosourcé. Ce polycation, dont la structure est exposée figure 1.9, est un copolymère linéaire flexible de 2-acétamido-2-déoxy- $\beta$ -D-glucopyranose (unité acétylée) et 2-amino-2-déoxy- $\beta$ -D-glucopyranose (unité déacétylée) liés en  $\beta$  (1-4). Les deux types d'unités qui le composent (acétylées et déacétylées) diffèrent au niveau du carbone C2. Le chitosane est issu de la valorisation des exosquelettes de crustacé (crabes, crevettes ou encore la plume de calamar) [30]. Ces déchets industriels sont en effet majoritairement composés de chitine, représentant jusqu'à 40 % de la composition de ces exosquelettes [31]. Si l'on souhaite extraire la chitine des crevettes, il s'agit alors, après lavage et séchage, de lyophiliser ces dernières avant de les broyer pour obtenir une poudre [32]. Une étape de déminéralisation est ensuite nécessaire afin de se séparer de la partie minérale (carbonate de calcium, 20-50 %) par un traitement acide. Plus précisément, l'équilibre de décalcification est le suivant :

3. Source : site officiel du VIDAL, [www.vidal.fr/classifications/saumon](http://www.vidal.fr/classifications/saumon) rubrique «Accessoires et matériel médical/Hémostase».

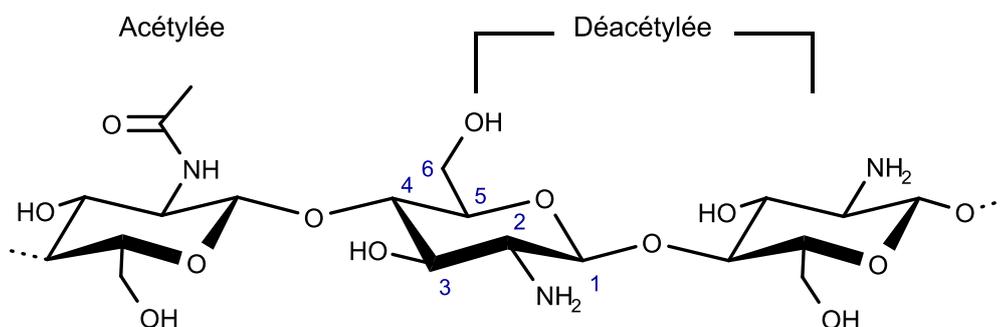
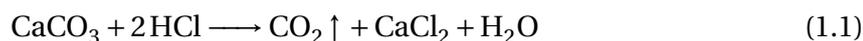


FIGURE 1.9 – Structure du chitosane, issu de la chitine avec (gauche) une unité acétylée et (droite) deux unités déacétylées. Les unités sont liées par des liaisons  $\beta$  (1-4).



La filtration permet alors de se séparer des minéraux hydrosolubles produits lors de la réaction 1.1. Le résidu est cependant toujours chargé en protéines (20-40 % de la composition initiale). Cette pollution protéique peut être problématique dans la mesure où elle peut être la cause de réactions allergiques. La déprotéinisation consiste à casser les liaisons chitines/protéines. Un grand nombre d'agents chimiques peuvent être utilisés : NaOH, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, KOH, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Ca(OH)<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, NaHSO<sub>3</sub>, CaHSO<sub>3</sub>, Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> ou encore Na<sub>2</sub>S [33]. Bien qu'elle entraîne une déacétylation partielle ainsi que la diminution du poids moléculaire (hydrolyse), la soude est majoritairement utilisée. Moins efficace, la déprotéinisation enzymatique (p. ex. à base d'alcalase, pancréatine ou trypsine) limite cependant les impacts du traitement sur la structure du polysaccharide et, de manière générale, des efforts importants sont consacrés à l'optimisation des procédés d'extractions [34].

Plus récemment, des champignons comestibles ont été utilisés comme source de chitine<sup>4</sup>. Enfin, quoiqu'en soit la source, la chitine peut, une fois extraite, être transformée en chitosane par déacétylation partielle. Pour ce faire, il s'agit d'hydrolyser l'amide afin d'éliminer le groupement acétyle CH<sub>3</sub>-C=O. Si cette hydrolyse est réalisable à la fois en milieu acide ou basique, les traitements alcalins sont généralement utilisés [35, 36]. Il en résulte une grande variété de chitosanes caractérisés, selon la source et le procédé utilisé, par des *degrés d'acétylation (DA)* et des poids moléculaires variables. Arbitrairement, on parle cependant de chitosane uniquement lorsque le DA est inférieur à 50 %.

La chitine est insoluble dans l'eau. Cependant, dans le cas du chitosane, un milieu acide permet la protonation des amines primaires libérées par la déacétylation, avec un pKa autour de 6,5 [33]. Insoluble à pH neutre, la formation d'amines protonées NH<sub>3</sub><sup>+</sup> rend favorable la solubilisation du chitosane, ce qui contraint généralement à travailler en présence d'un acide protique type HCl ou AcOOH. La solubilisation s'effectue lorsqu'au moins 50 % des amines sont protonées [37].

Tout comme pour l'alginate, le chitosane est utilisé sous forme de pansements. Ses effets bactériostatiques sont en effet recherchés et mis en avant par les fournisseurs<sup>5</sup>. En faite, les propriétés du chitosane dépendent très largement de ses caractéristiques [38]. Par exemple, les chitosanes présentant des DAs faibles peuvent favoriser la prolifération et l'adhésion cellulaire [39]. Combinés avec des poids moléculaires élevés (2 000 kDa), les chitosanes à DAs faibles (8 %) permettent une meilleure cicatrisation lorsqu'utilisés en tant que gels sur des brûlures de l'épiderme, comparé à ceux de plus bas poids moléculaires et haut DAs [40]. Dans un même temps, la déacétylation tend à augmenter la résistance à la traction des films à base de chitosane [41]. La mesure du DA et du poids

---

4. Source Sigma : 740063, dérivé en chitosane haute pureté.

5. comme en atteste la gamme de pansements au Chitosane proposé par le fournisseur TRUSETAL

moléculaire du chitosane étudié est donc nécessaire afin d'identifier le chitosane dont il est question.

Ceci étant posé, le chitosane est, de plus, biocompatible. Le chitosane n'est en effet pas toxique, il est cytotocompatible, hémocompatible et biorésorbable. En outre, il montre des propriétés antibactériennes, antifongiques, mucoadhésives et analgésiques [42]. Ces propriétés en font un polymère de choix pour une application de pansement chirurgical biorésorbable. Les liaisons glycosidiques  $\beta$  (1-4) sont en effet, chez les mammifères, hydrolysées par les lysozymes, ce qui permet la dégradation *in vivo* du chitosane [43, 44].

La structure du chitosane, riche en fonctions hydroxyles et amines, permet de plus l'établissement de liaisons hydrogène intermoléculaires qui facilitent la mise en forme de gels et de films. Les amines du carbone C2 sont chimiquement réactives et peuvent servir à la fonctionnalisation du chitosane, par exemple par des couplages peptidiques (formation d'amide, voir section 3.3.1). Le greffage de polymères fonctionnels est donc possible par le biais de ces fonctions.

Enfin, son caractère cationique lui permet d'interagir avec les anions. En contact avec des polyanions, par exemple l'alginate, il est alors possible de former des PECs.

### 1.2.3 Les complexes polyélectrolytes (PEC)

Les **complexes polyélectrolytes (PECs)** sont des assemblages moléculaires de polymères de charges opposées. La combinaison d'un nouveau matériau à partir de deux polymères préexistants permet, à simple coût, d'obtenir de nouvelles propriétés combinant les caractéristiques intrinsèques des polymères d'origine. De manière générale, la formation des PECs suit trois étapes (figure 1.10) [45]. Rapidement, les forces de Coulomb permettent la formation d'un complexe désordonné. Le complexe se réorganise ensuite (environ 1 H) avant de s'agréger pour former différentes structures, via des interactions hydrophobes. Ce schéma est général et dépend du complexe polyélectrolyte considéré.

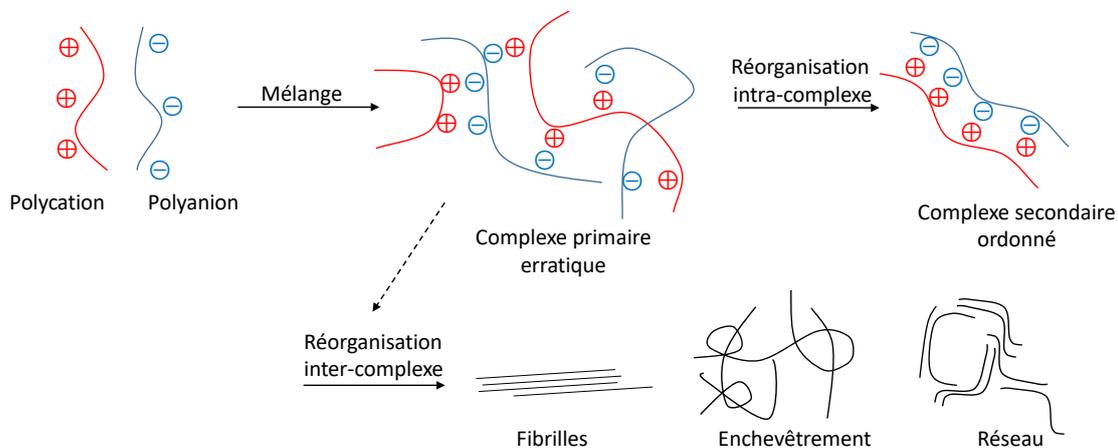


FIGURE 1.10 – Formation des PECs : en premier lieu, la formation de liaisons via les forces de Coulomb crée un réseau erratique, les chaînes s'ordonnent alors avant l'apparition d'interactions inter complexes (interactions hydrophobes) [45].

Les PECs à base d'alginate et de chitosane sont bien connus dans la littérature [46]. La formation du PEC est possible grâce aux interactions entre les carboxylates  $R-COO^-$  de l'alginate et les amines protonées  $NH_3^+$  du chitosane. Contrairement à la complexation des ions calcium, le ratio M/G de l'alginate ne semble pas influencer sur son interaction avec le chitosane [47]. Différents paramètres peuvent cependant influencer sur les propriétés des PECs obtenues. Tout d'abord, le pH final du mélange, étant convenu que les interactions entre les deux polymères sont tributaires de l'état chargé de leurs fonctions acido-basiques [48]. Un pH situé entre le pKa de l'alginate (environ 4,0) et du chitosane (environ 6,5) paraît donc favorable. Le DA du chitosane détermine en outre le nombre de fonctions amines protonables et a donc son importance [48]. Enfin, la proportion des deux polymères ainsi que le procédé de mélange sont des paramètres importants.

Ces deux paramètres ont été étudiés dans une précédente thèse, et il est apparu qu'un ratio alginate/chitosane de 63/37 (m/m) ainsi qu'une homogénéisation à l'Ultra-Turrax permettait d'obtenir des propriétés intéressantes en termes de résistance enzymatique (75 % de conservation dans un milieu pancréatique simulé) et d'absorption (environ 2 000 %) [49]. Avec ces propriétés et dans ces conditions optimisées, les PECs à base d'alginate et chitosane se sont montrés prometteurs quant à leur utilisation en tant que matrice absorbante pour la prévention des fistules pancréatiques.

A cette matrice absorbante d'alginate et de chitosane, il est proposé de conférer des propriétés bioadhésives thermorégulées, afin de permettre une pose facilitée et un maintien sécurisé du biomatériau. Il convient alors de s'intéresser aux phénomènes liés à la bioadhésion, c'est-à-dire à l'adhésion de systèmes vivants, en commençant par la compréhension des mécanismes de biologie cellulaire sous-jacents.

### 1.3 Biologie cellulaire, bioadhésion et surfaces

Avec des tailles allant de 1 à 100  $\mu m$ , les cellules sont composées de nombreux organites, ayant chacun leur fonction propre. Le noyau, les mitochondries ou encore les ribosomes participent par exemple à la synthèse protéique. D'autres encore sont dédiés à la structure de la cellule : une bicouche phospholipidique, sa membrane, maintient par exemple la séparation entre le cytosol (phase liquide interne) et la MEC. De son côté, le *cytosquelette*, composé principalement de microtubules et d'un réseau de filaments d'actine, contrôle la rigidité de la structure [50]. La quantité et la composition de la MEC varient selon le tissu concerné. Elle contient un certain nombre de protéines : fibronectine, collagène, laminine, mais aussi des facteurs de croissance, ainsi que toutes les protéines nécessaires pour le maintien des cellules et la communication intercellulaire.

Les filaments d'actine (en rouge sur la figure) composent le *cytosquelette* en s'auto assemblant [51]. Ces filaments sont connectés aux intégrines (protéines transmembranaires) via la vinculine et la taline (figure 1.11) [52, 53]. Ces intégrines sont des récepteurs cellulaires et se lient de manière spécifique à certaines protéines issues de la MEC,

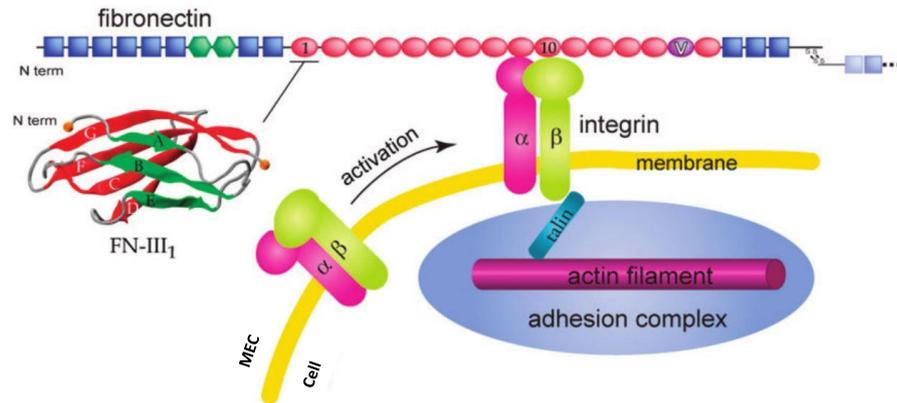


FIGURE 1.11 – La structure d’adhésion d’une cellule. Cette dernière se fixe sur son substrat en reliant son *cytosquelette* (filaments d’actine) à la fibronectine par l’action, entre autres, de l’intégrine et de la taline. Adapté depuis la Ref [52].

comme la fibronectine ou encore la vitronectine, via un couplage RGD<sup>6</sup>. Les interactions intégrine/MEC sont donc responsables de l’adhésion des cellules sur une surface. La cohésion intercellulaire est quant à elle régulée par d’autres mécanismes, p. ex. par des jonctions homophiliques via des cadhérines, jouant aussi un rôle dans la régulation de la prolifération cellulaire. Quoi qu’il en soit, cette adhésion cellule/substrat peut être divisée en plusieurs phases (figure 1.12, a) [54]. Avant tout, il est nécessaire de concevoir que les cellules n’interagissent pas directement avec le substrat, mais avec une couche protéique qui s’adsorbe spontanément, sauf dans le cas de surfaces anti-adhésion, dans les premiers instants de ma mise en culture du matériau. La cellule «voit» donc une couche protéique, et les premières secondes de contact sont caractérisées par la formation d’interactions non spécifiques. Les interactions biologiques apparaissent ensuite, ce qui inclut le couplage RGD fibronectine/intégrine. Cette deuxième étape conduit à une cascade d’action dont la réorganisation du *cytosquelette* et le regroupement des intégrines en *points d’adhésion focaux*. Par la suite, les cellules contractent leur cytosquelette et maintiennent un état mécanique de tension, aussi appelé préstress. Enfin, après un certain temps, les cellules produisent de la MEC afin de renforcer leur intégration et de maintenir un environnement qui leur est favorable.

Deux paramètres déterminent le comportement d’un biomatériau implanté : (i) les propriétés du «*bulk*», et particulièrement sa rigidité, jouent un rôle dans la qualité de l’implantation dans les tissus, et (ii) ses propriétés de surface contrôlent la réponse du système immunitaire (*immunogénicité*), la destruction de l’intégrité cellulaire et la bioadhésion. Les membranes cellulaires étant anioniques, les surfaces cationiques doivent être précautionneusement utilisées, ces dernières pouvant endommager les cellules et les tissus. A l’inverse, les surfaces chargées négativement tendent à repousser les cellules [56–59].

6. pour acide arginylglycylaspartique, contraction de L-arginine, glycine, et acide L-aspartique

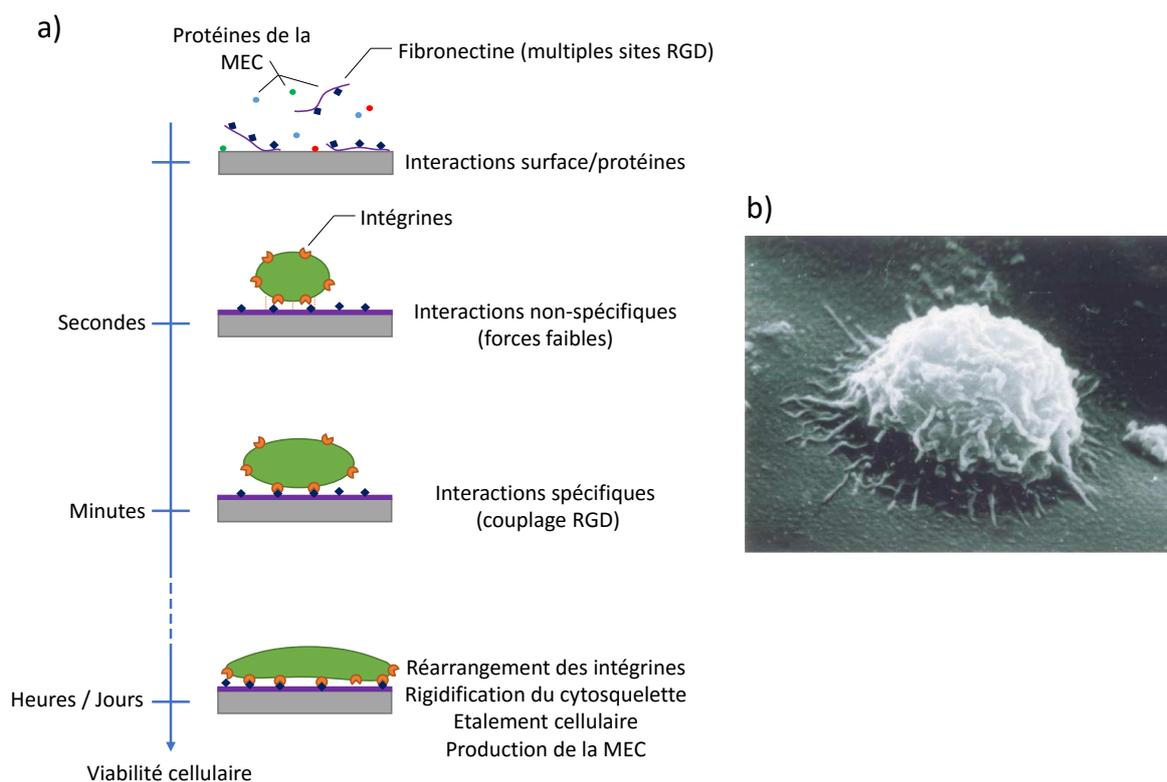


FIGURE 1.12 – (a) Les différentes phases de l'adhésion cellulaire et (b) fibroblaste (environ 10  $\mu\text{m}$ ) adhérent sur une surface synthétique (extrait de la Ref [55]).

L'importance des interactions surface/cellule est étudiée depuis des années, menant à des discussions intéressantes comme celle publiée en 2001 par Castner *et al.* [55]. Dans cette étude, des matériaux synthétiques furent synthétisés et la bioadhésion fût observée par *microscopie électronique à balayage* (MEB) (figure 1.12b).

Il est important de concevoir, comme indiquée section 1.3, que les surfaces sont spontanément recouvertes par une couche protéique. La bioadhésion est aujourd'hui mieux comprise et il est admis que l'adhésion est régulée à la fois par des interactions spécifiques (*c.-à-d.* biologiques, type récepteur/ligand) et physiques. L'hydrophilicité de surface, les propriétés mécaniques ainsi que la morphologie sont donc des paramètres à considérer.

L'adhésion entre les cellules et leur environnement est possible via l'action de couplages spécifiques intégrine/fibronectine (figure 1.11). Par ce biais, la cellule se lie alors aux protéines de la MEC, elle-même en interaction avec le milieu extérieur (p. ex. une surface). En 2011, Pei *et al.* ont observé l'importance de ces interactions spécifiques (*c.-à-d.* couplage RGD) dans l'attachement des cellules à une surface [60]. Ils ont comparé le nombre et l'étalement de *fibroblastes de prépuce humain* (FPHs) traités (intégrines bloquées, pas de couplage RGD possible) et non traités (intégrines libres, couplage RGD possible) sur des surfaces en peigne (voir section 1.15) de *polyéthylène glycol* (PEG) sur  $\text{TiO}_2$ . Il est apparu que le nombre de cellules attachées diminuait fortement lorsque les

intégrines étaient désactivées. Néanmoins, les interactions non spécifiques ont permis, lorsque l'affinité cellule/surface était suffisamment importante, le maintien de certaines cellules sur ces surfaces. Cette étude a aussi permis d'obtenir de précieuses informations sur l'influence de la densité de greffage du PEG. Le PEG est un polymère *antifouling*. A haute densité de greffage, les chaînes de PEG sont resserrées (régime en peigne,  $L < 2R_g$ , où  $L$  est la longueur entre deux chaînes et  $R_g$  le *rayon de giration* de ces mêmes chaînes), alors qu'à basse densité ces chaînes se replient sur elle-même (régime champignon,  $L > 2R_g$ , figure 1.13). Pour les observations, un gradient de PEG fut utilisé : sur des temps courts, le nombre de cellules adhérentes diminuait significativement lors du passage du régime champignon au régime peigne. Cette évolution a pu être corrélée avec le profil d'adsorption protéique, renforçant l'hypothèse de leur implication. Une saturation en fibroblastes fut observée dans le régime en peigne, signifiant que même un taux de protéine faible ( $2,2 \pm 3,4 \text{ ng/cm}^2$ ) était suffisant pour activer l'adhésion. Cette étude montre donc l'importance des interactions spécifiques.

En effet, un modèle impliquant une couche protéique entre le biomatériau et les cellules fut déjà établi au début des années 2000 [55, 61, 62]. Selon ce modèle, l'interaction cellule/support dépend de la capacité de la surface à adsorber les protéines sans dénaturer leur structure native. En 2011, une revue portant sur le *système immunitaire inné* soulignait l'importance de la dénaturation protéique à l'interface matériau/corps humain dans l'activation de la réponse immunitaire primaire. Le processus de dénaturation peut être lié à la structure de l'eau proche de la surface, *c.-à-d.* l'hydrophilicité de la couche superficielle du matériau. L'importance de la chimie de surface et des interactions eau/surface a été démontrée depuis 1998 par Vogler *et al.* [63]. Le critère d'hy-

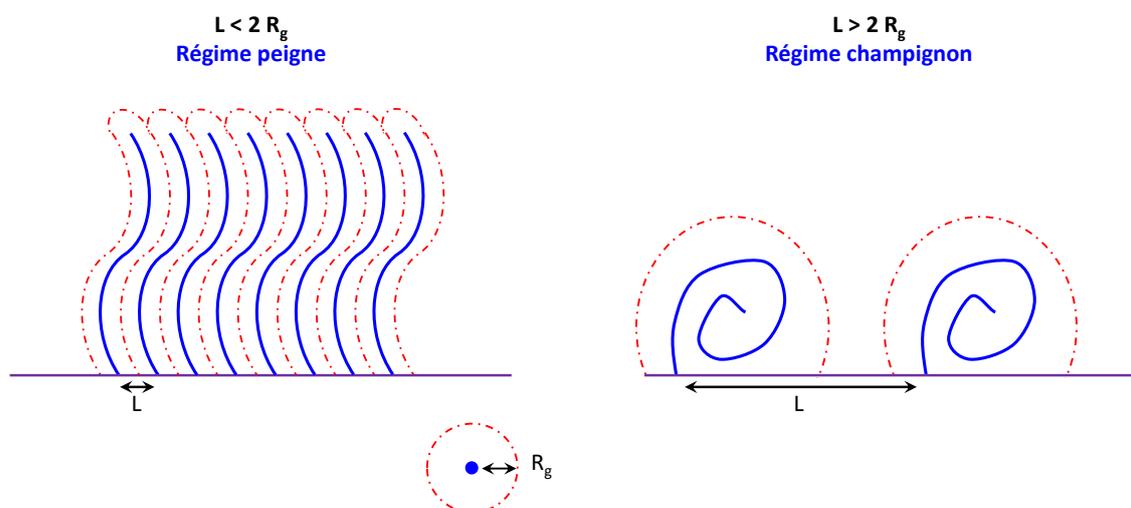


FIGURE 1.13 – Structure en peigne ou en champignon en fonction de la distance entre les chaînes de polymères ( $L$ ) et du rayon de giration ( $R_g$ ).

drophilicité/hydrophobicité fût utilisé par mesure de l'angle de contact. Il a été montré que de l'eau trop fortement liée à la surface (*c.-à-d.* surface hydrophile) était difficilement désorbée. En conséquence, les interactions entre protéines et surfaces sont rendues difficiles, rendant ces surfaces peu ou pas adsorbantes [64, 65]. Aujourd'hui, il est largement accepté qu'une surface modérément hydrophile (angle de contact autour de 70-80 °) est souhaitable pour assurer une bonne adhésion cellulaire [66, 67]. Par exemple, il a été observé que des *cellules endothéliales* montraient une bonne bioadhésion vis-à-vis de surfaces à base d'un copolymère de polycaprolactone greffé polyméthylmethacrylate (PCL-g-PMMA) qui présentent un angle de contact autour de 70 °. D'un autre côté, les surfaces hydrophobes tendent à dénaturer les protéines, posant des problèmes de perte de fonctionnalité et/ou de non-reconnaissance par le corps entraînant le déclenchement d'une réponse immunitaire [61, 67]. Plus précisément, les protéines sont constituées d'acides aminés. Chaque acide aminé possède ses propres caractéristiques en termes de polarité ou de charge et, par conséquent, sa propre hydrophilicité/hydrophobicité. Ainsi, les acides aminés réarrangent leur organisation en fonction du milieu extérieur : sur une surface hydrophobe, les acides aminés hydrophobes sont externalisés ce qui conduit au dépliement protéique, c'est-à-dire sa dénaturation [68]. De ce fait, des post-traitements (p. ex. plasma) sont parfois utilisés pour augmenter l'hydrophilicité d'une surface en introduisant des groupements polaires. Keselowsky *et al.* ont établi un ordre d'affinité fibronectine/surface en fonction des groupes fonctionnels présents en surface : OH < COOH < CH<sub>3</sub> < NH<sub>2</sub> [69]. Cependant, toujours selon la même étude, l'ordre d'adhésion d'ostéoblastes est le suivant : CH<sub>3</sub> < NH<sub>2</sub> = COOH < OH. Cette inversion de comportement peut être expliquée par la déformation géométrique des protéines de la MEC, c'est-à-dire leur dénaturation.

Sur les surfaces en peigne, l'angle de contact optimal ne dépend pas seulement de la nature de la surface, mais aussi de la méthode de greffage employée. Comme vu précédemment, l'influence de la longueur de chaîne et de la densité peuvent expliquer ce phénomène. Par exemple, lorsque Fe<sup>2+</sup> est utilisé en tant qu'initiateur pour la *polymérisation initiée en surface* (PIS) de *polyméthylmethacrylate* (PMMA) sur des surfaces d'*acide polylactique* (PLA), l'attachement maximum de chondrocytes (cellules cartilagineuses) est obtenu pour un angle de contact de 52 °, alors pour des surfaces obtenues par initiation UV, l'angle optimal est de 76 ° [67]. Les auteurs supposent que la différence de propriétés bioadhésives entre ces deux types d'échantillons est due à la plus grande densité et uniformité de greffage, mais aussi au caractère plus court des chaînes de PMMA obtenues par l'initiation métallique. De fait, le critère de mouillabilité semble insuffisant, ce dernier ne prenant pas en compte la structure, les propriétés mécaniques, la densité de charge ou encore le type de cellules. Par exemple, Bacakova *et al.* ont montré que des substrats trop souples n'étaient pas favorables à l'adhésion cellulaire [65]. L'explication pourrait être la difficulté pour la surface de ce type de matériau de résister aux forces impliquées lors de la formation de points d'ancrage cellulaires, appelés *points d'adhésion focaux*.

Il convient alors d'inclure d'autres paramètres à l'équation, notamment les propriétés physico-chimiques des biomatériaux. En effet, l'organisation interne des cellules se remodèle tout au long de leur vie, et ce en fonction de leur environnement extérieur, et ce non uniquement par stimulation chimique, mais aussi par stimulation mécanique (sondage mécanique, ou «mechanosensing»), jusqu'à ce qu'un équilibre morphologique soit atteint [50, 70]. Ainsi, la forme des cellules, leur rigidité et leur *motilité* dépendent du substrat sur lequel elles évoluent. Un certain nombre de cellules sont par exemple sensible à la dureté d'une surface ou d'un tissu et le mesure en appliquant un stress mécanique. C'est entre autres le cas des cellules neuronales ou musculaires [71]. Ce sondage de la surface par les cellules se fait par l'action de la myosine et des filaments d'actine, via leur pontage. Une boucle de contrôle se met alors en place et le *cytosquelette* ainsi que la capacité d'adhésion vont s'adapter en fonction du milieu extérieur. En conséquence, des substrats durs conduisent à une rigidification des cellules, comme cela a pu être mesuré par *microscopie à force atomique* (AFM) [72], ou, de manière plus douce, par indentation par pinces optiques (figure 1.14) [73].

Quoi qu'il en soit, le sondage de la rigidité du substrat par les cellules est un procédé long, allant de quelques minutes à quelques heures [50]. La viscosité est donc à prendre en compte, dans le cas des gels par exemple, où la réticulation permet, dans certains cas, d'augmenter l'activité cellulaire [74]. Additionnellement, le sondage mécanique peut être initiateur du déplacement cellulaire (appelé «mechanotaxis» en anglais et découvert par Lo *et al.* en 2000 [75]), de la zone du substrat la plus molle à la zone la plus dure [76]. La motilité (déplacement) cellulaire a, de manière générale, été montrée comme dépendante des *points d'adhésion focaux* et donc indirectement de la bioadhésion sur un substrat [51, 77].

S'il est difficile de généraliser sur le comportement cellulaire vis-à-vis d'un matériau du fait de la grande variété de ces dernières, il semble que des substrats durs tendent à favoriser une bioadhésion forte. Des fibroblastes vont par exemple adhérer faiblement sur des substrats souples tandis qu'ils vont former des *points d'adhésion focaux* stables et rigidifier leur *cytosquelette* sur des substrats durs. Cela a pour conséquence de réduire leur motilité [76]. Dans le cas des structures en peigne, la mobilité des chaînes pourrait conduire à une instabilité mécanique, réduisant la bioadhésion [78].

Au-delà de l'adhésion cellulaire, le substrat peut aussi perturber l'activité de ces dernières, comme cela a pu être mesuré par *ampérométrie avec microélectrode en fibre de carbone* (AMFC), une technique qui permet de récolter des informations sur l'exocytose cellulaire et donc son activité [79]. Dans cette étude, l'introduction de *poly(N-isopropylacrylamide)* (PNIPAM) (via déposition plasma ou spin-coating) sur des surfaces a conduit au ralentissement de l'échange entre les vésicules intracellulaires et le milieu extracellulaire (exocytose). De plus, le PNIPAM déposé par spin-coating a montré une tendance à hyper activer l'exocytose cellulaire, tandis que le PNIPAM déposé par plasma n'affectait que la cinétique. On peut par ailleurs noter que, si l'hyper activation peut s'avérer dommageable

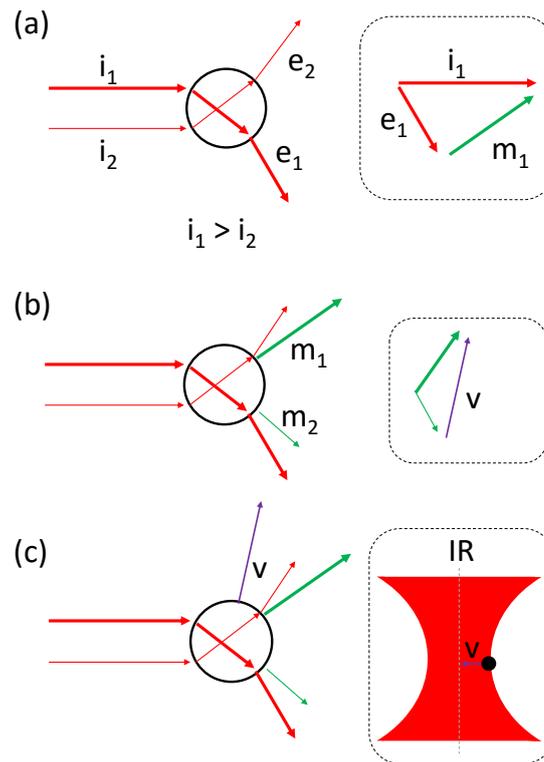


FIGURE 1.14 – Principe simplifié de la pince optique : le piège électromagnétique utilise entre autres les propriétés de réfraction de la lumière par un diélectrique. En effet (a), lorsqu'un rayon électromagnétique, d'intensité  $i$ , est réfracté par une particule, cette dernière ressent une force  $m$  correspondant à la différence de quantité de mouvement entre le faisceau entrant  $i$  et le faisceau sortant  $e$  (réciprocité de Newton). (b) Plus le rayon en entrée est intense, plus la force ressentie est forte. (c) Il en résulte le déplacement  $v$  de la particule vers le côté du faisceau le plus intense, c'est-à-dire, pour un cône, vers le centre du faisceau : la particule est piégée et se déplace avec le faisceau. La pince optique est utilisée pour déplacer des cellules ou des organites, mais peut aussi être utilisée, en piégeant une bille, pour réaliser des mesures mécaniques sur des membranes cellulaires [73]. Un rayonnement infrarouge est généralement employé, car non dommageable envers les cellules.

pour le corps, certaines études cherchent au contraire à utiliser ce phénomène pour accélérer la régénération cellulaire, par exemple en introduisant des groupes amino libres sur des surfaces de PLA [80].

La structuration de la surface est aussi un point clef. Les architectures 3D sont couramment utilisées dans le milieu de l'ingénierie tissulaire, du fait que ces surfaces reproduisent plus fidèlement un environnement naturel. Une revue a été publiée sur le sujet par Abbott *et al.* en 2015 [81].

L'hydrophilie de surface (présence de groupes fonctionnels), sa structure et la rigidité du matériau doivent donc être considérées pour assurer une bioadhésion efficace. Le choix du procédé de modification de surface est donc une étape importante afin de contrôler au mieux l'état de surface. Nous allons nous attarder sur ce point dans la partie suivante.

## 1.4 Modification de surface et bioadhésion thermorégulée

Les surfaces, en tant qu'interfaces matériau/système vivant, ne jouent pas uniquement des rôles passifs. Bien au contraire, certaines surfaces peuvent jouer un rôle actif dans la migration, la différenciation ou encore la prolifération cellulaire. Ces phénomènes sont régis par les interactions matériaux/cellules. Ainsi, les surfaces jouent un rôle important dans la fonction même du biomatériau et peuvent être utilisées, par exemple, comme activateurs de la reconstruction tissulaire [61]. Dans ce domaine, appelé ingénierie tissulaire, l'adhésion des cellules à la surface est un facteur clef. La bioadhésion est un phénomène complexe qui implique de nombreux paramètres. Pendant longtemps, il a été difficile pour les scientifiques d'identifier clairement les mécanismes sous-jacents à ce phénomène. Ces mécanismes sont aujourd'hui mieux compris, et l'intérêt de la communauté scientifique pour cette question est, outre théorique, essentiel dans un certain nombre d'applications qui dépendent de l'affinité cellule/surface.

Afin de produire des *feuillets cellulaires* (FC), les propriétés de surfaces sont utilisées pour contrôler la bioadhésion. Après prolifération des cellules sur une surface bioadhésive, une diminution de cette dernière permet de retirer un feuillet de manière douce. Les feuillets ainsi produits ont montré de bonnes capacités d'intégration dans les tissus [82], ce qui en fait un outil intéressant pour la reconstruction tissulaire. Les surfaces intelligentes, pouvant être commutées entre un état «on» (adhésif) et un état «off» (non-adhésif) permettent la production de FC. Le PNIPAM est un polymère thermosensible. Ce dernier a suscité l'intérêt du fait de sa transition, appelée "*Lower Critical Solution Temperature*" (ou, en français, *température critique inférieure de solubilité*) (LCST), entre un état hydrophile et hydrophobe autour de 32 °C. Cette transition hydrophile/hydrophobe implique une modification dans sa capacité bioadhésive : il en résulte un polymère non adhésif à la température ambiante et adhésif à 37 °C, température du corps humain. Si son monomère est cytotoxique, le polymère ne semble pas montrer de toxicité pour de nombreux types cellulaires [83]. Ces caractéristiques font de ce polymère un des plus étudiés dans la littérature scientifique, avec pas moins de 2 800 articles recensés par Scopus depuis 2010<sup>7</sup>. Différentes méthodes de modification de surface permettent l'introduction de ce polymère fonctionnel en surface.

De manière générale, les traitements plasma sont probablement une des techniques les plus utilisées pour la modification de surface, à la fois pour introduire des groupes fonctionnels ou revêtir les surfaces avec un polymère [84]. En présence d'air, les surfaces sont oxygénées modifiant leur hydrophilicité [85]. Cette modification peut conduire à une augmentation de la bioadhésion, comme c'est le cas pour le polystyrène, très largement utilisé en culture cellulaire [65]. De plus, les traitements plasma permettent d'abraser la surface ce qui augmente la rugosité. Cette modification de topographie peut ainsi, dans

---

7. 2 800 articles recensés avec les mots clefs «PNIPAM» ou «PNIPAAM» contenus dans le titre, le résumé ou les mots clefs sur le site internet [www.scopus.com](http://www.scopus.com).

certains cas, augmenter l'affinité des cellules pour la surface, comme il a été reporté pour le polyméthylméthacrylate [86]. L'introduction de groupes réactifs permet de plus le greffage covalent d'entités organiques. En présence d'air, les surfaces ainsi activées peuvent par exemple modifiées par le greffage de monomère ou de polymère, comme le PNIPAM via un couplage type NHS<sup>8</sup>/EDC<sup>9</sup>, autrement dit par un couplage peptidique (voir section 3.3.1) [87]. Sous argon, les radicaux produits peuvent être utilisés, directement ou après exposition à l'air, pour créer des peroxydes capables d'initier une polymérisation [56].

Alors que les traitements plasma sont faciles à mettre en œuvre, ils ne permettent pas une structuration contrôlée de la surface. Il a été montré que la méthode utilisée pour incorporer du PNIPAM en surfaces influence les propriétés de bioadhésion obtenues. Par exemple, les surfaces produites par plasma montrent de meilleures adhésions cellulaires que celles produites par canon à électron [79]. Le contrôle de la structure est donc un critère significatif. Les structures en peigne (ou «brush» en anglais) permettent ce contrôle. Il s'agit de monocouches auto-assemblées, comme décrit figure 1.15. L'épaisseur et la densité de greffage sont des paramètres qui peuvent être contrôlés, en jouant sur le polymère greffé et son taux de greffage, respectivement. Ces structures sont ainsi largement utilisées, notamment pour les applications biomédicales, et ont montré de bonnes propriétés de bioadhésions [88]. L'intérêt de ces structures résidant entre autres dans le contrôle qu'elles permettent, il est alors nécessaire de pouvoir ajuster précisément la longueur de chaîne du polymère greffé. La *polymerisation radicalaire contrôlée (PRC)* permet ce contrôle et est majoritairement utilisée pour l'élaboration de structures en peigne (voir section 1.4.2).

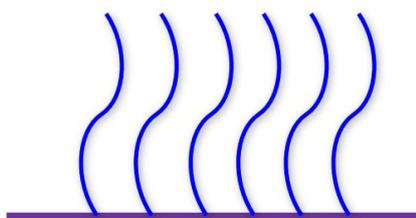


FIGURE 1.15 – Structure en peigne d'un polymère greffé sur une surface.

### 1.4.1 Les structures en peigne

Comme discuté section 1.4, le contrôle de l'état de surface est un challenge pour le développement de biomatériaux. Grâce aux progrès récents de la chimie, quantité de techniques existent pour greffer un polymère sur un biomatériau. Dans le cas des applications biologiques, le greffage covalent semble un choix cohérent comparé aux greffages phy-

---

8. N-hydroxysuccinimide

9. 1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide

siques à cause du risque de désorption inhérent à ce type d'interactions faibles. Les structures en peigne («brush» en anglais) sont aujourd'hui largement utilisées, notamment à cause la possibilité de contrôle qu'elles offrent et de leur modularité. Cette modularité est illustrée par la large gamme de systèmes développés ces dernières années : brushes uniformes, avec des motifs («patterns») ou encore des gradients (en termes de densité ou de composition chimique), et ce avec un ou plusieurs polymères [89, 90]. Ces structures, qui consistent en une couche mince de polymère auto assemblée, sont de fait particulièrement intéressantes lorsqu'il s'agit d'étudier la pénétration protéique afin d'optimiser la calibration de la structure [79, 90, 91]. En effet, comme vu précédemment (section 1.3), le rôle des protéines dans la bioadhésion est d'importance. la pénétration protéique est donc un phénomène clef et un modèle théorique a été proposé par Halperin *et al.* [92]. Ce modèle est centré sur les surfaces en peigne de PNIPAM, mais peut être généralisé pour tout type de système en peigne.

D'abord, il tient bon de considérer deux phénomènes d'interactions possibles lorsque l'on considère les interactions possibles entre une particule (p. ex. une protéine) et une surface en peigne. Le phénomène de compression, où les chaînes de polymères sont compressés par la particule, se produit lorsque la taille de cette dernière est supérieure à l'espace disponible entre ces les chaînes. Il faut néanmoins prendre en compte la capacité des chaînes de se réarranger autour de la particule. Ce phénomène compressif est typique des interactions cellules/peigne, les cellules étant de tailles relativement importantes. Le deuxième phénomène, insertif, se produit pour les petites particules, notamment les protéines de la MEC comme la fibronectine. Ainsi, l'influence de la densité de greffage des chaînes de la structure en peigne paraît évidente : des chaînes trop proches les unes des autres empêchent toute pénétration. Ceci étant dit, lorsqu'elle a lieu, la profondeur de pénétration peut aussi varier, donnant lieu à trois modes d'adsorption : primaire, secondaire et ternaire (figure 1.16). Une bonne affinité entre le substrat sous-jacent au peigne promeut une adhésion primaire, alors qu'une densité de greffage élevé tend à supprimer l'adsorption primaire, voire ternaire, du fait de l'augmentation de l'encombrement stérique [92, 93]. Ces deux types d'adsorption favorisent la bioadhésion, alors que

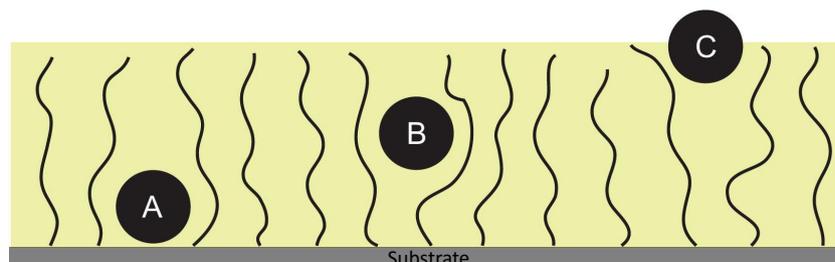


FIGURE 1.16 – Trois types d'interactions protéines/substrat sont possibles : (A) adsorption primaire, (B) adsorption ternaire et (C) adsorption secondaire. Adapté depuis la Ref [92]

les modèles théoriques tendent à limiter l'adsorption secondaire aux seuls cas de larges protéines cylindriques [91, 94]. Néanmoins, si l'adsorption ternaire rend possible la bioadhésion, son effet sur la dénaturation protéique reste à étudier [92]. Enfin, une couche de peigne courte (*c.-à-d.* bas poids moléculaire des chaînes greffées) facilite l'interaction entre protéines adsorbées (primaire ou ternaire) et cellules, augmentant la bioadhésion. En effet, la cellule doit pouvoir s'accrocher à la protéine ainsi adsorbée, via ses récepteurs membranaires (intégrines). Des protéines pénétrant trop profondément ne sont donc pas disponibles pour la cellule. L'amincissement de la structure en peigne permet de limiter le phénomène.

Nous voyons ainsi, outre l'effet de la densité de greffage, la nécessité du contrôle de la longueur des chaînes constituant de la couche en peigne. Pour ce faire, différents outils existent, et seront développés dans la section suivante.

### 1.4.2 Les méthodes de greffages

Comme nous l'avons vu, la nécessité du contrôle de la longueur des chaînes constitutives d'une structure en peigne est importante. Parmi les possibilités de synthèse offertes par la chimie moderne, le PRC permet une approche versatile et efficace [89]. Parmi cette classe de polymérisation, on retrouve :

- la polymérisation contrôlée par les nitroxydes (ou, en anglais, *nitroxide mediated polymerization* (NMP))
- la polymérisation contrôlée par transfert d'atome (ou, en anglais, *atom rransfert radical polymerization* (ATRP))
- la polymérisation contrôlée par transfert de chaînes par addition-fragmentation réversible (ou *polymérisation radicalaire contrôlée par transfert de chaîne réversible par addition-fragmentation* (RAFT))

La NMP est un type de polymérisation vivante. En d'autres termes, la NMP permet de contrôler la quantité de chaînes actives durant la polymérisation [95]. En l'occurrence, il s'agit de «piéger» les radicaux formés par l'initiateur afin de maintenir une concentration faible en radicaux actifs, comme présenté figure 1.17. Comme le laisse présumer son nom, la NMP utilise pour ce faire un médiateur nitroxyde, typiquement dérivé du TEMPO<sup>10</sup> (figure 1.17, droite). L'utilisation de ce type de polymérisation peut permettre la production de surface bioadhérantes. Néanmoins, dans le cas du PNIPAM, sa polymérisation par NMP est peu étudiée, et la NMP nécessite généralement la synthèse du dérivé nitroxyde [96].

Plus communes, l'ATRP et la RAFT sont souvent utilisées du fait de leur versatilité, et leur utilisation avec le PNIPAM est plus largement connue. Comme les autres PRC, ces polymérisations contrôlées permettent de réduire la polydispersité (mesurée par l'*indice*

---

10. (2,2,6,6-Tétraméthylpipéridin-1-yl)oxy

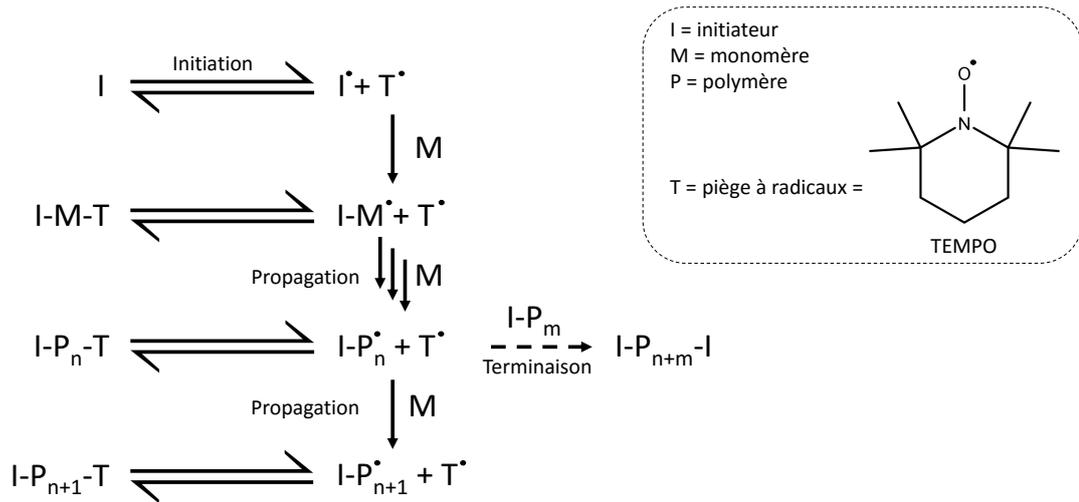


FIGURE 1.17 – Principe de la NMP : une partie des radicaux est piégée par les nitroxydes (T) afin de limiter la quantité d'espèces réactives dans le milieu. La molécule TEMPO est capable de piéger et de former des radicaux stables.

de polydispersité (IP) des polymères synthétisés. Elles s'appuient sur les équilibres entre chaînes actives et les chaînes dormantes, et sont ainsi parfois qualifiées de «vivantes».

Toutefois, la synthèse du polymère n'est pas suffisante. Il s'agit d'obtenir ce polymère sur une surface afin d'obtenir une structure en peigne. Deux stratégies s'offrent alors aux chimistes : le "grafting to" (greffage sur la surface) et le "grafting from" (greffage depuis la surface, aussi appelée PIS) [90, 97]. Ces deux approches sont explicitées figure 1.18.

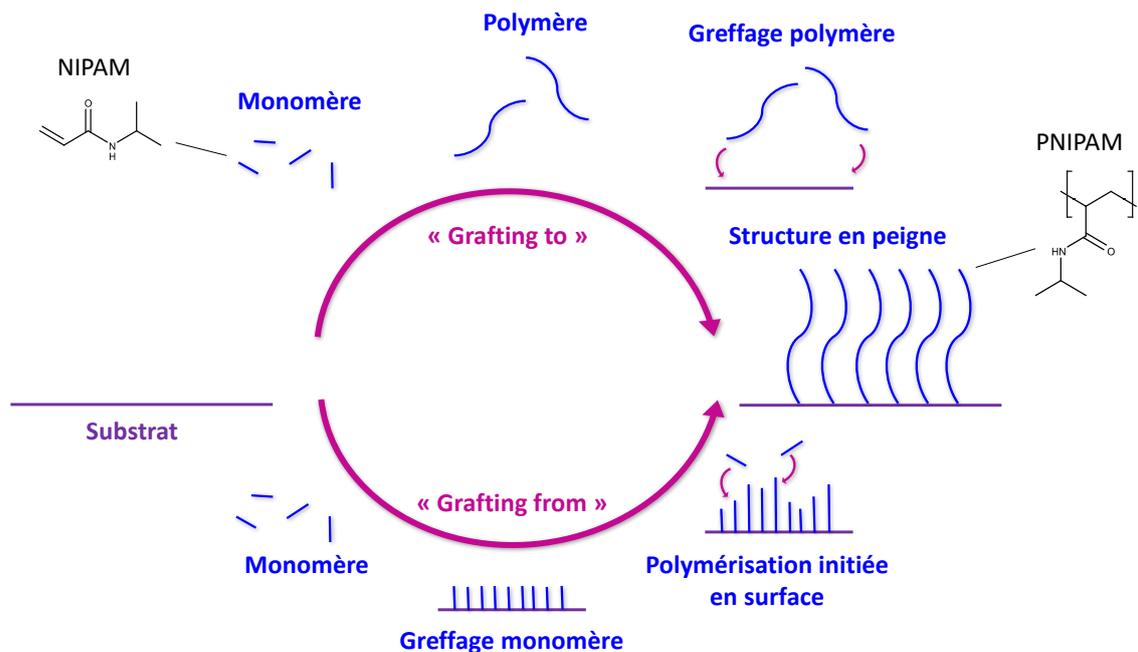


FIGURE 1.18 – Les deux différentes stratégies permettant d'obtenir une structure en peigne : le greffage d'un polymère sur la surface («grafting to») ou la polymérisation, initiée en surface, d'un monomère («grafting from»).

Le "*grafting to*" consiste à coupler un polymère fonctionnalisé en bout de chaîne avec la surface, elle-même réactive. Le polymère greffé peut être commercial ou synthétique. Comme les phases de polymérisation et de greffage demeurent séparées, cette approche permet de greffer des polymères très bien définis. En contrepartie, l'étape de greffage conduit à une restriction de la taille des polymères qui peuvent être greffés, et donc à l'épaisseur de la couche produite (typiquement 100 nm [98]), ainsi que de la densité de greffage, du fait des contraintes stériques et des phénomènes de diffusion en surface [99–102].

Le "*grafting from*" repose quant à lui sur la polymérisation directement depuis la surface. Différentes stratégies peuvent être utilisées durant ce procédé. La PIS basée sur la chimie radicalaire est communément utilisée [98, 102, 103]. Les techniques de "*grafting from*" permettent d'atteindre des densités et des épaisseurs de greffage plus importantes que le "*grafting to*", faisant de cette stratégie la plus fréquente. Cependant, la caractérisation est plus difficile. Des surfaces modèles (Ti, Au ou encore Si) sont donc le plus souvent utilisées. Pour les autres types de surfaces (p. ex. à base de polymères), la caractérisation reste un défi de taille.

De nombreuses possibilités existent, à la fois pour le "*grafting to*" et le "*grafting from*" [98, 104, 105]. Parmi les techniques employées, l'ATRP et la RAFT sont les plus employées et seront développées dans la section suivante.

#### 1.4.2.1 Atom transfert radical polymerisation (ATRP)

Tout comme la NMP, l'ATRP repose sur un équilibre entre la quantité de chaînes actives (porteuses de radicaux) et dormantes [97, 98, 106, 107]. L'ATRP est versatile et est faisable dans des conditions douces [102, 108, 109]. Cependant, de hautes températures ( $\approx 100$  °C) réduisent le temps de polymérisation et permettent, dans certains cas, une réduction de la polydispersité [110]. Le mécanisme, qui suit une pseudo-cinétique d'ordre 1, est décrit figure 1.19. En premier lieu, un radical est spontanément produit par la réduction

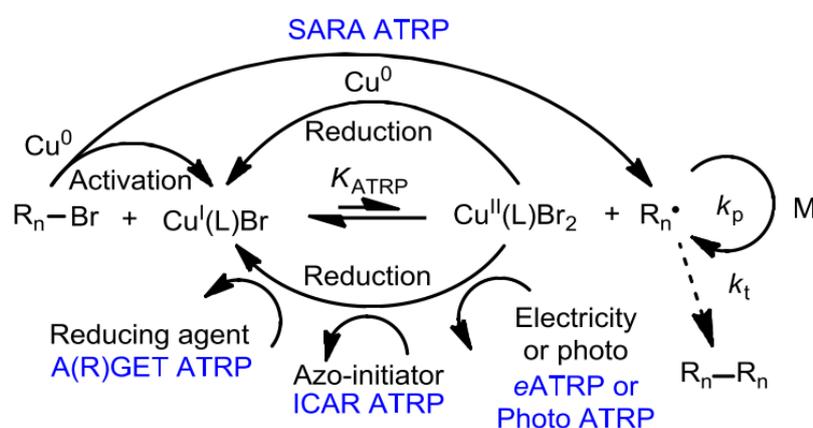


FIGURE 1.19 – Mécanismes d'ATRP avancées catalysés par le couple Cu(I)/Cu(II). Adapté de la Ref [105].

tion d'un bromure d'acyle (classiquement le  $\alpha$ -*Bromoisobutyryl bromide* (BIBB)) par l'action d'un métal réducteur. Va ensuite s'installer un équilibre entre les espèces réduites et oxydées, les radicaux se transférant d'atome en atome. L'ATRP nécessite donc l'usage d'un métal comme catalyseur. Ce métal, par cycles d'oxydation/réduction, va générer/absorber (respectivement) des radicaux dans le milieu de réaction, conduisant à l'activation / désactivation des chaînes polymériques. L'équilibre qui en résulte permet de limiter le nombre d'espèces actives et donc les réactions de terminaisons (recombinaison) ou parasites. Classiquement, des complexes de cuivre sont utilisés à cause de leur activité catalytique efficace via le couple Cu(II)/Cu(I) [111, 112]. La présence de ce métal peut être problématique, notamment dans le cadre d'applications biomédicales. Il en suit des procédés de purifications contraignants et coûteux. L'ATRP peut être catalysée par de faibles quantités de fer (lui aussi sous forme de complexe, via le couple Fe(III)/Fe(II)). Cette alternative réduit le risque toxicologique, le fer étant considéré comme moins toxique, à la fois pour le corps mais aussi pour l'environnement, que le cuivre [113–115]. Le fer est aussi le métal le plus abondant sur terre ce qui en fait une matière première peu chère. Ces caractéristiques sont à l'origine d'une part importante de la recherche autour de la chimie organique catalysée par ce dernier, ce qui inclut l'ATRP, dans une perspective de «chimie verte» [116, 117]. Le choix du ligand pour former le complexe est lui-même une question complexe [118] : par exemple, la pentamethyldiethylenetriamine (PMDETA) peut être utilisée en combinaison avec Cu [119], la tris(3,6-dioxaheptyl)amine (TDA) avec Fe [120]. En outre, l'ATRP *regénérée par transfert d'électron* (ARGET-ATRP), développée par Matyjaszewski *et al.* dans les années 2 000, permet de réduire la quantité de catalyseur nécessaire (< 50 ppm). Cette ATRP avancée est dérivée de l'ATRP *générée par transfert d'électron* (AGET-ATRP). Dans l'ARGET-ATRP, l'ajout d'un agent réducteur, par exemple l'acide ascorbique (aussi appelée vitamine C) [121], permet d'initier les cycles d'oxydation/réduction du métal, créant des radicaux et démarrant donc la polymérisation. Cet ajout permet de travailler avec des espèces métalliques oxydées (p. ex. Cu(II) ou Fe(III)) et d'éviter des étapes préparatives de réduction du métal nécessitant en outre des précautions particulières telles que la manipulation sous atmosphère contrôlée. Dans le cas de l'ARGET-ATRP, un excès d'agent réducteur est utilisé. Ainsi, l'initiateur ne fait pas que générer les radicaux, il maintient aussi une quantité suffisante de métal réduit (p. ex. Cu(I) ou Fe(II)) nécessaire au bon équilibrage radicalaire du système sans avoir besoin d'ajouter un composé radicalaire organique qui pourrait conduire à des réactions parasites, de la réticulation ou la formation de nouvelles chaînes [106]. La quantité de métal initiale est alors réduite, et la tolérance à l'air du système est augmentée, permettant éventuellement d'effectuer la réaction en système ouvert [122, 123].

Dans le cas de l'ARGET-ATRP, l'acide ascorbique est préférable aux agents réducteurs à base d'étain du fait de sa non-toxicité envers les êtres humains et l'environnement. Cependant, l'acide ascorbique est un agent très réducteur ( $E^{\circ} = 0,13V$ ) et tend à dérégler l'équilibre  $M_{ox}/M_{red}$  vers l'espèce réduite, ce qui amène une diminution du contrôle de

la polymérisation. Il est alors possible d'utiliser un moins bon solvant, comme l'anisole, dans le but de diminuer l'activité réductrice de l'acide ascorbique [121, 123].

D'autres types d'ATRP existent. On peut par exemple citer la «*supplemental activator and reducing agent*» (SARA) ATRP. Dans cette technique, le métal est utilisé au degré d'oxydation 0 [117, 124]. En utilisant de la poudre de fer métallique, on peut par exemple catalyser la polymérisation avec ou sans ajout de sels de Fe(III), bien que l'absence de ce dernier augmente la polydispersité [110, 125].

L'ATRP est utilisée dans de nombreuses applications. Il est cependant intéressant de prendre note de certaines applications biomédicales utilisant cette stratégie : membranes *antifouling* [126], membranes de cellulose multi sensibles [127, 128], attachement/détachement de cellules (via greffage de PNIPAM) [119, 124].

L'ATRP initiée en surface (SI-ATRP) est une technique de "grafting from". L'idée est de greffer chimiquement le bromure d'acyle (par exemple le BIBB) afin d'initier la polymérisation directement depuis la surface. La caractérisation directe des polymères ainsi formés en surface étant difficile, il est usuel de rajouter une petite quantité (dite sacrificielle) d'initiateur dans le milieu afin de former des chaînes de polymères libres, plus faciles à caractériser (voir section 1.4.1). Les avantages principaux de l'ATRP résident la possibilité d'obtenir un contrôle fin de la longueur de chaîne [98]. Il est aussi possible de contrôler l'épaisseur et la densité de la couche greffée de manière séparée, en jouant sur le temps de réaction et les proportions stœchiométriques, respectivement [108, 129]. Des exemples d'ATRP, utilisant le PNIPAM, sont donnés tableau 1.2.

On voit ainsi la variété des applications possibles via le greffage de PNIPAM par ATRP, incluant la bioadhésion thermorégulée. L'ATRP n'est cependant pas la seule option possible et la RAFT se présente comme une alternative intéressante.

#### 1.4.2.2 Reversible Addition-Fragmentation chain Transfer radical polymerisation (RAFT)

De la même manière que pour l'ATRP et la NMP, la RAFT repose sur un équilibre entre les espèces actives et dormantes et suit une pseudo-cinétique d'ordre 1. Cependant, l'initiation est dans ce cas plus traditionnelle puisqu'il s'agit, dans les cas classiques, d'utiliser un initiateur radicalaire organique tel que l'*azobisisobutyronitrile* (AIBN) ou l'*acide 4,4'-Azobis(4-cyanopentanoïque)* (ACVA), ce dernier ayant l'avantage d'être fonctionnalisé par un acide carboxylique, ce qui permet son greffage sur une surface, avant ou après la polymérisation.

TABLEAU 1.2 – Exemples de modifications de surfaces par greffage de PNIPAM via les procédés ATRP ou RAFT.

PRC	Stratégie	Substrat	Solvant	Application	Références
ATRP	grafting from	<i>polyéthylène (PET)</i>	eau	perméation membranaire thermocontrôlée	[130]
		Au	eau/méthanol	perméation membranaire thermocontrôlée	[131]
		graphène	eau	graphène thermodispersable	[132]
		<i>poly(<math>\epsilon</math>-caprolactone (PCL))</i>	eau/méthanol	bioadhésion thermocontrôlée	[119]
RAFT	grafting to	parylène C	<i>diméthylformamide (DMF)</i> /eau	bioadhésion thermocontrôlée	[133]
		Si	eau/méthanol	étude de l'hydrophilicité des structures peignes	[134]
		cellulose	variable	papier thermosensible	[135, 136]
		films Si mésoporeux	eau	thermosenseur / relargage thérapeutique thermocontrôlée	[137]
		nanoparticules Au	eau	senseur protéique	[138]
		nanoparticules Si	DMF	particules hybrides thermosensibles	[139]
		reuses			
		éponge aminée	DMF	éponge thermosensible	[140]
		cellulose	variable	papier thermosensible	[135, 141]
		verre	dioxane	bioadhésion thermocontrôlée	[142]

Un *agent de transfert de chaîne, aussi appelé agent RAFT (CTA)* assure l'équilibre durant les étapes de propagation : après la formation du radical par l'initiateur, le CTA peut capter ce dernier via l'addition du polymère  $P_n$  (ou éventuellement du monomère, figure 1.20) [143, 144]. Durant la propagation, le CTA peut alors transférer le radical sur une deuxième chaîne  $P_m$ , déjà additionnée, par fragmentation. Dans ce cas, le radical se retrouve porté par une deuxième chaîne polymérique ( $P_m$ ) ainsi activée, tandis que la chaîne initialement porteuse du radical ( $P_n$ ) est désactivée. La réduction du nombre de chaînes actives permet ainsi une distribution de tailles obtenue plus étroite, avec un  $IP_s$  pouvant descendre, dans le cas du PNIPAM, jusqu'à 1,20, voire en dessous de 1,10 dans des conditions optimales [142, 145, 146]. Par exemple, il a été obtenu des  $IP$  inférieurs à 1,3 pour la polymérisation *RAFT initiée en surface (SI-RAFT)* du PNIPAM sur des substrats polymères [140]. En outre, la RAFT peut être effectuée sur une large gamme de température, allant de la *température ambiante (TA)* à 140 °C [147]. Une température élevée permet des temps de réaction plus courts, avec parfois une diminution de l' $IP$ . Cependant, la dissociation homotypique de l'initiateur, accélérée par l'augmentation de la température, conduit à un nombre de chaînes actives accru ce qui peut limiter le contrôle. La température doit alors être judicieusement choisie.

L'un des avantages majeurs de la RAFT comparé à l'ATRP est l'absence de métal dans le mécanisme et, pour cette raison, cette polymérisation a été choisie pour la polymérisation du *N-isopropylacrylamide (NIPAM)*. En contrepartie, un CTA est nécessaire. Ce dernier est souvent synthétisé en laboratoire mais il existe quelques composés commerciaux

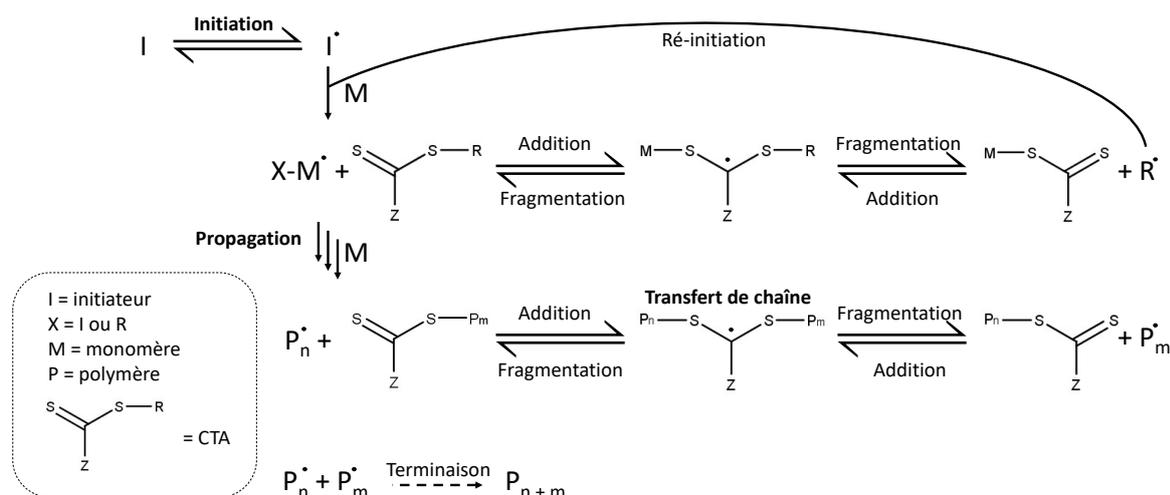


FIGURE 1.20 – Mécanisme de la polymérisation RAFT. Après initiation, le CTA peut former des radicaux stables par addition d'une chaîne active, la rendant inactive. Ce processus permet de diminuer le nombre de chaînes actives et donc les réactions de terminaison. En conséquence, le contrôle de la taille du polymère formé est augmenté. Lorsqu'il porte un radical, le CTA peut aussi transférer ce dernier de chaîne en chaîne par fragmentation, d'où le nom de polymérisation par transfert de chaîne réversible par addition-fragmentation.

comme l'acide cyanovalérique<sup>11</sup>. De manière générale, l'agent RAFT est le plus souvent composé d'un groupement thiocarbonylthio (S=CZ-SR). C'est cet agent qui va s'ajouter/se fragmenter au cours de la réaction. Ainsi, le choix de ses substituants, Z et R, est important. Le groupement Z favorise l'activation de la double liaison, en stabilisant le radical ainsi formé; R est quant à lui un groupe partant permettant de faire place à une chaîne polymérique afin de permettre le transfert de radical. La simple optimisation du choix du CTA est un travail d'envergure, une revue complète de la littérature sur le sujet est disponible au lecteur qui le souhaite [147]. Grâce à la présence de soufre sur le CTA, l'analyse élémentaire est facilitée. La masse moléculaire théorique,  $M_{n,th}$ , peut être calculée selon l'équation :

$$M_{n,th} = \frac{[Mono]_0}{[CTA]_0} \times M_{mono} \times \%_{conv} + M_{CTA} \quad (1.2)$$

où  $M_{mono}$  représente la masse moléculaire du monomère,  $[Mono]_0$  sa concentration initiale,  $\%_{conv}$  est le pourcentage de conversion du monomère,  $M_{CTA}$  est la masse moléculaire du CTA et  $[CTA]_0$  sa concentration initiale [140, 148].

Afin d'effectuer une SI-RAFT, l'initiateur [142] ou le CTA [140] doivent être préalablement greffés sur la surface. Dans le premier cas, la *rupture homolytique* de l'initiateur va donner lieu à la formation d'un radical et donc à la croissance du polymère à la fois sur la surface et dans le milieu. Dans le cas d'un greffage préalable du CTA, il est coutume d'ajouter une autre quantité d'agent RAFT directement dans la solution afin de polymériser, selon un mécanisme RAFT, des chaînes de polymères en solution et de faciliter la caractérisation (voir section 1.4.1). Dans les deux cas, les chaînes «libres» produites peuvent servir à la caractérisation, la caractérisation directe sur la surface étant difficile. Quelques exemples de RAFT sont donnés tableau 1.2.

#### 1.4.2.3 Caractériser les structures peignes

La caractérisation des chaînes de polymère greffées va dépendre de la stratégie de greffage choisie. Ainsi, le "*grafting to*" permet la synthèse du polymère dans une étape différenciée de celle du greffage. Les techniques classiques de caractérisation de polymère sont donc applicables : viscosimétrie, *chromatographie d'exclusion stérique* (CES), *résonance magnétique nucléaire* (RMN) ou encore spectroscopie *infrarouge à transformée de Fourier* (FTIR). Ces techniques permettent en outre de déterminer la structure du polymère, notamment en donnant des indications sur sa longueur de chaîne. Ce critère est déterminant puisqu'il définira l'épaisseur de la couche en peigne une fois greffée. Cette section donne des informations générales, tout en gardant en tête leur utilisation pour le cas du PNIPAM, qui sera lu introduit plus en détail section 1.4.3.

Dans le cas du "*grafting from*", il est donc d'usage de former, parallèlement à la crois-

11. Acide 4,4'-azobis(4-cyanovalérique).

sance du polymère sur la surface, des chaînes de polymère libres, en ajoutant un initiateur en solution par exemple (voir sections 1.4.2.1 et 1.4.2.2). On suppose alors, bien qu'hypothèse délicate, que le polymère formé en solution est comparable à celui formé en surface [102, 103, 108, 109, 149–152]. Il est néanmoins parfois possible, dans le cas de systèmes réversibles, de détacher les chaînes une fois formées afin de caractériser directement ces chaînes de surface [145]. A cet effet, la chimie «click» type «Diels-Alder» peut être une voie de synthèse intéressante [104].

Pour ce qui est de la caractérisation de la couche en peigne elle-même, différents outils sont disponibles. La morphologie, la densité de greffage ainsi que l'épaisseur sont des paramètres intéressants pour l'expérimentateur. L'AFM est un outil puissant qui permet de déterminer la morphologie de surface, l'uniformité ou l'épaisseur de la couche greffée. Par exemple, le changement de conformation lié aux variations de température du PNIPAM peut être observé par AFM [153]. De plus, il est possible d'étudier les interactions entre la surface et une pointe d'AFM, cette dernière pouvant éventuellement être fonctionnalisée : on mesure dans ce cas l'interaction entre la surface en peigne et le composé greffé sur la pointe [154, 155]. Les observations AFM sont cependant délicates et requièrent des substrats exempts de rugosité micrométrique.

La *résonance des plasmons de surface (SPR)* permet d'obtenir l'épaisseur mouillée de la couche, *c.-à-d.* son épaisseur dans un environnement liquide, prenant ainsi en compte les phénomènes de gonflement. L'épaisseur sèche, *c.-à-d.* en absence de liquide, peut elle être déterminée par *ellipsométrie* [153]. L'AFM peut aussi être utilisée, cependant, dans le cas du PNIPAM, des erreurs systématiques ont été reportées du fait de la présence d'interactions attractives entre la pointe d'AFM et la couche de PNIPAM [156]. Une fois de plus, ces techniques restent généralement applicables aux seules surfaces modèles, type silicium, du fait de la nécessité d'un état de surface lisse.

La densité de greffage demeure compliquée à déterminer. Toutefois, elle peut être déduite de l'épaisseur sèche via l'équation :

$$\sigma = \frac{h\rho N_A}{M_n} \quad (1.3)$$

avec  $\sigma$  la densité de greffage,  $h$  l'épaisseur sèche,  $N_A$  le nombre d'Avogadro et  $M_n$  la masse molaire. La densité sèche des chaînes de PNIPAM,  $\rho$ , est parfois prise arbitrairement égale à  $0,95 \text{ g.cm}^{-3}$  par certains auteurs [91, 157], mais la densité réelle peut être mesurée par une technique d'oscillation dans un tube en U (en anglais U-tube oscillation) [158] ou *réflectométrie des rayons X (XRR)* [159, 160]. L'interdépendance entre  $\sigma$  et  $\rho$  rend l'utilisation de cette valeur de  $0,95 \text{ g.cm}^{-3}$  *talis qualis* discutable, mais nécessité faisant elle permet d'obtenir une idée, si ce n'est quantitative, au moins comparative, de la densité de greffage. Certains auteurs déterminent aussi cette densité par FTIR [161]. Quoi qu'il en soit, la détermination de la densité de greffage, même comparative, reste une tâche difficile, souvent limitée aux surfaces modèles.

L'analyse chimique des surfaces peut se faire par les techniques classiques tels que : *spectrométrie photoélectronique X* (XPS), *réflectance totale atténuée* (ATR-IRTF), ou encore spectroscopie Raman. Pour les couches nanométriques, ce qui est typiquement le cas des structures en peigne, l'XPS est préférable à l'ATR-IRTF, celui proposant une profondeur de pénétration plus faible (quelques nm pour l'XPS contre une profondeur pouvant aller jusqu'à 1 µm pour ATR-IRTF [67]). L'influence du substrat sous-jacent pourra alors dans ce dernier cas rendre difficile la discrimination substrat/peigne des composantes du signal. Il en est de même pour la spectroscopie Raman qui propose une résolution en  $z$  supérieur au micron [162]. La *spectrométrie de masse à ionisation secondaire* (SIMS) peut permettre d'obtenir des signaux encore plus localisés en surface. En effet, cette technique consiste à pulvériser le matériau, couche par couche, grâce à un rayon ionique; un détecteur collectera alors les informations (masses par exemple) des fragments pulvérisés. Cette technique reste cependant complexe à mettre en œuvre, ce qui explique sa présence limitée dans la littérature du domaine. Finalement, l'XPS reste la technique de choix pour la caractérisation chimique des surfaces peignes.

Les microbalances à quartz permettent d'évaluer la quantité d'une entité déposée sur une surface. La détermination de la quantité de protéines adsorbées sur la surface d'un biomatériau est obtenue en mesurant, in situ, la variation de fréquence de vibration du quartz [62]. Des microbalances à quartz avec contrôle de la dissipation sont aussi utilisées pour observer le gonflement d'un polymère en surface [134]. Enfin, la AMFC permet d'obtenir des informations sur l'exocytose cellulaire (cinétique et quantité sécrétée) et ainsi d'évaluer l'impact du substrat sur l'activité cellulaire [79].

Toutes ces techniques sont cependant difficiles à réaliser sur des systèmes «polymère sur polymère», notamment à cause de la rugosité de surface. Certaines sont donc réservées pour les systèmes utilisant des substrats modèles (par exemple Si, Au ou Ti), ce qui explique souvent le manque de caractérisations des structures type «peignes» dans la littérature. L'XPS peut cependant permettre la caractérisation chimique d'un substrat alginate/chitosane fonctionnalisé par un polymère thermosensible en surface peigne.

### 1.4.3 Vers une adhésion thermorégulée : PNIPAM

Le *poly(N-isopropylacrylamide)* (PNIPAM) est un polymère thermosensible (structure figure 1.21). Par thermosensible, il est entendu que les interactions qu'entretient le PNIPAM avec l'eau vont dépendre de la température. Plus particulièrement, ce dernier passe

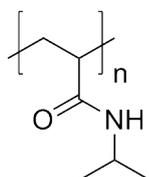


FIGURE 1.21 – Structure du PNIPAM.

d'hydrophile à hydrophobe lorsque la température augmente. Cette transformation n'est pas graduelle et s'effectue à une température de transition appelée "*Lower Critical Solution Temperature*" (ou, en français, *température critique inférieure de solubilité*) (LCST), qui se situe autour de 32 °C. Cette transition, endothermique, s'accompagne d'un changement de conformation : en dessous de sa LCST, le PNIPAM est «expansé», il se croqueville alors sur lui même en passant le seuil de température critique. Cet écrasement des chaînes polymériques est associé à la compétition entre les énergies d'interactions polymère/eau et polymère/polymère (inter- et intramoléculaires). En d'autres mots, en dessous de sa LCST, le PNIPAM est lié à l'eau par une liaison hydrogène amide/eau ( $C=O \cdots H-O$ ). Au passage de la LCST, le polymère se déshydrate et l'on peut observer la formation de liaisons hydrogène amide/amide ( $C=O \cdots H-N$ ) intra- et intermoléculaire [163, 164]. Dans le cas des surfaces greffées avec du PNIPAM, cela signifie simplement que la couche superficielle existe soit dans un régime «peigne» ( $T < LCST$ ), soit dans un régime collapsé dit «champignon» («mushroom») ( $T > LCST$ ). Si l'on considère généralement la température de 32 °C, la LCST du PNIPAM dépend de la longueur de chaîne et de la densité de greffage, cependant ces variations sont faibles (1 à 2 degrés au maximum) et cette température reste dans tous les cas entre la température ambiante (25 °C) et corporelle (37 °C) [156]. Néanmoins, outre les facteurs structurels, la température de transition peut être fortement affectée lorsque le PNIPAM est utilisé en copolymère [165] ou lorsque des sels sont présents dans le milieu [77, 166]. Dans le premier cas, l'adjonction d'un polymère hydrophile (hydrophobe) sous forme de copolymère va défavoriser (favoriser) la déshydratation, ce qui conduit à une augmentation (diminution) de la LCST. En ce qui concerne les sels, les ions  $Cl^-$  et  $CH_3COO^-$  tendent à diminuer la LCST, tandis que les ions  $SCN^-$  tendent à l'augmenter, comme prédit par la série de *série de Hofmeister* [77]. Il faut toutefois relativiser l'influence possible des ions sur la LCST dans les milieux biologiques, leurs concentrations étant relativement faibles (inférieur à 0,15 M). De la même manière, une forte concentration protéique peut avoir une influence, allant de -2,6 °C à 1,5 °C en fonction de la protéine [164] et, à forte concentration, l'adsorption protéique au-dessous et en dessous de la LCST sont similaire [167], même si une fois de plus les conditions utilisées dans ces études ne sont pas représentatives des milieux biologiques.

Les interactions protéine/surface peuvent donc être modulées par la température du PNIPAM. Ces variations ont pu être directement observées par AFM [156, 168]. Une pointe d'AFM fonctionnalisée avec de l'*albumine de sérum bovin* (ASB) a été utilisée pour observer, en fonction de la température, les forces d'interaction protéine/PNIPAM structuré en peigne. Il est alors apparu des phénomènes d'adsorption (force attractive) au-dessus de la LCST, comme attendu [154]. Ce même phénomène a pu être mesuré par microbalance à quartz. Le mécanisme en jeu est relié à l'hydratation du PNIPAM mais n'est pas encore bien connu. Néanmoins, la conséquence directe de ce phénomène a pu être observée dans de nombreuses études : le PNIPAM est capable de déclencher l'attachement cellulaire en fonction de la température. Au-delà de leur effet sur la LCST, la densité de greffage

et la longueur de chaîne jouent aussi un rôle sur la bioadhésion en agissant sur l'adsorption protéique, avec une résistance à l'adsorption corrélée à l'absence de bioadhésion [93]. Cela s'explique par la difficulté des protéines de pénétrer la couche de PNIPAM à cause des contraintes stériques (voir section 1.3).

A 37 °C, de nombreuses cellules adhèrent aux surfaces à base de PNIPAM. C'est par exemple le cas de cellules endothéliales d'aorte bovines [169], de FPHs [60], de fibroblastes de souris (L2929) [113], de cellules issues de carcinomes de foie humain (HePG2) [170] ou encore d'ostéoblastes de souris (MC3T3-E1) [171]. Après adhésion, ces cellules peuvent être libérées en abaissant la température [169]. Typiquement, le détachement cellulaire s'effectue à 20 °C [92]. Cette propriété permet de cultiver des cellules puis de les détacher de manière douce, sans utilisation de trypsine qui, par son mode d'action, tend à endommager les cellules. Ce procédé est aujourd'hui utilisé pour la production de *feuillelet cellulaire* (FC) [172]. Ces feuillets peuvent être mono ou multicouches, sont utilisés pour la régénération tissulaire et ont montré de bonnes capacités d'intégration dans les tissus [82]. Des études *in vivo* ont été menées pour le traitement de plusieurs pathologies : dégénérescence cartilagineuse [173], tissus cornéens [174] ou cardiaques [175] endommagés. Il est intéressant de noter que lors du processus de fabrication de FC, une couche de protéines issues de la *matrice extra cellulaire* (MEC) reste sur le support après détachement des cellules. Les chercheurs ont essayé de déterminer sa composition et il a été déterminé que la majeure partie de la fibronectine se détachait avec les cellules [176]. Cette couche rémanente est cependant capable de promouvoir de nouvelles cultures cellulaires, ce qui montre son caractère viable.

Beaucoup de systèmes ont été élaborés par greffage de PNIPAM en peigne. Plusieurs exemples de surfaces élaborées via des procédés de polymérisations radicalaires sont présentés tableau 1.2. Pour citer quelques exemples, grâce à l'introduction de groupements réactifs via traitements plasma, du PNIPAM a pu être greffé ("*grafting to*") par pontage amide [87] ou directement par SI-ATRP [177]. Toujours par ATRP, des surfaces de PNIPAM, combiné avec du *poly(ethylene glycol) monomethacrylate* (PEGMA), sur des substrats silicium ont montré leur efficacité pour l'adhésion/détachement de fibroblastes [178]. Dans cas, une augmentation de l'épaisseur a permis une meilleure prolifération cellulaire au bout de 2 jours. Dans tous les cas, aucune bioadhésion n'a été observée sous la LCST, indépendamment de l'épaisseur (3 nm, 11 nm ou 31 nm). La combinaison avec le PEGMA a cependant permis un meilleur détachement des cellules, grâce aux propriétés *antifouling* de ce dernier. L'épaisseur optimale, pour l'adhésion/détachement, de PNIPAM pour la culture de *cellules endothéliales* se situe autour de 15 nm [179], ce qui, dans une première approximation, peut être assimilé à une couche de PNIPAM greffée de l'ordre de 15 000 g/mol [123]. L'adhésion était quant à elle supprimée pour des épaisseurs supérieures à 30 nm, alors qu'une étude menée par Mizutani *et al.* a montré que des peignes de PNIPAM sur du *polystyrène* (PS) pouvaient maintenir une adhésion jusqu'à des épaisseurs de 60 nm [161]. Dans ce dernier cas, la meilleure adhésion était ob-

servée pour des épaisseurs faibles (1,8 nm). Takahashi *et al.* ont de leur côté développé des peignes via **SI-RAFT** sur des substrats en verre et ont étudié de manière indépendante l'influence de la densité et de l'épaisseur de greffage sur la bioadhésion [142]. Cette étude a montré une fois de plus que la quantité de cellules adhérentes augmentait avec l'abaissement de la densité. De plus, une meilleure bioadhésion fut observée lorsque les chaînes du peigne étaient plus courtes, alors qu'en contrepartie le détachement cellulaire nécessite des chaînes suffisamment longues. L'explication réside dans la nécessité de «pousser» les cellules de la surface par le gonflement du **PNIPAM** qui s'hydrate lors de la diminution de température. Ainsi, on voit qu'une épaisseur fine permet l'adhésion cellulaire, alors qu'une épaisseur élevée permet le détachement. Pour la production de feuillets cellulaires, un équilibre est alors à trouver. En outre, des épaisseurs importantes peuvent aussi supprimer l'adhésion, le **PNIPAM** peut alors être un candidat potentiel pour les surfaces *antifouling*.

Zhao *et al.* ont ainsi étudié les propriétés *antifouling* du **PNIPAM** greffé sur du polyuréthane envers des fibrinogènes et de l'*albumine de sérum humain* (**ASH**). Il est alors apparu que la thermosensibilité de l'hydrophilie de ces surfaces n'était pas significative sur des épaisseurs de **PNIPAM** faibles, et que l'adsorption protéique diminuait fortement avec l'augmentation de l'épaisseur. Cet effet peut être attribué à la plus grande hydrophilie des couches épaisses. En conséquence, les cellules n'adhèrent pas aux peignes épais, donnant lieu à des surfaces *antifouling*. Yu *et al.* ont montré cette dépendance de la sensibilité thermique de la mouillabilité envers l'épaisseur de **PNIPAM** sur des substrats **Si (SI-ATRP)**. Ils ont réussi à produire des surfaces non-adsorbantes pour l'**ASH**, et ce même avec des épaisseurs fines (< 15 nm) [180]. La variation de l'angle de contact et de l'adsorption entre 27 °C et 37 °C n'est cependant pas notable à ces faibles épaisseurs. A l'inverse, cette thermosensibilité, à la fois sur la mouillabilité et l'adsorption protéique, est bien plus présente pour les épaisseurs importantes. Plus intéressant, l'adsorption d'**ASH** à 37 °C n'a pas une dépendance linéaire avec l'épaisseur : avec l'augmentation de l'épaisseur, l'adsorption diminue dans un premier temps avant d'augmenter. Les auteurs expliquent ce phénomène par la possible présence d'initiateur en surface pour les épaisseurs faibles. En ce qui concerne l'angle de contact, ce dernier montre des surfaces plus hydrophobes qu'à l'accoutumée pour des surfaces *antifouling* et suggère que cette propriété n'est pas due à l'hydrophilie du **PNIPAM** mais aux interactions que ce dernier entretient avec le substrat silicium. En effet, pour les courtes chaînes, l'interaction sur la totalité de la molécule est plus aisée, limitant sa liberté de changement de conformation, ce qui réduit l'effet de la température. Enfin, cette étude a aussi porté sur l'influence de la taille des protéines et donc l'augmentation des contraintes stériques lors de leur pénétration dans le peigne. Trois protéines furent étudiées (par ordre croissant de taille) : des lysozymes, du **ASH** et des fibrinogènes. Les lysozymes, les plus petites, s'adsorbent, peu importe le régime conformationnel du **PNIPAM**. La petite taille de ces protéines leur permet en effet de passer entre les chaînes de **PNIPAM** et d'interagir directement avec le substrat (adsorp-

tion primaire, voir section 1.4.1). Avec l'augmentation de la taille protéique, ces dernières ne sont plus capables de traverser la couche de PNIPAM en dessous de la LCST (régime expansé) mais sont capables, au-delà de cette température (régime champignon), d'interagir avec la région externe de cette couche et, peut être, directement avec le substrat.

Si l'on compare ces deux dernières études, il apparaît que dans le cas de substrats polyuréthane l'hydrophilie tend à augmenter avec l'épaisseur de PNIPAM, conduisant à une augmentation de l'adsorption protéique [181], alors que dans le cas de substrats Si, le greffage mène à une augmentation de l'adsorption alors que l'hydrophilie diminue [180]. De ce constat émerge la compréhension de l'importance du substrat. Les propriétés de surfaces vont dépendre de la capacité de ce dernier à permettre une adsorption primaire en plus de l'équilibre hydrophile/hydrophobe du système substrat/PNIPAM. En fait, pour les couches de PNIPAM épaisses, l'adsorption d'ASH est du même ordre de grandeur peu importe le substrat, ces surfaces présentant en outre la même mouillabilité.

Hormis la production de FC, le PNIPAM est aussi étudié pour des applications *in vivo*. Par exemple, en combinaison avec du chitosane, des gels pouvant se solidifier avec la température ont pu être produits [182]. L'intérêt est de pouvoir injecter le gel, à froid. A l'intérieur du corps, ce dernier pourra alors remplir son rôle de comblement par solidification. Des pansements «faciles à enlever» ont aussi été développés et testés directement sur des souris [183]. Dans cette étude ou d'autres, aucun effet de toxicité ou de rejet n'a été observé [184]. Enfin, des implants rétiniens ont aussi été développés, montrant une corrélation entre la température et l'adhésion tissulaire, l'adhésion apparaissant une minute après le passage de la LCST [185]. **Hormis ces quelques études, la capacité du PNIPAM à s'adhérer à des tissus en fonction de la température reste une perspective d'utilisation très peu exploitée et représente le principal défi de ce projet.** Cette propriété, si elle s'avère fonctionner, peut apporter un confort d'utilisation pour le chirurgien et permettre des traitements sur tissus fragiles.

Le développement d'un biomatériau recouvert d'une surface de PNIPAM en peigne pourrait alors permettre une pose facilitée à température ambiante (non adhésif) avec une adhésion au tissu apparaissant lors du réchauffement du dispositif par le corps humain. Des stratégies de greffage devront donc être développées afin d'étudier l'impact de la longueur de chaîne greffée ainsi que la densité de greffage sur les propriétés bioadhésives, sur cellules et sur tissus. Avant de s'intéresser à l'élaboration proprement dite du matériau, il est important de s'attarder sur la réglementation des dispositifs médicaux afin d'anticiper d'éventuels problèmes au niveau de sa conception.

## 1.5 Réglementation des dispositifs médicaux

Différentes catégories interviennent lorsqu'il s'agit d'homologuer un nouveau produit sur le marché de la santé. Il faut entre autres distinguer la notion de «médicament» et la notion de dispositif médical (DM). Aujourd'hui, ces catégories tendent à s'harmoniser sur

le plan européen afin d'en faciliter la libre circulation sur le territoire des pays membres.

Le code de la santé publique (article L.5111-1, [186]) définit un médicament comme «toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que toute substance ou composition pouvant être utilisée chez l'homme ou chez l'animal ou pouvant leur être administrée, en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions physiologiques en exerçant *une action pharmacologique, immunologique ou métabolique.*»

De leur côté, les DM sont entendus par le code de la santé publique (article L.5211-1, [187]) comme «tout instrument, appareil, équipement, matière, produit, à l'exception des produits d'origine humaine, ou autre article utilisé seul ou en association, y compris les accessoires et logiciels nécessaires au bon fonctionnement de celui-ci, destiné par le fabricant à être utilisé chez l'homme à des fins médicales et dont l'action principale voulue *n'est pas obtenue par des moyens pharmacologiques ou immunologiques ni par métabolisme, mais dont la fonction peut être assistée par de tels moyens.* Constitue également un dispositif médical le logiciel destiné par le fabricant à être utilisé spécifiquement à des fins diagnostiques ou thérapeutiques.»

Ces définitions inscrites dans le code la santé publique français sont indexées sur les directives européennes relatives aux médicaments [188] et DM [189]. Ainsi, la frontière entre médicament et DM peut être floue. En effet, un DM ayant une fonction thérapeutique peut être considéré comme tel dès lors que son action principale n'est pas obtenue par des moyens *pharmacologiques, immunologiques ou métaboliques*. La nuance, outre sémantique, implique une réglementation différente, notamment dans le cadre de la mise sur le marché. Entre autres, la réglementation des DM est plus souple que celle dont dépendent les médicaments. Dans le cadre de pansements thérapeutiques, la fonction première consiste à protéger la plaie et absorber les excréments. La libération de principes actifs peut donc être considérée comme secondaire, on peut ainsi parler de dispositif médical [190]. Ainsi, bien que le biomatériau que l'on se propose de développer contienne un principe actif, son action principale est l'absorption des fuites, il relève donc de la réglementation des dispositifs médicaux.

### 1.5.1 Classification

Les DM sont classés en 4 catégories en fonction de leurs risques potentiels pour la santé :

- Classe I (classe de risque la plus faible), qui comprend par exemple les lunettes correctrices, les véhicules pour personnes handicapées, les béquilles, etc. ;
- Classe IIa (risque potentiel modéré/mesuré), qui comprend par exemple les lentilles de contact, les appareils d'échographie, les couronnes dentaires ;

- Classe IIb (risque potentiel élevé/important), qui comprend notamment les préservatifs, les produits de désinfection pour lentilles;
- Classe III (classe de risque la plus élevée), qui inclut par exemple les implants mammaires, les stents, les prothèses de hanche, etc.

Ces catégories vont donc du risque le plus faible au risque le plus élevé. La classification appartient au fabricant dudit DM, en fonction des règles établies par l'Union européenne (UE). En 2017, une nouvelle réglementation a été adoptée par l'UE [189] en remplacement des anciennes directives [191]. La nouvelle réglementation intègre de nouveaux critères de classement (par exemple sur les nanomatériaux), mais reste pour l'essentiel très proche de l'ancienne directive, la plupart des articles étant des redites. Bien que destinée à être pleinement appliquée d'ici 2020, c'est cette nouvelle réglementation qui sera décrite ici. Ainsi, dans les textes, les critères pris en compte sont les suivants :

- la durée d'utilisation  $t$ , celle-ci étant qualifiée de temporaire ( $t < 1$  H), de court terme ( $1 \text{ H} < t < 1$  mois) ou de long terme ( $t > 1$  mois);
- le mode d'application du dispositif :
  - «invasif» s'il pénètre le corps par un orifice naturel. Si la pénétration fait suite à un acte chirurgical, il s'agira alors d'un dispositif «invasif de type chirurgical»;
  - «implantable» si ce dernier est destiné à rester dans le corps. Si le dispositif ne pénètre que partiellement le corps, il est considéré comme implantable si la durée de l'implant est supérieure à 30 jours. Sont aussi considérés comme tels les dispositifs destinés à remplacer une surface épithéliale ou la surface de l'œil.
- le mode d'action ou la finalité du DM :
  - «actif» s'il utilise une source énergétique, autre que le corps humain lui-même ou la force de gravité. Par exemple, les stimulateurs cardiaques rentrent dans cette catégorie;
  - «actif thérapeutique» s'il est actif et utilisé, seul ou en combinaison avec d'autres dispositifs médicaux, pour soutenir, modifier, remplacer ou restaurer des fonctions ou des structures biologiques en vue de traiter ou de soulager une maladie, une blessure ou une infirmité;
  - «diagnostique» si actif et si, seul ou en combinaison, il est destiné à fournir des informations en vue de diagnostiquer ou de contrôler des états physiologiques.
- la localisation, certaines zones étant considérées comme critiques : contact avec le cœur, le système circulatoire centrale ou le système nerveux central, ces zones étant strictement définies dans le cadre de la directive.

S'en suit une vingtaine de règles (contre une quinzaine pour l'ancienne directive) qui déterminent l'attribution de classe des dispositifs en fonction de ces critères (figure 1.22).

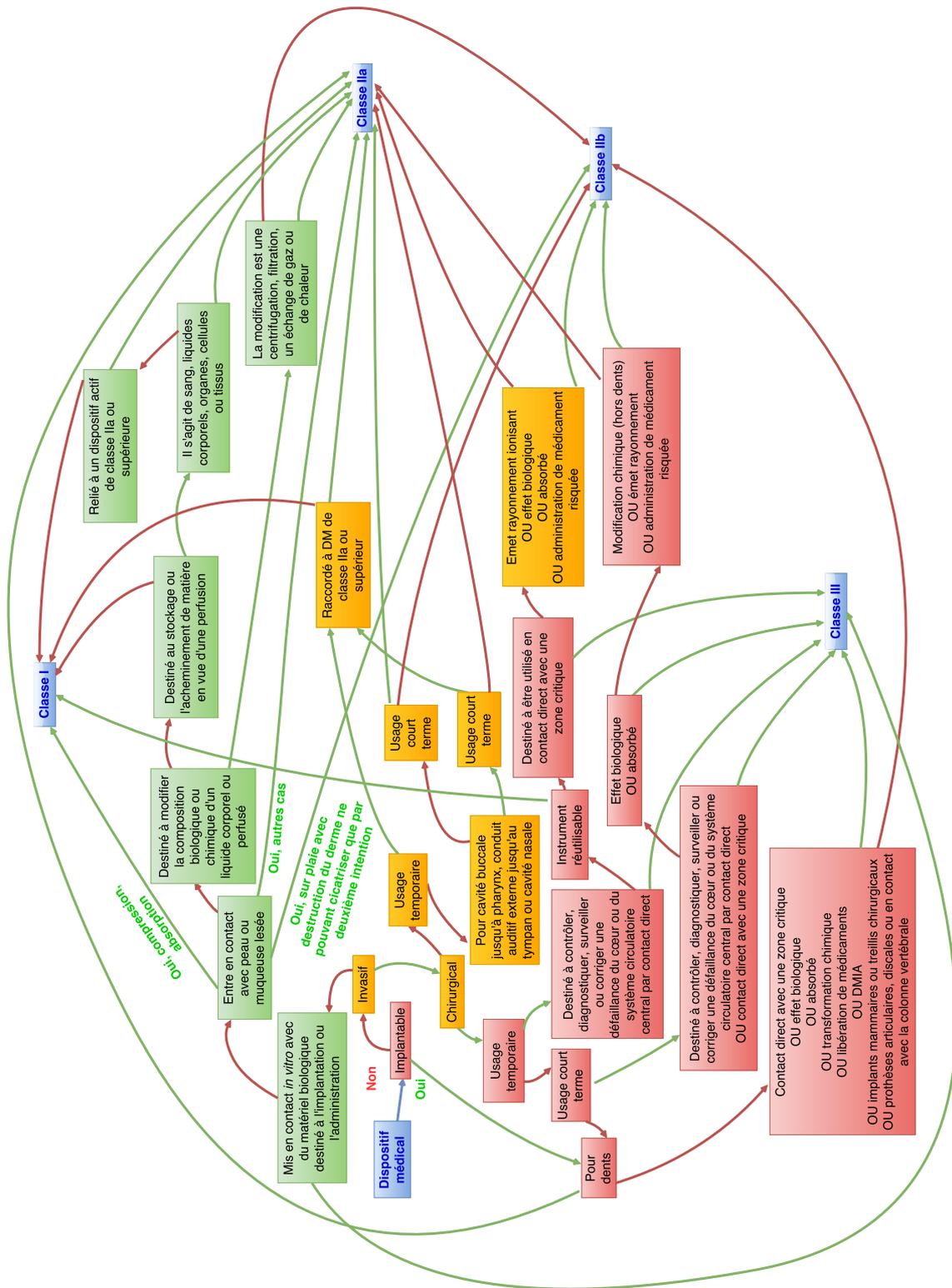


FIGURE 1.22 – Récapitulatif indicatif des règles d’attribution construit à partir de l’annexe VIII du Règlement 2017/745 relatif aux dispositifs médicaux [189]. Les dispositifs médicaux actifs ne sont pas représentés et possèdent des règles d’attribution propres. Des règles spéciales sont aussi à prendre en compte.

Aux règles générales s'ajoutent des règles spéciales, par exemple pour les dispositifs actifs, ceux fabriqués à partir de tissus animaliers ou encore ceux incorporant des substances actives. C'est par exemple par le biais des règles spéciales que les poches de sang bénéficient d'une dérogation, les exemptant d'une classification III pour une classification IIb. De manière générale, si le dispositif est destiné à être utilisé en combinaison avec d'autres DM, chaque dispositif doit être considéré séparément pour l'attribution de sa classe. De même, si un dispositif peut avoir plusieurs applications ou règles (localisation, indication...), la classification la plus stricte s'applique.

Des pansements utilisés dans le cadre d'interventions chirurgicales, destinés à rester à l'intérieur du corps du patient sont alors considérés comme des dispositifs implantables. Ils sont classés dans la catégorie IIb. Cependant, s'ils sont supposés subir une transformation chimique (dégradation) ou administrer des médicaments (relargage de principe actif), ces derniers sont de fait classés dans la catégorie III, qui correspond à la classe de risque la plus élevée.

### 1.5.2 Mise sur le marché

Afin d'obtenir une autorisation de mise sur le marché sur le territoire européen, les DM doivent obtenir le marquage CE. Un certain nombre d'exigences essentielles sont nécessaires pour obtenir l'approbation du DM. Ces dernières sont définies par l'annexe XI du règlement relatif aux dispositifs médicaux [189]. Les exigences générales, au nombre de 6, comprennent :

1. la non-compromission du patient ou de l'utilisateur, étant entendu que les risques éventuels liés à leur utilisation constituent des risques acceptables au regard du bienfait apporté au patient et compatibles avec un niveau élevé de protection de la santé et de la sécurité;
2. l'engagement et la volonté du fabricant de réduire autant que possible les risques, à mettre en place les systèmes de protection adéquats le cas échéant, ainsi qu'à informer l'utilisateur des risques;
3. l'efficacité du DM au regard des performances qui lui sont assignées par le fabricant;
4. le maintien des performances et de la sécurité visées aux points précédents pendant la durée de vie des dispositifs;
5. le bon conditionnement au vu du stockage et du transport des DM, afin de maintenir leurs caractéristiques et performances;
6. l'acceptabilité de tout effet secondaire et indésirable au regard des performances assignées.

A cela s'ajoutent des exigences qui peuvent dépendre du type de DM concerné. Ainsi, lors de la conception et la construction des DM, une attention devra être apportée au

choix des matériaux, en tenant compte de la toxicité, et ce en considérant la compatibilité réciproque entre ces matériaux et les tissus, cellules ou liquides corporels auxquels ils devront être mis en contact. Les risques découlant des substances dégagées par le dispositif doivent aussi être minimisés. Ainsi, dans le cas du présent projet, le développement d'un DM impliquant des étapes de synthèse chimique, le choix des réactifs doit être réfléchi afin de limiter le relargage de molécules toxiques par le matériau développé. De plus, si un DM incorpore une substance pouvant être considérée comme un médicament au sens de l'article 1<sup>er</sup> de la directive 2001/83/CE [188], alors la présence de cette substance doit être justifiée, son utilité vérifiée par analogie avec les méthodes appropriées contenues dans l'annexe I de la directive 2001/83/CE [188]). Dans les faits, il s'agit de fournir une documentation complète concernant la composition, les essais biomédicaux de la substance et du DM combinés pour consultation par une autorité compétente, nationale (Agence Nationale de sécurité du Médicament et des produits de santé, ANSM) ou européenne (European Medicine Agency, EMA) qui évaluera les aspects relatifs à la qualité, la sécurité et l'utilité de la substance pharmacologique (bénéfice/risque) [190]. Celle-ci pourra alors autoriser les essais cliniques avant de rendre un avis pour le marquage CE.

De plus, en fonction de la classe considérée, le fabricant devra :

- fournir une documentation complète, incluant un dossier de conformité (ou documentation technique) comprenant une description du DM et sa conception, l'analyse des risques, les rapports d'essais cliniques, etc. ;
- et/ou s'assurer de mettre en place des processus obligatoires pour garantir le suivi des DM une fois mis sur le marché ;
- et/ou mettre en place une assurance qualité. Cette assurance qualité prend en compte les systèmes de management attrayant à la qualité et la sécurité des produits commercialisés, de sa conception à son contrôle final. Pour se faire, il est recommandé de se faire certifier EN ISO 13485 par un organisme notifié<sup>12</sup> [192].

Plus la classe est élevée, plus la procédure sera contraignante. Ainsi, les DM de classe III, et donc le DM qui sera développé ici, doivent suivre une procédure complète et remplir tous les critères susmentionnés, chacun d'entre eux devant être contrôlé par un organisme notifié qui assurera un suivi au cours du temps. Un certificat d'examen CE de la conception pourra alors être délivré par l'organisme notifié, ce dernier étant valable 5 ans.

Il est à noter que le passage récent (2017) d'une directive (93/42/CEE) à un règlement (2017/745) rend la réglementation applicable telle quelle, sans modifications possibles par les Etats membres de l'UE. Quoi qu'il en soit, afin de standardiser les études et contrôles menant à l'obtention d'autorisations par l'UE, il existe des normes internationales pouvant servir de référence.

---

12. La liste des organismes notifiés est fournie par la commission européenne et disponible sur son site internet <http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/nando/index.cfm>

### 1.5.3 Les ISO : une référence sur le plan national et international

L'ISO (étymologiquement dérivé du grec «isos», signifiant «égal») est l'Organisation internationale de normalisation. Cet organisme non gouvernemental et indépendant a pour but de définir des normes uniformisées afin de faciliter le commerce, le contrôle, mais aussi de garantir qualité et sécurité des produits, des services et des systèmes sur le plan mondial. A ce jour, l'ISO a publié plus de 21 000 normes internationales qui couvrent une grande partie des domaines industriels<sup>13</sup>. Etablies par des experts, les normes ISO font aujourd'hui foi comme références : elles définissent et fournissent des repères, des protocoles et des procédures afin de rendre possible des contrôles plus homogènes et de fait comparables. Dans le monde industriel, c'est un gage de qualité et un outil stratégique proposant des procédures optimisées en termes de rendement et de réduction de déchets, par exemple. Ces normes couvrent bien entendu le domaine biologique et médical, avec notamment des ISO portant sur la cytotoxicité (ISO 10993-5 de 2009). Les normes ISO ne sont que recommandatives, le marquage CE nécessite cependant parfois le suivi de ce type de normes<sup>14</sup>.

Dans ce contexte, la norme ISO 10993-5 de 2009 permet d'encadrer les évaluations cytotoxiques des dispositifs médicaux. Cette norme propose en fait différents protocoles de tests, chacun pouvant être plus ou moins adapté selon le dispositif testé. En premier lieu, il s'agit de distinguer les tests par contact direct, indirect et les tests sur des extraits (extraction liquide d'un matériau), en fonction de l'application finale visée. Plusieurs paramètres peuvent alors être étudiés :

- évaluation de la destruction ou détérioration de l'intégrité cellulaire par des moyens morphologiques
- mesures de la destruction ou détérioration de l'intégrité cellulaire
- mesure de la prolifération
- mesure d'un ou de plusieurs aspects spécifiques du métabolisme cellulaire

Dans le cadre de cette thèse, qui concerne le développement d'un dispositif médical implantable pour application directe sur organe, il convient alors de s'intéresser aux tests par contact direct ou par diffusion. Dans ce cas, il est tout d'abord recommandé de stériliser, de maintenir et de manipuler dans un environnement stérile ledit matériau, dans le cas où celui-ci devrait être utilisé ainsi dans l'application finale. De manière intéressante, il est recommandé de pré imprégner les matériaux absorbants (ce qui est, par essence, le cas des pansements) dans le milieu de culture avant d'effectuer les tests, afin d'éviter l'absorption de ce dernier lors de la culture cellulaire. La température de stockage des lignées cellulaires, de préférence établies (non primaires), doit être fixée à -80 °C, voire à -130 °C pour de longues durées de stockage. Comme il est communément d'usage, la norme

---

13. Source et site officiel de l'ISO : <http://www.iso.org/iso/fr/home/standards.htm>

14. le règlement (UE) 2017/745 relatif aux dispositifs médicaux demande le suivi de la norme ISO 14155 :2011 pour les essais cliniques

rappelle la nécessité d'utiliser un cryoprotecteur. En effet, lors du refroidissement, la formation de cristaux d'eau à l'intérieur ou à l'extérieur des cellules peut endommager ces dernières. La congélation tend aussi à augmenter, localement et de manière critique, la concentration saline du milieu ce qui peut conduire à des précipitations, à l'implosion ou à l'explosion cellulaire par le biais de chocs osmotiques. Les cryoprotecteurs permettent alors de limiter les effets négatifs en diminuant les cinétiques de nucléation et de cristallisation de l'eau via la formation de liaisons hydrogène. Les mécanismes en jeux sont en fait complexes et assez mal compris [193]. Quoi qu'il en soit, le DMSO, miscible à l'eau et non toxique, est couramment utilisé en tant qu'agent cryoprotecteur. Enfin, pour en revenir à la norme ISO, la bonne santé et l'absence de mycoplasmes dans le milieu de culture, approprié, sont de rigueur. Un protocole détaillé est alors fourni. Succinctement :

1. introduction d'une quantité connue de cellules de manière uniforme dans le milieu
2. vérification de la morphologie des cellules au microscope
3. remplacement du milieu de culture au moment de commencer le test
4. placement de l'échantillon sur la couche cellulaire<sup>15</sup>,
5. incubation (au moins 24 H)
6. préparation à la caractérisation qualitative ou quantitative

Il est important de noter que l'expérience doit être réalisée au moins 3 fois pour juger de la reproductibilité. Des expériences contrôles doivent aussi être réalisées pour comparer. Le protocole peut être adapté en fonction des cas si cela est justifié. Quoi qu'il en soit, le protocole doit être consciencieusement rapporté. Une détermination qualitative est possible en étudiant la morphologie cellulaire. Les critères définis par l'ISO sont donnés tableau 1.3. Le comptage cellulaire permet en outre d'avoir une information quantitative. Il s'agira alors, par exemple, d'éliminer les cellules mortes, par rinçage, puis de compter le nombre de cellules restantes, considérées, après vérification au microscope, comme vivantes. Il est alors défini par l'ISO qu'une réduction de la viabilité cellulaire par rapport à un contrôle de plus de 30 % est considérée comme potentiellement due à un effet cytotoxique.

---

15. Il est possible de placer l'échantillon en premier et de déposer les cellules par dessus si plus approprié.

## 1.6. DÉVELOPPEMENT DU BIOMATÉRIAU POUR APPLICATION CHIRURGICALE : VERS LA MISE EN ŒUVRE

TABLEAU 1.3 – Grades de réactivité (réaction cellulaire) pour les tests de diffusion ou par contact direct. La réactivité correspond à l'observation comparative du comportement cellulaire (morphologie, survie, etc.) entre les cellules en contact ou proche de l'échantillon testé et des cellules contrôles.

Grade	Réactivité	Zone de réactivité
0	Aucune	Pas de zone détectable autour ou sur/sous l'échantillon
1	Légère	Quelques cellules mal-formées ou dégénérées sur/sous l'échantillon
2	Moyenne	Zone limitée à l'aire de l'échantillon
3	Modérée	Zone supérieure (< 1,0 cm) à l'aire de l'échantillon
4	Forte	Zone supérieure (> 1,0 cm) à l'aire de l'échantillon

### 1.6 Développement du biomatériau pour application chirurgicale : vers la mise en œuvre

Dans cette première partie, nous avons vu quelles étaient les problématiques liées à la chirurgie ablative du pancréas. Malgré des complications variées, l'apparition de fistules pancréatiques reste la problématique majeure à laquelle se confrontent équipes médicales et patients. Ces fistules impliquent des fuites au niveau des sutures chirurgicales. Riches en enzymes, elles sont en effet la cause de dommages intra-abdominaux entraînant des complications parfois mortelles.

Le développement d'un biomatériau fonctionnel capable d'absorber ces excréments semble être une réponse convaincante à ces fistules (figure 1.23). L'alginate et le chitosane sont deux polysaccharides qui possèdent des propriétés complémentaires. Le premier dispose en effet de propriétés absorbantes, tandis que le second présente des résistances mécaniques, physico-chimiques et biochimiques intéressantes. En outre, ces deux polymères naturels sont déjà utilisés pour des applications biomédicales pour lesquelles ils ont déjà montré une bonne biocompatibilité. Leur caractère anionique (alginate) et cationique (chitosane) permet de les combiner sous forme de PEC via la formation d'un réseau

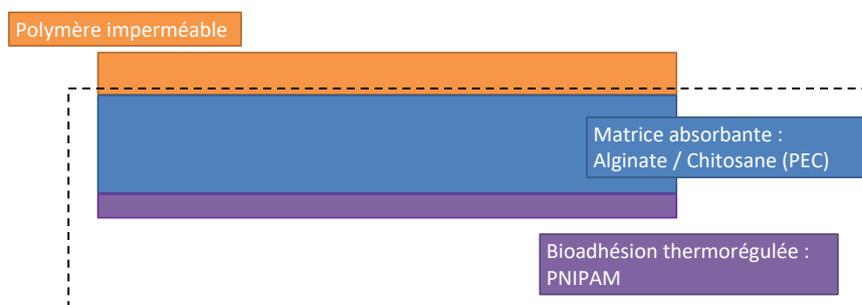


FIGURE 1.23 – Structure proposée pour l'élaboration du pansement chirurgical. Une couche absorbante, à base d'alginate et de chitosane, fonctionnalisée via le greffage de PNIPAM doit permettre l'obtention d'un biomatériau absorbant présentant une bioadhésion thermorégulée au pancréas. La couche imperméable a fait l'objet d'une précédente thèse et ne sera pas présentée ici.

physique assurant une bonne cohésion du matériau. Une précédente thèse a montré l'intérêt de ces PECs d'alginate/chitosane pour la prévention des fistules pancréatiques [17]. Lors de ces précédents travaux, le ratio et la technique d'homogénéisation ont été optimisés. Une couche imperméable a aussi été développée mais ne sera pas abordée dans ce manuscrit.

Le chapitre suivant s'intéresse à la caractérisation des polysaccharides utilisés (alginate et chitosane) puis à l'impact de la structuration des PECs sur leurs propriétés physico-chimiques, notamment en termes d'absorption et de résistance enzymatique. L'étude du comportement de ces matrices absorbantes dans différents milieux est aussi présentée, dans le but de mieux comprendre ces systèmes complexes.

## Références

- [1] E. N. Marieb et K. Hoehn. *Anatomie et physiologie humaines*. 8e édition, 2010. [10](#)
- [2] M. Dufresne. Physiologie du pancréas exocrine. *EMC - Hépatologie*, 7(3) :1–9, 2012. [11](#)
- [3] H. Guénard. *Physiologie Humaine*. Editions p édition, 2009. [11](#), [13](#)
- [4] P. Meyer, editor. *Physiologie humaine*. Flammarion édition, 1977. [13](#)
- [5] Y. Fujino et H. Sendo. A novel surgical technique to prevent pancreatic fistula in distal pancreatectomy using a patch of the falciform ligament. (March 2013) :44–49, 2015. [14](#)
- [6] A. Kleespies, M. Albertsmeier, F. Obeidat, H. Seeliger, K. W. Jauch, et C. J. Bruns. The challenge of pancreatic anastomosis. *Langenbeck's Archives of Surgery*, 393 :459–471, 2008. [15](#)
- [7] N. Oneil Machado. Pancreatic Fistula after Pancreatectomy : Definitions, Risk Factors, Preventive Measures, and Management—Review. *International Journal of Surgical Oncology*, 2012 :1–10, 2012. [14](#), [15](#)
- [8] C. Bassi, G. Butturini, E. Molinari, G. Mascetta, R. Salvia, M. Falconi, A. Gumbs, et P. Pederzoli. Pancreatic fistula rate after pancreatic resection : The importance of definitions. *Digestive Surgery*, 21(1) :54–59, 2004. [14](#)
- [9] C. Bassi, C. Dervenis, G. Butturini, A. Fingerhut, C. Yeo, J. Izbicki, J. Neoptolemos, M. Sarr, W. Traverso, et M. Buchler. Postoperative pancreatic fistula : An international study group (ISGPF) definition. *Surgery*, 138(1) :8–13, 2005. [14](#)
- [10] I. G. Ho, J. K. Kim, H. K. Hwang, J. Y. Kim, J. S. Park, et D. S. Yoon. Does international study group on pancreatic fistula (ISGPF) classification need modification after

- distal pancreatectomy? *Korean Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery*, 18(3) : 90, 2014. [14](#)
- [11] J. Ferlay. Le cancer du pancréas dans le monde. *International Agency for Research on Cancer*, 13(4) :12–16, 2014. [15](#)
- [12] A. Fingerhut, N. Veyrie, T. Ata, N. Alexakis, et E. Leandros. Use of sealants in pancreatic surgery : Critical appraisal of the literature. *Digestive Surgery*, 26(1) :7–14, 2009. [15](#)
- [13] H. F. Schoellhammer, Y. Fong, et S. Gagandeep. Techniques for prevention of pancreatic leak after pancreatectomy. *Hepatobiliary surgery and nutrition*, 3(5) :276–87, 2014. [15](#)
- [14] A. Sa Cunha, N. Carrere, B. Meunier, J. M. Fabre, A. Sauvanet, P. Pessaux, P. Ortega-Deballon, A. Fingerhut, et F. Lacaine. *Stump closure reinforcement with absorbable fibrin collagen sealant sponge (TachoSil) does not prevent pancreatic fistula after distal pancreatectomy : The FIABLE multicenter controlled randomized study*, volume 210. 2015. [15](#)
- [15] Y. Ikada. Surface modification of polymers for medical applications. *Biomaterials*, 15(10) :725–736, 1994. [16](#)
- [16] V. Mars. Charte Des Blocs Operatoires De L ' Assistance Publique – Hôpitaux De Marseille. 2013. [17](#)
- [17] M. Castel. *Mise en forme et caractérisation de biomatériaux pour la prévention des fistules pancréatiques après pancréaectomies*. Thèse, Université de Toulouse III - Paul Sabatier, 2017. [17](#), [18](#), [56](#)
- [18] K. Y. Lee et D. J. Mooney. Alginate : properties and biomedical applications. *Progress in polymer science*, 37(1) :106–126, 2012. [18](#), [19](#), [20](#), [21](#)
- [19] D. Sahoo et P. L. Nayak. Chitosan : The Most Valuable Derivative of Chitin. *Biopolymers : Biomedical and Environmental Applications*, pages 129–166, 2011. [18](#)
- [20] S. N. Pawar et K. J. Edgar. Alginate derivatization : A review of chemistry, properties and applications. *Biomaterials*, 33(11) :3279–3305, 2012. [18](#), [19](#)
- [21] D. E. Clark et H. C. Green. Alginic acid and process of making same, 1936. [18](#)
- [22] G. Klöck, H. Frank, R. Houben, T. Zekorn, A. Horcher, U. Siebers, M. Wöhrle, K. Federlin, et U. Zimmermann. Production of purified alginates suitable for use in immunoisolated transplantation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 40(5) :638–643, 1994. [18](#)

- [23] S. Meng et Y. Liu. Alginate block fractions and their effects on membrane fouling. *Water Research*, 47(17) :6618–6627, 2013. [19](#)
- [24] I. D. Hay, Z. U. Rehman, A. Ghafoor, et B. H. A. Rehm. Bacterial biosynthesis of alginates. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 85(6) :752–759, 2010. [19](#)
- [25] I. Colinet, V. Dulong, T. Hamaide, D. Le Cerf, et L. Picton. New amphiphilic modified polysaccharides with original solution behaviour in salt media. *Carbohydrate Polymers*, 75(3) :454–462, 2009. [19](#)
- [26] G. Skjåk-Braek, H. Grasdalen, et O. Smidsrød. Inhomogeneous polysaccharide ionic gels. *Carbohydrate Polymers*, 10(1) :31–54, 1989. [19](#)
- [27] G. T. Grant, E. R. Morris, D. A. Rees, P. J. C. Smith, et D. Thom. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations : The egg-box model. *FEBS Letters*, 32(1) :195–198, 1973. [20](#)
- [28] P. Sikorski, F. Mo, G. Skjåk-Braek, et B. T. Stokke. Evidence for egg-box-compatible interactions in calcium-alginate gels from fiber X-ray diffraction. *Biomacromolecules*, 8(7) :2098–103, 2007. [20](#)
- [29] I. Donati, S. Holtan, Y. a. Mørch, M. Borgogna, M. Dentini, et G. Skjåk-Braek. New hypothesis on the role of alternating sequences in calcium-alginate gels. *Biomacromolecules*, 6(2) :1031–1040, 2005. [20](#)
- [30] B. Bellich, I. D’Agostino, S. Semeraro, A. Gamini, et A. Cesàro. “The Good, the Bad and the Ugly” of Chitosans. *Marine Drugs*, 14(5) :99, 2016. [21](#)
- [31] N. Yan et X. Chen. Don’t waste seafood waste. *Macmillan Publishers Limited*, pages 155–157, 2015. [21](#)
- [32] A. Percot, C. Viton, et A. Domard. Optimization of chitin extraction from shrimp shells. *Biomacromolecules*, 4(1) :12–18, 2003. [21](#)
- [33] I. Younes et M. Rinaudo. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Marine Drugs*, 13(3) :1133–1174, 2015. [22](#)
- [34] I. Younes, S. Hajji, V. Frachet, M. Rinaudo, K. Jellouli, et M. Nasri. Chitin extraction from shrimp shell using enzymatic treatment. Antitumor, antioxidant and antimicrobial activities of chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 69 :489–498, 2014. [22](#)
- [35] C. T. Pires, J. A. Vilela, et C. Airoidi. The Effect of Chitin Alkaline Deacetylation at Different Condition on Particle Properties. *Procedia Chemistry*, 9 :220–225, 2014. [22](#)

- 
- [36] Y. Yuan, B. M. Chesnutt, W. O. Haggard, et J. D. Bumgardner. Deacetylation of chitosan : Material characterization and in vitro evaluation via albumin adsorption and pre-osteoblastic cell cultures. *Materials*, 4(8) :1399–1416, 2011. [22](#)
- [37] M. Rinaudo, G. Pavlov, J. Desbrie, et J. Desbrières. Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan. *Polymer*, 40 :7029–7032, 1999. [22](#)
- [38] K. Azuma, R. Izumi, T. Osaki, S. Ifuku, M. Morimoto, H. Saimoto, S. Minami, et Y. Okamoto. Chitin, Chitosan, and Its Derivatives for Wound Healing : Old and New Materials. *Journal of Functional Biomaterials*, 6(1) :104–142, 2015. [22](#)
- [39] C. Chatelet, O. Damour, et a. Domard. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials*, 22(3) :261–268, 2001. [22](#)
- [40] I. A. Alsarra. Chitosan topical gel formulation in the management of burn wounds. *International Journal of Biological Macromolecules*, 45(1) :16–21, 2009. [22](#)
- [41] C. Wenling, J. Duohui, L. Jiamou, G. Yandao, Z. Nanming, et Z. Xiufang. Effects of the degree of deacetylation on the physicochemical properties and Schwann cell affinity of chitosan films. *Journal of biomaterials applications*, 20(2) :157–77, 2005. [22](#)
- [42] F. Croisier et C. Jérôme. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal*, 49(4) :780–792, 2013. [23](#)
- [43] K. M. Vårum, M. M. Myhr, R. J. N. Hjerde, et O. Smidsrød. In vitro degradation rates of partially N-acetylated chitosans in human serum. *Carbohydrate Research*, 299 (1-2) :99–101, 1997. [23](#)
- [44] S. H. Pangburn, P. V. Trescony, et J. Heller. Lysozyme degradation of partially deacetylated chitin, its films and hydrogels. *Biomaterials*, 3(2) :105–108, 1982. [23](#)
- [45] S. L. Patwekar, A. P. Potulwar, S. R. Pedewad, M. S. Gaikwad, S. A. Khan, et A. B. Suryawanshi. Review on Polyelectrolyte Complex as Novel Approach for Drug Delivery System. *Ijppr.Human*, 5(4) :97–109, 2016. [23](#)
- [46] D.-J. Park, B.-H. Choi, S.-J. Zhu, J.-Y. Huh, B.-Y. Kim, et S.-H. Lee. Injectable bone using chitosan-alginate gel/mesenchymal stem cells/BMP-2 composites. *Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, 33(1) :50–4, 2005. [24](#)
- [47] L. Becherán-Marón, C. Peniche, et W. Argüelles-Monal. Study of the interpolyelectrolyte reaction between chitosan and alginate : influence of alginate composition and chitosan molecular weight. *International Journal of Biological Macromolecules*, 34(1-2) :127–133, 2004. [24](#)

- [48] K. Y. Lee, W. H. Park, et W. S. Ha. Polyelectrolyte complexes of sodium alginate with chitosan or its derivatives for microcapsules. *Journal of Applied Polymer Science*, 63 (4) :425–432, 1997. [24](#)
- [49] M. Castel-Molieres, G. Conzatti, J. Torrisani, A. Rouilly, S. Cavalie, N. Carrere, et A. Tournette. Influence of Homogenization Technique and Blend Ratio on Chitosan/Alginate Polyelectrolyte Complex Properties. *Journal of Medical and Biological Engineering*, In press, 2017. [24](#)
- [50] G. Bao et S. Suresh. Cell and molecular mechanics of biological materials. *Nature Materials*, 2(11) :715–725, 2003. [24](#), [29](#)
- [51] F. G. M. Russel, J. M. Bindels, et C. H. Van. Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(25) :13661–13665, 1997. [24](#), [29](#)
- [52] M. Gao, M. Sotomayor, E. Villa, E. H. Lee, et K. Schulten. Molecular mechanisms of cellular mechanics. *Physical chemistry chemical physics : PCCP*, 8 :3692–3706, 2006. [24](#), [25](#)
- [53] W. Xu, H. Baribault, et E. D. Adamson. Vinculin knockout results in heart and brain defects during embryonic development. *Development (Cambridge, England)*, 125 (2) :327–37, 1998. [24](#)
- [54] K. Anselme, L. Ploux, et a. Ponche. Cell/Material Interfaces : Influence of Surface Chemistry and Surface Topography on Cell Adhesion. *Journal of Adhesion Science and Technology*, 24(5) :831–852, 2010. [25](#)
- [55] D. G. Castner et B. D. Ratner. Biomedical surface science : Foundations to frontiers. *Surface Science*, 500(1-3) :28–60, 2002. [26](#), [27](#)
- [56] J. H. Lee, J. W. Lee, G. Khang, et H. B. Lee. Interaction of cells on chargeable functional group gradient surfaces. *Biomaterials*, 18(4) :351–358, 1997. [25](#), [32](#)
- [57] A. Tamura, M. Oishi, et Y. Nagasaki. Efficient siRNA delivery based on PEGylated and partially quaternized polyamine nanogels : Enhanced gene silencing activity by the cooperative effect of tertiary and quaternary amino groups in the core. *Journal of Controlled Release*, 146(3) :378–387, 2010.
- [58] A. Tamura, M. Nishi, J. Kobayashi, K. Nagase, H. Yajima, M. Yamato, et T. Okano. Simultaneous enhancement of cell proliferation and thermally induced harvest efficiency based on temperature-responsive cationic copolymer-grafted microcarriers. *Biomacromolecules*, 13 :1765–1773, 2012.

- 
- [59] D. Fischer, Y. Li, B. Ahlemeyer, J. Krieglstein, et T. Kissel. In vitro cytotoxicity testing of polycations : Influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials*, 24 :1121–1131, 2003. [25](#)
- [60] J. Pei, H. Hall, et N. D. Spencer. The role of plasma proteins in cell adhesion to PEG surface-density-gradient-modified titanium oxide. *Biomaterials*, 32(34) :8968–78, 2011. [26](#), [45](#)
- [61] B. Kasemo. Biological surface science. *Surface Science*, 500(1-3) :656–677, 2002. [27](#), [28](#), [31](#)
- [62] J. Andersson, K. N. Ekdahl, J. D. Lambris, et B. Nilsson. Binding of C3 fragments on top of adsorbed plasma proteins during complement activation on a model biomaterial surface. *Biomaterials*, 26(13) :1477–85, 2005. [27](#), [43](#)
- [63] E. a. Vogler. Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*, 74(1-3) :69–117, 1998. [27](#)
- [64] A. J. Pertsin et M. Grunze. Computer simulation of water near the surface of oligo(ethylene glycol)-terminated alkanethiol self-assembled monolayers. *Langmuir*, 16(5) :8829–8841, 2000. [28](#)
- [65] L. Bacakova, E. Filova, M. Parizek, T. Ruml, et V. Svorcik. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnology Advances*, 29(6) :739–767, 2011. [28](#), [31](#)
- [66] T. Suzuki et Y. Mizushima. Characteristics of silica-chitosan complex membrane and their relationships to the characteristics of growth and adhesiveness of L-929 cells cultured on the biomembrane. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 84(2) :128–132, 1997. [28](#)
- [67] Z. Ma, Z. Mao, et C. Gao. Surface modification and property analysis of biomedical polymers used for tissue engineering. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, 60(2) : 137–157, 2007. [28](#), [43](#)
- [68] C. D. Tidwell, D. G. Castner, S. L. Golledge, B. D. Ratner, K. Meyer, B. Hagenhoff, et A. Benninghoven. Static time-of-flight secondary ion mass spectrometry and x-ray photoelectron spectroscopy characterization of adsorbed albumin and fibronectin films. *Surface and Interface Analysis*, 31(8) :724–733, 2001. [28](#)
- [69] B. G. Keselowsky, D. M. Collard, et A. J. García. Surface chemistry modulates fibronectin conformation and directs integrin binding and specificity to control cell adhesion. *Journal of biomedical materials research. Part A*, 66 :247–259, 2003. [28](#)

- [70] M. Cockerill, M. K. Rigozzi, et E. M. Terentjev. Mechanosensitivity of the 2nd Kind : TGF- $\beta$  Mechanism of Cell Sensing the Substrate Stiffness. *PLOS ONE*, 10(10) : e0139959, 2015. [29](#)
- [71] D. E. Discher, P. Janmey, et Y.-I. Wang. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science (New York, N.Y.)*, 310(5751) :1139–43, 2005. [29](#)
- [72] Q. Li, G. Lee, C. Ong, et C. Lim. AFM indentation study of breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 374(4) :609–613, 2008. [29](#)
- [73] M. S. Yousafzai, F. Ndoye, G. Coceano, J. Niemela, S. Bonin, G. Scoles, et D. Cojoc. Substrate-dependent cell elasticity measured by optical tweezers indentation. *Optics and Lasers in Engineering*, 76 :27–33, 2016. [29](#), [30](#)
- [74] M. G. Haugh, C. M. Murphy, R. C. McKiernan, C. Altenbuchner, et F. J. O'Brien. Crosslinking and mechanical properties significantly influence cell attachment, proliferation, and migration within collagen glycosaminoglycan scaffolds. *Tissue engineering. Part A*, 17(9-10) :1201–8, 2011. [29](#)
- [75] C. M. Lo, H. B. Wang, M. Dembo, et Y. L. Wang. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophysical journal*, 79(1) :144–152, 2000. [29](#)
- [76] S. Kidoaki et T. Matsuda. Microelastic gradient gelatinous gels to induce cellular mechanotaxis. *Journal of biotechnology*, 133(2) :225–30, 2008. [29](#)
- [77] Y. Liu, T. Xu, L. Zhang, Z. Cheng, et X. Zhu. Bulk AGET ATRP of methyl methacrylate using iron( iii ) acetylacetonate as a catalyst. *Polym. Chem.*, 5(23) :6804–6810, 2014. [29](#), [44](#)
- [78] L. Bacakova, E. Filova, D. Kubies, L. Machova, V. Proks, V. Malinova, V. Lisa, et F. Rypacek. Adhesion and growth of vascular smooth muscle cells in cultures on bioactive RGD peptide-carrying polylactides. *Journal of Materials Science : Materials in Medicine*, 18(7) :1317–1323, 2007. [29](#)
- [79] J. A. Reed, S. A. Love, A. E. Lucero, C. L. Haynes, et H. E. Canavan. Effect of polymer deposition method on thermoresponsive polymer films and resulting cellular behavior. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 28(4) :2281–7, 2012. [29](#), [32](#), [33](#), [43](#)
- [80] Y. Zhu, C. Gao, X. Liu, T. He, et J. Shen. Immobilization of biomacromolecules onto aminolyzed poly(L-lactic acid) toward acceleration of endothelium regeneration. *Tissue engineering*, 10(1) :53–61, 2004. [30](#)
- [81] R. D. Abbott et D. L. Kaplan. Strategies for improving the physiological relevance of human engineered tissues. *Trends in Biotechnology*, 33(7) :401–407, 2015. [30](#)

- [82] J. Yang, M. Yamato, C. Kohno, A. Nishimoto, H. Sekine, F. Fukai, et T. Okano. Cell sheet engineering : Recreating tissues without biodegradable scaffolds. *Biomaterials*, 26 :6415–6422, 2005. [31](#), [45](#)
- [83] M. A. Cooperstein et H. E. Canavan. Assessment of cytotoxicity of (N-isopropyl acrylamide) and Poly(N-isopropyl acrylamide)-coated surfaces. *Biointerphases*, 8 (1) :19, 2013. [31](#)
- [84] A. Tourrette, N. De Geyter, D. Jovic, R. Morent, M. M. C. G. Warmoeskerken, et C. Leys. Incorporation of poly(N-isopropylacrylamide)/chitosan microgel onto plasma functionalized cotton fibre surface. *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects*, 352 :126–135, 2009. [31](#)
- [85] H. Lim, Y. Lee, S. Han, Y. Kim, J.-m. Song, et J.-s. Kim. Wettability of poly(styrene-co-acrylate) ionomers improved by oxygen-plasma source ion implantation. *Journal of Polymer Science Part B : Polymer Physics*, 41 :1791–1797, 2003. [31](#)
- [86] A. M. G. Borges, L. O. Benetoli, M. a. Licínio, V. C. Zoldan, M. C. Santos-Silva, J. Assreuy, a. a. Pasa, N. a. Debacher, et V. Soldi. Polymer films with surfaces unmodified and modified by non-thermal plasma as new substrates for cell adhesion. *Materials Science and Engineering C*, 33(3) :1315–1324, 2013. [32](#)
- [87] A. Sdrobiş, G. E. Ioanid, T. Stevanovic, et C. Vasile. Modification of cellulose/chitin mix fibers with N-isopropylacrylamide and poly(N-isopropylacrylamide) under cold plasma conditions. *Polymer International*, 61(February) :1767–1777, 2012. [32](#), [45](#)
- [88] L. Moroni, M. Klein Gunnewiek, et E. M. Benetti. Polymer brush coatings regulating cell behavior : passive interfaces turn into active. *Acta biomaterialia*, 10(6) :2367–78, 2014. [32](#)
- [89] A. Olivier, F. Meyer, J.-M. Raquez, P. Damman, et P. Dubois. Surface-initiated controlled polymerization as a convenient method for designing functional polymer brushes : From self-assembled monolayers to patterned surfaces. *Progress in Polymer Science*, 37(1) :157–181, 2012. [33](#), [34](#)
- [90] M. a. C. Stuart, W. T. S. Huck, J. Genzer, M. Müller, C. Ober, M. Stamm, G. B. Sukhorukov, I. Szleifer, V. V. Tsukruk, M. Urban, F. Winnik, S. Zauscher, I. Luzinov, et S. Minko. Emerging applications of stimuli-responsive polymer materials. *Nature materials*, 9(2) :101–13, 2010. [33](#), [35](#)
- [91] C. Xue, B.-C. Choi, S. Choi, P. V. Braun, et D. E. Leckband. Protein Adsorption Modes Determine Reversible Cell Attachment on Poly(N-isopropyl acrylamide) Brushes. *Advanced Functional Materials*, 22(11) :2394–2401, 2012. [33](#), [34](#), [42](#)

- [92] A. Halperin et M. Kröger. Theoretical considerations on mechanisms of harvesting cells cultured on thermoresponsive polymer brushes. *Biomaterials*, 33(20) :4975–4987, 2012. [33](#), [34](#), [45](#)
- [93] C. Xue, N. Yonet-Tanyeri, N. Brouette, M. Sferrazza, P. V. Braun, et D. E. Leckband. Protein adsorption on poly(N-isopropylacrylamide) brushes : dependence on grafting density and chain collapse. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 27(14) :8810–8, 2011. [33](#), [45](#)
- [94] A. Halperin. Polymer brushes that resist adsorption of model proteins : Design parameters. *Langmuir*, 15 :2525–2533, 1999. [34](#)
- [95] R. B. Grubbs. Nitroxide-Mediated Radical Polymerization : Limitations and Versatility. *Polymer Reviews*, 51(2) :104–137, 2011. [34](#)
- [96] T. Schulte, K. O. Siegenthaler, H. Luftmann, M. Letzel, et A. Studer. Nitroxide-Mediated Polymerization of N -Isopropylacrylamide : Electrospray Ionization Mass Spectrometry , Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry , and Multiple-Angle Laser Light Scattering Studies on Nitroxide-Terminated Poly- N -is. *Macromolecules*, (38) :6833–6840, 2005. [34](#)
- [97] J. Ran, L. Wu, Z. Zhang, et T. Xu. Atom transfer radical polymerization (ATRP) : A versatile and forceful tool for functional membranes. *Progress in Polymer Science*, 39(1) :124–144, 2014. [35](#), [36](#)
- [98] S. Edmondson, V. L. Osborne, et W. T. S. Huck. Polymer brushes via surface-initiated polymerizations. *Chemical Society reviews*, 33(1) :14–22, 2004. [36](#), [38](#)
- [99] J. Draper, I. Luzinov, S. Minko, I. Tokarev, et M. Stamm. Mixed Polymer Brushes by Sequential Polymer Addition : Anchoring Layer Effect. *Langmuir*, 20(10) :4064–4075, 2004. [36](#)
- [100] B. Zdyrko et I. Luzinov. Polymer brushes by the "grafting to" method. *Macromolecular rapid communications*, 32(12) :859–69, 2011.
- [101] K. S. Iyer, B. Zdyrko, H. Malz, J. Pionteck, et I. Luzinov. Polystyrene Layers Grafted to Macromolecular Anchoring Layer. *Macromolecules*, 36(17) :6519–6526, 2003.
- [102] M. Husseman, E. E. Malmström, M. McNamara, M. Mate, D. Mecerreyes, D. G. Benoit, J. L. Hedrick, P. Mansky, E. Huang, T. P. Russell, et C. J. Hawker. Controlled Synthesis of Polymer Brushes by “Living” Free Radical Polymerization Techniques. *Macromolecules*, 32(5) :1424–1431, 1999. [36](#), [42](#)
- [103] N. Ayres, C. D. Cyrus, et W. J. Brittain. Stimuli-responsive surfaces using polyampholyte polymer brushes prepared via atom transfer radical polymerization. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 23(7) :3744–9, 2007. [36](#), [42](#)

- [104] U. Mansfeld, C. Pietsch, R. Hoogenboom, C. R. Becer, et U. S. Schubert. Clickable initiators, monomers and polymers in controlled radical polymerizations – a prospective combination in polymer science. *Polymer Chemistry*, 1(10) :1560, 2010. [36](#), [42](#)
- [105] P. Liu. Modification of Polymeric Materials via Surface-Initiated Controlled/"Living" Radical Polymerization. *e-Polymers*, 7(1) :1–3, 2007. [36](#)
- [106] P. Król et P. Chmielarz. Recent advances in ATRP methods in relation to the synthesis of copolymer coating materials. *Progress in Organic Coatings*, 77(5) :913–948, 2014. [36](#), [37](#)
- [107] C.-Y. Hsiao, H.-A. Han, G.-H. Lee, et C.-H. Peng. AGET and SARA ATRP of styrene and methyl methacrylate mediated by pyridyl-imine based copper complexes. *European Polymer Journal*, 51 :12–20, 2014. [36](#)
- [108] W. FENG, J. BRASH, et S. ZHU. Non-biofouling materials prepared by atom transfer radical polymerization grafting of 2-methacryloxyethyl phosphorylcholine : Separate effects of graft density and chain length on protein repulsion. *Biomaterials*, 27(6) :847–855, 2006. [36](#), [38](#), [42](#)
- [109] J. Pyun, T. Kowalewski, et K. Matyjaszewski. Synthesis of Polymer Brushes Using Atom Transfer Radical Polymerization. *Macromolecular Rapid Communications*, 24(18) :1043–1059, 2003. [36](#), [42](#)
- [110] J. Qin, Z. Cheng, L. Zhang, Z. Zhang, J. Zhu, et X. Zhu. A Highly Efficient Iron-Mediated AGET ATRP of Methyl Methacrylate Using Fe(0) Powder as the Reducing Agent. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 212(10) :999–1006, 2011. [36](#), [38](#)
- [111] R. Gong, S. Maclaughlin, et S. Zhu. Surface modification of active metals through atom transfer radical polymerization grafting of acrylics. *Applied Surface Science*, 254(21) :6802–6809, 2008. [37](#)
- [112] C. Hou, R. Qu, C. Sun, C. Ji, C. Wang, L. Ying, N. Jiang, F. Xiu, et L. Chen. Novel ionic liquids as reaction medium for ATRP of acrylonitrile in the absence of any ligand. *Polymer*, 49(16) :3424–3427, 2008. [37](#)
- [113] T. Wang, D. Liu, C. Lian, S. Zheng, X. Liu, C. Wang, et Z. Tong. Rapid cell sheet detachment from alginate semi-interpenetrating nanocomposite hydrogels of PNIPAm and hectorite clay. *Reactive and Functional Polymers*, 71(4) :447–454, 2011. [37](#), [45](#)
- [114] J. Cao, L. Zhang, X. Jiang, C. Tian, X. Zhao, Q. Ke, X. Pan, Z. Cheng, et X. Zhu. Facile iron-mediated dispersant-free suspension polymerization of methyl methacrylate

- via reverse ATRP in water. *Macromolecular rapid communications*, 34(22) :1747–54, 2013.
- [115] L. Zhang, Z. Cheng, Z. Zhang, D. Xu, et X. Zhu. Fe(III)-catalyzed AGET ATRP of styrene using triphenyl phosphine as ligand. *Polymer Bulletin*, 64(3) :233–244, 2009. [37](#)
- [116] C. Bolm, J. Legros, J. Le Paih, et L. Zani. Iron-catalyzed reactions in organic synthesis. *Chemical reviews*, 104(12) :6217–54, 2004. [37](#)
- [117] R. Poli, L. E. Allan, et M. P. Shaver. Iron-mediated reversible deactivation controlled radical polymerization. *Progress in Polymer Science*, 39(10) :1827–1845, 2014. [37](#), [38](#)
- [118] S.-I. Nakanishi, M. Kawamura, H. Kai, R.-H. Jin, Y. Sunada, et H. Nagashima. Well-defined iron complexes as efficient catalysts for "green" atom-transfer radical polymerization of styrene, methyl methacrylate, and butyl acrylate with low catalyst loadings and catalyst recycling. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, 20(19) :5802–14, 2014. [37](#)
- [119] M. Klein Gunnewiek, A. Di Luca, X. Sui, C. A. van Blitterswijk, L. Moroni, et G. J. Vancso. Controlled Surface Initiated Polymerization of N-Isopropylacrylamide from Polycaprolactone Substrates for Regulating Cell Attachment and Detachment. *Israel Journal of Chemistry*, 52(3-4) :339–346, 2012. [37](#), [38](#), [39](#)
- [120] J. Liu, W. He, L. Zhang, Z. Zhang, J. Zhu, L. Yuan, H. Chen, Z. Cheng, et X. Zhu. Bifunctional nanoparticles with fluorescence and magnetism via surface-initiated AGET ATRP mediated by an iron catalyst. *Langmuir*, 27 :12684–12692, 2011. [37](#)
- [121] K. Min, H. Gao, et K. Matyjaszewski. Use of Ascorbic Acid as Reducing Agent for Synthesis of Well-Defined Polymers by ARGET ATRP. *Macromolecules*, 40(6) :1789–1791, 2007. [37](#), [38](#)
- [122] B. V. Bhut, K. a. Conrad, et S. M. Husson. Preparation of high-performance membrane adsorbers by surface-initiated AGET ATRP in the presence of dissolved oxygen and low catalyst concentration. *Journal of Membrane Science*, 390-391 :43–47, 2012. [37](#)
- [123] P. Shivapooja, L. K. Ista, H. E. Canavan, et G. P. Lopez. ARGET-ATRP Synthesis and Characterization of PNIPAAm Brushes for Quantitative Cell Detachment Studies. *Biointerphases*, 7(1-4) :1–9, 2012. [37](#), [38](#), [45](#)
- [124] Y. Zhang, Y. Wang, C.-h. Peng, M. Zhong, W. Zhu, D. Konkolewicz, et K. Matyjaszewski. Copper-Mediated CRP of Methyl Acrylate in the Presence of Metallic Copper : Effect of Ligand Structure on Reaction Kinetics. *Macromolecules*, 45(1) :78–86, 2012. [38](#)

- 
- [125] Y. Wang, Y. Zhang, B. Parker, et K. Matyjaszewski. ATRP of MMA with ppm Levels of Iron Catalyst. *Macromolecules*, 44(11) :4022–4025, 2011. [38](#)
- [126] C. H. Worthley, K. T. Constantopoulos, M. Ginic-Markovic, R. J. Pillar, J. G. Matisons, et S. Clarke. Surface modification of commercial cellulose acetate membranes using surface-initiated polymerization of 2-hydroxyethyl methacrylate to improve membrane surface biofouling resistance. *Journal of Membrane Science*, 385-386 : 30–39, 2011. [38](#)
- [127] X. Qiu et S. Hu. “Smart” Materials Based on Cellulose : A Review of the Preparations, Properties, and Applications. *Materials*, 6(3) :738–781, 2013. [38](#)
- [128] K. Pan, X. Zhang, R. Ren, et B. Cao. Double stimuli-responsive membranes grafted with block copolymer by ATRP method. *Journal of Membrane Science*, 356(1-2) : 133–137, 2010. [38](#)
- [129] N. Singh, X. Cui, T. Boland, et S. M. Husson. The role of independently variable grafting density and layer thickness of polymer nanolayers on peptide adsorption and cell adhesion. *Biomaterials*, 28(5) :763–71, 2007. [38](#)
- [130] H. Alem, A.-S. Duwez, P. Lussis, P. Lipnik, A. M. Jonas, et S. Demoustier-Champagne. Microstructure and thermo-responsive behavior of poly(N-isopropylacrylamide) brushes grafted in nanopores of track-etched membranes. *Journal of Membrane Science*, 308(1-2) :75–86, 2008. [39](#)
- [131] I. Lokuge, X. Wang, et P. W. Bohn. Temperature-Controlled Flow Switching in Nanocapillary Array Membranes Mediated by Poly( N -isopropylacrylamide) Polymer Brushes Grafted by Atom Transfer Radical Polymerization †. *Langmuir*, 23(1) :305–311, 2007. [39](#)
- [132] L. Ren, S. Huang, C. Zhang, R. Wang, W. W. Tjiu, et T. Liu. Functionalization of graphene and grafting of temperature-responsive surfaces from graphene by ATRP "on water". *Journal of Nanoparticle Research*, 14(6), 2012. [39](#)
- [133] C. Zhang, P. T. Vernier, Y. H. Wu, et W. Yang. Surface chemical immobilization of parylene C with thermosensitive block copolymer brushes based on N-isopropylacrylamide and N-tert-butylacrylamide : Synthesis, characterization, and cell adhesion/detachment. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 100 B :217–229, 2012. [39](#)
- [134] P. Zhuang, A. Dirani, K. Glinel, et A. M. Jonas. Temperature Dependence of the Surface and Volume Hydrophilicity of Hydrophilic Polymer Brushes. *Langmuir*, 32(14) : 3433–3444, 2016. [39](#), [43](#)

- [135] W. Wu, J. Li, W. Zhu, Y. Jing, et H. Dai. Thermo-responsive cellulose paper via ARGET ATRP. *Fibers and Polymers*, 17(4) :495–501, 2016. [39](#)
- [136] L. li Yang, J. ming Zhang, J. song He, J. Zhang, et Z. hua Gan. Synthesis and characterization of temperature-sensitive cellulose-graft-poly(N-isopropylacrylamide) copolymers. *Chinese Journal of Polymer Science (English Edition)*, 33(12) :1640–1649, 2015. [39](#)
- [137] R. B. Vasani, S. J. P. McInnes, M. A. Cole, A. M. M. Jani, A. V. Ellis, et N. H. Voelcker. Stimulus-responsiveness and drug release from porous silicon films ATRP-grafted with poly(N-isopropylacrylamide). *Langmuir*, 27(12) :7843–7853, 2011. [39](#)
- [138] K. Kusolkamabot, P. Sae-ung, N. Niamnont, K. Wongravee, M. Sukwattanasinitt, et V. P. Hoven. Poly( N -isopropylacrylamide)-Stabilized Gold Nanoparticles in Combination with Tricationic Branched Phenylene-Ethynylene Fluorophore for Protein Identification. *Langmuir*, 29(39) :12317–12327, 2013. [39](#)
- [139] P.-W. Chung, R. Kumar, M. Pruski, et V. S.-Y. Lin. Temperature Responsive Solution Partition of Organic-Inorganic Hybrid Poly(N-isopropylacrylamide)-Coated Mesoporous Silica Nanospheres. *Advanced Functional Materials*, 18(9) :1390–1398, 2008. [39](#)
- [140] F. Audouin et A. Heise. Surface-initiated RAFT polymerization of NIPAM from monolithic macroporous polyHIPE. *European Polymer Journal*, 49(5) :1073–1079, 2013. [39](#), [40](#), [41](#)
- [141] A. Hufendiek, V. Trouillet, M. A. R. Meier, et C. Barner-Kowollik. Temperature responsive cellulose-graft-copolymers via cellulose functionalization in an ionic liquid and RAFT polymerization. *Biomacromolecules*, 15(7) :2563–2572, 2014. [39](#)
- [142] H. Takahashi, M. Nakayama, M. Yamato, et T. Okano. Controlled chain length and graft density of thermoresponsive polymer brushes for optimizing cell sheet harvest. *Biomacromolecules*, 11(8) :1991–9, 2010. [39](#), [40](#), [41](#), [46](#)
- [143] M. Barsbay et O. Güven. A short review of radiation-induced raft-mediated graft copolymerization : A powerful combination for modifying the surface properties of polymers in a controlled manner. *Radiation Physics and Chemistry*, 78 :1054–1059, 2009. [40](#)
- [144] C. Barner-Kowollik, T. P. Davis, J. P. a. Heuts, M. H. Stenzel, P. Vana, et M. Whittaker. RAFTing down under : Tales of missing radicals, fancy architectures, and mysterious holes. *Journal of Polymer Science, Part A : Polymer Chemistry*, 41(3) :365–375, 2003. [40](#)

- [145] C. Kang, R. M. Crockett, et N. D. Spencer. Molecular-Weight Determination of Polymer Brushes Generated by SI-ATRP on Flat Surfaces. *Macromolecules*, 47(1) :269–275, 2014. [40](#), [42](#)
- [146] Y. Yang, X. Song, L. Yuan, M. Li, J. Liu, R. Ji, et H. Zhao. Synthesis of PNIPAM polymer brushes on reduced graphene oxide based on click chemistry and RAFT polymerization. *Journal of Polymer Science Part A : Polymer Chemistry*, 50(2) :329–337, 2012. [40](#)
- [147] C. Barner-Kowollik, editor. *Handbook of RAFT Polymerization*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2008. [40](#), [41](#)
- [148] J. Bigot, D. Fournier, J. Lyskawa, T. Marmin, F. Cazaux, G. Cooke, et P. Woisel. Synthesis of thermoresponsive phenyl- and naphthyl-terminated poly(NIPAM) derivatives using RAFT and their complexation with cyclobis(paraquat-p-phenylene) derivatives in water. *Polymer Chemistry*, 1(7) :1024–1029, 2010. [41](#)
- [149] L. Chen, M. Liu, H. Bai, P. Chen, F. Xia, D. Han, et L. Jiang. Antiplatelet and thermally responsive poly(N-isopropylacrylamide) surface with nanoscale topography. *Journal of the American Chemical Society*, 131(30) :10467–10472, 2009. [42](#)
- [150] Y. Liu, V. Klep, B. Zdyrko, et I. Luzinov. Synthesis of high-density grafted polymer layers with thickness and grafting density gradients. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 21(25) :11806–13, 2005.
- [151] S. J. Eichhorn, A. Dufresne, M. Aranguren, N. E. Marcovich, J. R. Capadona, S. J. Rowan, C. Weder, W. Thielemans, M. Roman, S. Renneckar, W. Gindl, S. Veigel, J. Keckes, H. Yano, K. Abe, M. Nogi, a. N. Nakagaito, A. Mangalam, J. Simonsen, a. S. Benight, A. Bismarck, L. a. Berglund, et T. Peijs. Review : current international research into cellulose nanofibres and nanocomposites. *Journal of Materials Science*, 45(1) :1–33, 2009.
- [152] J. Lindqvist et E. Malmström. Surface modification of natural substrates by atom transfer radical polymerization. *Journal of Applied Polymer Science*, 100(5) :4155–4162, 2006. [42](#)
- [153] X. Wang, H. Tu, P. V. Braun, et P. W. Bohn. Length scale heterogeneity in lateral gradients of poly(N-isopropylacrylamide) polymer brushes prepared by surface-initiated atom transfer radical polymerization coupled with in-plane electrochemical potential gradients. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 22(2) :817–23, 2006. [42](#)
- [154] E. C. Cho, Y. D. Kim, et K. Cho. Thermally responsive poly(N-isopropylacrylamide) monolayer on gold : synthesis, surface characterization, and protein interaction/adsorption studies. *Polymer*, 45(10) :3195–3204, 2004. [42](#), [44](#)

- [155] X. Sui, S. Zapotoczny, E. M. Benetti, P. Schön, et G. J. Vancso. Characterization and molecular engineering of surface-grafted polymer brushes across the length scales by atomic force microscopy. *Journal of Materials Chemistry*, 20 :4981, 2010. [42](#)
- [156] K. N. Plunkett, X. Zhu, J. S. Moore, et D. E. Leckband. PNIPAM chain collapse depends on the molecular weight and grafting density. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 22(9) :4259–66, 2006. [42](#), [44](#)
- [157] N. Brouette, C. Xue, M. Haertlein, M. Moulin, G. Fragneto, D. E. Leckband, A. Halperin, et M. Sferrazza. Protein adsorption properties of OEG monolayers and dense PNIPAM brushes probed by neutron reflectivity. *European Physical Journal : Special Topics*, 213 :343–353, 2012. [42](#)
- [158] R. Iwata, P. Suk-In, V. P. Hoven, A. Takahara, K. Akiyoshi, et Y. Iwasaki. Control of nanobiointerfaces generated from well-defined biomimetic polymer brushes for protein and cell manipulations. *Biomacromolecules*, 5 :2308–2314, 2004. [42](#)
- [159] M. Yasaka. X-ray thin-film measurement techniques. *V. X-ray reflectivity measurement. The Rigaku Journal*, 26(2) :1–9, 2010. [42](#)
- [160] H. Tu, C. E. Heitzman, et P. V. Braun. Patterned poly(N-isopropylacrylamide) brushes on silica surfaces by microcontact printing followed by surface-initiated polymerization. *Langmuir*, 20(19) :8313–8320, 2004. [42](#)
- [161] A. Mizutani, A. Kikuchi, M. Yamato, H. Kanazawa, et T. Okano. Preparation of thermoresponsive polymer brush surfaces and their interaction with cells. *Biomaterials*, 29(13) :2073–2081, 2008. [42](#), [45](#)
- [162] F. Adar, E. Lee, S. Mamedov, et A. Whitley. Experimental Evaluation of the Depth Resolution of a Raman Microscope. *Microscopy and Microanalysis*, 16(S2) :360–361, 2010. [43](#)
- [163] Y. Maeda, T. Nakamura, et I. Ikeda. Changes in the Hydration States of Poly( N - n -propylmethacrylamide) and Poly( N -isopropylmethacrylamide) during Their Phase Transitions in Water Observed by FTIR Spectroscopy. *Macromolecules*, 34 (23) :8246–8251, 2001. [44](#)
- [164] R. Umapathi, P. M. Reddy, A. Kumar, P. Venkatesu, et C.-J. Chang. The biological stimuli for governing the phase transition temperature of the "smart" polymer PNIPAM in water. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 135 :588–595, 2015. [44](#)
- [165] T. Qu, A. Wang, J. Yuan, J. Shi, et Q. Gao. Preparation and characterization of thermo-responsive amphiphilic triblock copolymer and its self-assembled micelle for controlled drug release. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, 72(1) :94–100, 2009. [44](#)

- 
- [166] A. C. Kumar, H. B. Bohidar, et A. K. Mishra. The effect of sodium cholate aggregates on thermoreversible gelation of PNIPAM. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, 70 (1) :60–67, 2009. [44](#)
- [167] X. Cheng, H. E. Canavan, D. J. Graham, D. G. Castner, et B. D. Ratner. Temperature dependent activity and structure of adsorbed proteins on plasma polymerized N-isopropyl acrylamide. *Biointerphases*, 1(1) :61, 2006. [44](#)
- [168] D. Jones, J. Smith, W. Huck, et C. Alexander. Variable Adhesion of Micro-patterned Thermoresponsive Polymer Brushes : AFM Investigations of Poly(N-isopropylacrylamide) Brushes Prepared by Surface-Initiated Polymerizations. *Advanced Materials*, 14(16) :1130, 2002. [44](#)
- [169] H. E. Canavan, X. Cheng, D. J. Graham, B. D. Ratner, et D. G. Castner. Surface characterization of the extracellular matrix remaining after cell detachment from a thermoresponsive polymer. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 21(5) : 1949–55, 2005. [45](#)
- [170] J. Wei, J. Cai, Y. Li, B. Wu, X. Gong, et T. Ngai. Investigation of cell behaviors on thermo-responsive PNIPAM microgel films. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, 132 :202–207, 2015. [45](#)
- [171] G. Pan, Q. Guo, Y. Ma, H. Yang, et B. Li. Thermo-responsive hydrogel layers imprinted with RGDS peptide : A system for harvesting cell sheets. *Angewandte Chemie - International Edition*, 52(27) :6907–6911, 2013. [45](#)
- [172] M. a. Cooperstein et H. E. Canavan. Biological cell detachment from poly(N-isopropyl acrylamide) and its applications. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 26(11) :7695–707, 2010. [45](#)
- [173] N. Kaneshiro, M. Sato, M. Ishihara, G. Mitani, H. Sakai, et J. Mochida. Bioengineered chondrocyte sheets may be potentially useful for the treatment of partial thickness defects of articular cartilage. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 349(2) :723–731, 2006. [45](#)
- [174] T. Ide, K. Nishida, M. Yamato, T. Sumide, M. Utsumi, T. Nozaki, A. Kikuchi, T. Okano, et Y. Tano. Structural characterization of bioengineered human corneal endothelial cell sheets fabricated on temperature-responsive culture dishes. *Biomaterials*, 27 : 607–614, 2006. [45](#)
- [175] T. Shimizu, M. Yamato, Y. Isoi, T. Akutsu, T. Setomaru, K. Abe, A. Kikuchi, M. Umezu, et T. Okano. Fabrication of Pulsatile Cardiac Tissue Grafts Using a Novel 3-Dimensional Cell Sheet Manipulation Technique and Temperature-Responsive Cell Culture Surfaces. *Circulation Research*, 90(3) :40e–48, 2002. [45](#)
-

- [176] H. E. Canavan, D. J. Graham, X. Cheng, B. D. Ratner, et D. G. Castner. Comparison of native extracellular matrix with adsorbed protein films using secondary ion mass spectrometry. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 23(1) :50–6, 2007. [45](#)
- [177] W. Zhen et C. Lu. Surface modification of thermoplastic poly(vinyl alcohol)/saponite nanocomposites via surface-initiated atom transfer radical polymerization enhanced by air dielectric discharges barrier plasma treatment. *Applied Surface Science*, 258(18) :6969–6976, 2012. [45](#)
- [178] F. J. Xu, S. P. Zhong, L. Y. L. Yung, E. T. Kang, et K. G. Neoh. Surface-active and stimuli-responsive polymer-Si(100) hybrids from surface-initiated atom transfer radical polymerization for control of cell adhesion. *Biomacromolecules*, 5(100) : 2392–2403, 2004. [45](#)
- [179] Y. Akiyama, A. Kikuchi, M. Yamato, et T. Okano. Ultrathin Poly( N - isopropylacrylamide) Grafted Layer on Polystyrene Surfaces for Cell Adhesion/Detachment Control. *Langmuir*, 20(13) :5506–5511, 2004. [45](#)
- [180] Q. Yu, Y. Zhang, H. Chen, Z. Wu, H. Huang, et C. Cheng. Protein adsorption on poly(N-isopropylacrylamide)-modified silicon surfaces : Effects of grafted layer thickness and protein size. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, 76(2) :468–474, 2010. [46](#), [47](#)
- [181] B. Zhao, L. Greiner, et W. Leitner. Esterification of carboxylate-based ionic liquids with alkyl halides. *Chemical communications (Cambridge, England)*, 47(10) :2973–5, 2011. [47](#)
- [182] J.-P. Chen et T.-H. Cheng. Thermo-responsive chitosan-graft-poly(N-isopropylacrylamide) injectable hydrogel for cultivation of chondrocytes and meniscus cells. *Macromolecular bioscience*, 6(12) :1026–39, 2006. [47](#)
- [183] J.-P. Chen, C.-Y. Kuo, et W.-L. Lee. Thermo-responsive wound dressings by grafting chitosan and poly(N-isopropylacrylamide) to plasma-induced graft polymerization modified non-woven fabrics. *Applied Surface Science*, 262 :95–101, 2012. [47](#)
- [184] C. Ignacio, L. Barcellos, M. D. Ferreira, S. a. L. Moura, I. a. Soares, et R. L. Oréfice. In vivo tests of a novel wound dressing based on biomaterials with tissue adhesion controlled through external stimuli. *Journal of Materials Science : Materials in Medicine*, 22 :1357–1364, 2011. [47](#)
- [185] M. Tunc, X. Cheng, B. D. Ratner, E. Meng, et M. Humayun. Reversible thermosensitive glue for retinal implants. *Retina (Philadelphia, Pa.)*, 27 :938–942, 2007. [47](#)

- [186] Qu'est-ce qu'un médicament?, Ministère des Affaires sociales et de la Santé, <http://social-sante.gouv.fr/soins-et-maladies/medicaments/le-bon-usage-des-medicaments/article/qu-est-ce-qu-un-medicament>, 2016. 48
- [187] Les dispositifs médicaux, Ministère des Affaires sociales et de la Santé, <http://social-sante.gouv.fr/soins-et-maladies/autres-produits-de-sante/article/les-dispositifs-medicaux>, 2016. 48
- [188] Directive 2001/83/CE instituant un code communautaire relatif aux médicaments à usage humain. In *Journal officiel des Communautés européennes*, volume 174, page 133. 2012. 48, 52
- [189] Règlement (UE) 2017/745 relatif aux dispositifs médicaux. *Journal officiel de l'Union européenne*, L 117/1(2), 2017. 48, 49, 50, 51
- [190] Dispositif Médical incorporant une substance médicamenteuse à titre accessoire. In *Guide pour les organismes notifiés et les fabricants relatif à la procédure à suivre et à la documentation nécessaire pour la consultation de l'ANSM sur la sécurité, la qualité et le profil bénéfique / risque de l'ajout de la substance à un dispositif médi.* 2012. 48, 52
- [191] Directive 93/42/CEE relative aux dispositifs médicaux. In *Journal officiel des Communautés européennes*, pages 1–63. 2007. 49
- [192] EN ISO 13485, Dispositifs médicaux — Systèmes de management de la qualité — Exigences à des fins réglementaires. 52
- [193] I. Kratochvílová, M. Golan, K. Pomeisl, J. Richter, S. Sedláková, J. Šebera, J. Mičová, M. Falk, I. Falková, D. Řeha, K. W. Elliott, K. Varga, S. E. Follett, et D. Šimek. Theoretical and experimental study of the antifreeze protein AFP752, trehalose and dimethyl sulfoxide cryoprotection mechanism : correlation with cryopreserved cell viability. *RSC Adv.*, 7(1) :352–360, 2017. 54



---

## Chapitre 2

# Optimisation et caractérisations physico-chimiques de la matrice absorbante

### Sommaire

---

<b>2.1 Introduction</b> . . . . .	<b>75</b>
<b>2.2 Caractérisation des biopolymères</b> . . . . .	<b>76</b>
2.2.1 Alginate : Ratio M/G et masse molaire . . . . .	77
2.2.2 Chitosane : DA et masse molaire . . . . .	82
<b>2.3 Formation du complexe polyélectrolyte avant sa mise en forme</b> . . . . .	<b>86</b>
<b>2.4 Mise en forme des films : influence du séchage sur les propriétés physico-chimiques de la matrice absorbante</b> . . . . .	<b>92</b>
2.4.1 Etude des propriétés structurales . . . . .	93
2.4.2 Caractérisation des propriétés d'usage . . . . .	99
2.4.3 Choix du procédé de séchage . . . . .	108
<b>2.5 Vers la compréhension des xérogels</b> . . . . .	<b>109</b>
2.5.1 Propriétés de surface . . . . .	110
2.5.2 Comportement physico-chimique . . . . .	112
<b>2.6 Conclusion</b> . . . . .	<b>121</b>
<b>Références</b> . . . . .	<b>121</b>

---

## 2.1 Introduction

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, les fistules pancréatiques sont des complications postopératoires fréquentes. Cette communication anormale entre le canal pancréatique et la cavité abdominale entraîne une perte de jus pancréatique pouvant entraîner de sévères conséquences pour le patient.

Le développement d'un biomatériau apte à absorber ces fuites est une voie d'élaboration dans la prévention de ces fistules. La figure 2.1 représente le biomatériau étudié dans cette thèse pour limiter l'impact des fuites pancréatiques. Le biomatériau consiste ainsi en une matrice absorbante modifiée en surface afin de lui conférer des propriétés de bioadhésion thermorégulée à l'organe.

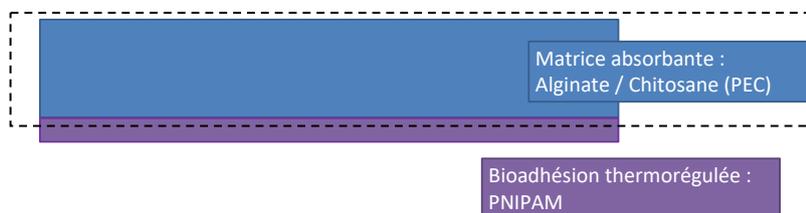


FIGURE 2.1 – Structure du biomatériau étudié dans cette thèse.

Ce chapitre porte sur le développement de la matrice absorbante. L'alginate et le chitosane sont deux polymères biosourcés couramment utilisés sous forme de **complexes polyélectrolytes (PECs)**. Etant issus de la biomasse, leurs caractéristiques varient grandement d'une source à l'autre et la première tâche de ce travail consiste donc à les caractériser.

La deuxième étude présentée porte sur la formation des **PECs** à base d'alginate et de chitosane avant leur mise en forme.

Il est toutefois connu que, après la formation des **PECs**, la méthode utilisée pour le séchage conditionne la structure du matériau obtenu [1]. Ce chapitre s'intéresse donc dans un troisième temps à la mise en forme des **PECs** sous forme de films. Il s'agit de comparer l'impact de la méthode de séchage sur la structure interne et les propriétés des matériaux obtenus notamment en termes d'absorption (gonflement) ou de résistance enzymatique, deux propriétés importantes pour une application pansement.

Dans une dernière partie, le biomatériau présentant les propriétés les plus appropriées sera plus amplement étudié. Son état de surface ainsi que son comportement physico-chimique dans différents milieux seront examinés.

## 2.2 Caractérisation des biopolymères

Cette première partie porte sur la caractérisation de l'alginate et du chitosane, deux biopolymères utilisés tout au long de ces travaux. Les polymères issus de la biomasse sont généralement peu définis et relativement impurs. Leur caractérisation est donc un point essentiel avant d'étudier leurs propriétés.

Ces polymères peuvent cependant s'avérer difficiles à purifier. Lors de ce travail, des essais de purification par filtration et centrifugation ont été réalisés. Entre autres, des membranes de nitrocellulose ont été testées pour la déprotéinisation des biopolymères.

Toutefois, du fait de la viscosité élevée des gels, ces techniques se sont montrées chronophages et la détermination de l'efficacité de purification incertaine. Les polymères ont donc finalement été utilisés tels que reçus par le fournisseur.

### 2.2.1 Alginate : Ratio M/G et masse molaire

En tant que biopolymère, les caractéristiques de l'alginate dépendent de la source dont il provient. Ce point est important puisque les propriétés du polymère vont dépendre de ces caractéristiques. La masse du polymère va définir la viscosité des gels obtenus et il a par exemple été montré que des gels élaborés à partir d'alginate de haute masse molaire pouvaient endommager des cellules lors de leur incorporation ou de l'injection du gel, du fait de contraintes de cisaillement élevées [2]. Le rapport entre unités guluroniques (G) et mannuroniques (M) va quant à lui modifier les interactions possibles entre l'alginate et des cations réticulants comme le calcium  $\text{Ca}^{2+}$ , puisque les sous-unités G sont plus disponibles 1.8. L'impact des proportions entre M et G est cependant plus complexe que cela (voir section 1.2.1) et l'alternance des unités G et M (bloc GM) permet elle aussi une réticulation efficace [3]. Avant d'étudier son comportement en interaction avec le chitosane, l'alginate a donc été caractérisé.

La détermination de la masse molaire d'un polymère biosourcé diffère quelque peu des méthodes utilisées pour la caractérisation de polymères synthétiques. En tant que polymères issus de la biomasse, ces derniers peuvent présenter des polydispersités importantes. La détermination d'une masse molaire moyenne en nombre ( $M_n$ ) ou en masse ( $M_w$ ) n'est ainsi pas réellement significative pour rendre du poids moléculaire considéré. En lieu et place des techniques classiques comme la *chromatographie d'exclusion stérique (CES)*, on utilise donc préférentiellement des techniques viscosimétriques afin de déterminer  $M_v$ , la masse molaire viscosimétrique.

Pour déterminer  $M_v$ , il convient d'étudier les propriétés d'écoulement de gels dilués dans des solvants spécifiques. La viscosité d'une solution est directement dépendante des interactions entre les chaînes de polymère et le solvant. L'utilisation de concentrations en polymère faibles permet de diminuer les interactions polymères/polymère. En outre, dans le cas de polyélectrolytes comme l'alginate ou le chitosane, des forces de répulsion électrostatiques peuvent repousser artificiellement les chaînes les unes des autres. L'adjonction de sels permet d'écranter les charges ce qui diminue ces forces tout en favorisant les interactions hydrophobes (effet «salting-out»). Il en résulte une contraction des chaînes et ainsi une baisse de la viscosité qui rend mieux compte du rayon hydrodynamique naturel des chaînes [4–6].

Une des méthodes souvent utilisées est la viscosimétrie capillaire. Elle consiste à mesurer le temps d'écoulement de gels à différentes concentrations diluées  $C$  dans un capillaire (figure 2.2). On définit alors plusieurs viscosités  $\eta$  calculables comme suit :

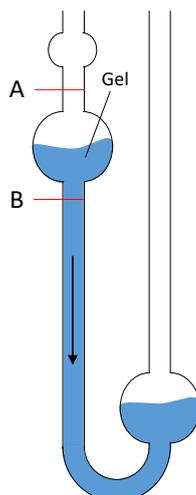


FIGURE 2.2 – Principe du viscosimètre capillaire : le temps  $\delta t$  mis par le fluide pour descendre de A à B est mesuré et permet de déterminer sa viscosité.

$$\text{viscosité relative} \quad \eta_{rel} = \frac{\eta_{gel}}{\eta_{solvant}} \quad (2.1)$$

$$\text{viscosité spécifique} \quad \eta_{spe} = \eta_{rel} - 1 \quad (2.2)$$

$$\text{viscosité réduite} \quad \eta_{red} = \frac{\eta_{spe}}{C} \quad (2.3)$$

$$\text{viscosité inhérente} \quad \eta_{inh} = \frac{\ln \eta_{rel}}{C} \quad (2.4)$$

On peut alors déterminer :

$$\text{viscosité intrinsèque} \quad [\eta] = \lim_{C \rightarrow 0} \eta_{red} \quad (2.5)$$

$$\text{et} \quad [\eta] = \lim_{C \rightarrow 0} \eta_{inh} \quad (2.6)$$

En régime laminaire, la viscosité étant linéairement proportionnelle au temps d'écoulement (*loi de Poiseuille*), on peut remplacer l'équation 2.1 par  $\eta_{rel} = \delta t_{gel} / \delta t_{solvant}$ , où  $\delta t$  est le temps d'écoulement du fluide considéré dans le capillaire. La figure 2.3 représente l'évolution de  $\eta_{red}$  et  $\eta_{inh}$  en fonction de la concentration. La projection à  $C = 0$  permet d'obtenir la viscosité à concentration nulle, c'est-à-dire la viscosité intrinsèque  $[\eta]$  définie par les équations 2.5 et 2.6. Pour l'alginate ici étudié, il apparaît  $\eta_{red,0} = 13,4 \text{ dL.g}^{-1}$  et  $\eta_{inh,0} = 12,8 \text{ dL.g}^{-1}$ , soit une moyenne  $[\eta]$  de  $13,1 \text{ dL.g}^{-1}$ . La loi de Mark-Houwink-Sakurada relie alors la viscosité intrinsèque à la masse molaire viscosimétrique  $M_v$ , tel que :

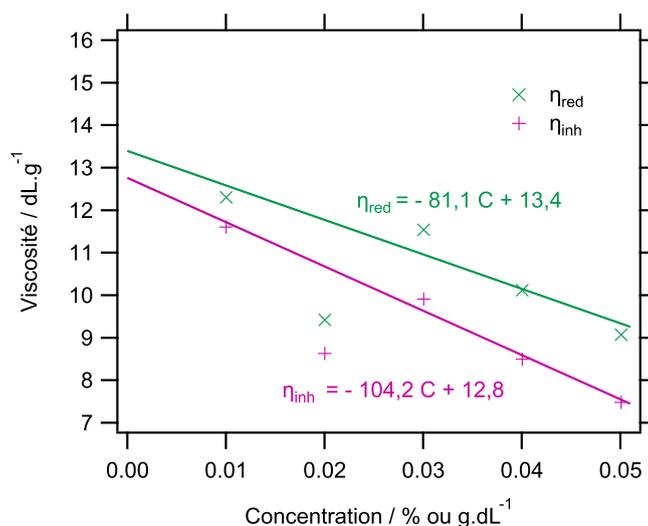


FIGURE 2.3 – Etude viscosimétrique (viscosimétrie capillaire) de gels d'alginate à différentes concentrations dans 0,1 M NaCl, à 25 °C. Les points à 0,02 %, visiblement aberrants, n'ont pas été pris en compte pour les calculs.

$$[\eta] = K \times M\nu^\alpha \quad (2.7)$$

Les paramètres  $K$  et  $\alpha$  dépendent du polymère considéré, de la température et du solvant utilisé. Pour l'alginate, les paramètres  $K$  et  $\alpha$  dans 0,1 M NaCl à 25 °C sont référencés :  $K = 6,9 \cdot 10^{-6} \text{ mL.g}^{-1}$  et  $\alpha = 1,13$  [7, 8]. On calcule alors une masse molaire viscosimétrique  $M\nu = 360 \text{ kDa}$  (ou  $\text{kg/mol}$ ).

La masse molaire peut donc être extraite via viscosimétrie capillaire. Cette technique reste cependant relativement longue à mettre en place, bien qu'il existe des systèmes automatisés. L'utilisation de la viscosimétrie capillaire tient majoritairement au fait que la détermination de la viscosité intrinsèque nécessite de travailler avec des solutions très diluées, dont la viscosité de fait très faible est difficile à évaluer avec précision. Cependant, l'amélioration des instruments de mesure rhéologiques permet aujourd'hui de déterminer avec précision les viscosités de telles solutions diluées. La figure 2.4, gauche, présente l'étude rhéologique (rotation cône/plan) de solutions d'alginate aux mêmes concentrations que précédemment. On observe une évolution qui semble linéaire dans la gamme de cisaillement étudiée, ce qui traduit un comportement newtonien et donc une viscosité apparente  $\mu$  indépendante de la vitesse de cisaillement  $\dot{\epsilon}$ , puisque  $\mu = \tau/\dot{\epsilon}$ , avec  $\tau$  la contrainte mesurée. Il s'agit cependant probablement d'un comportement pseudo-newtonien lié à des concentrations faibles et une gamme d'observation réduite, les gels d'alginate NaCl 0,1 M, présentant habituellement un comportement rhéofluidifiant [6]. L'application de l'équation 2.1 peut se faire par  $\eta_{rel} = \mu_{gel}/\mu_{solvant}$ . De la même manière que pour la viscosité capillaire, la projection de  $\eta_{red}$   $\eta_{inh}$  à concentration nulle donne respectivement  $12,6 \text{ dL.g}^{-1}$  et  $\eta_{inh} = 12,3 \text{ dL.g}^{-1}$ , soit une moyenne  $[\eta]$  de  $13,1 \text{ dL.g}^{-1}$

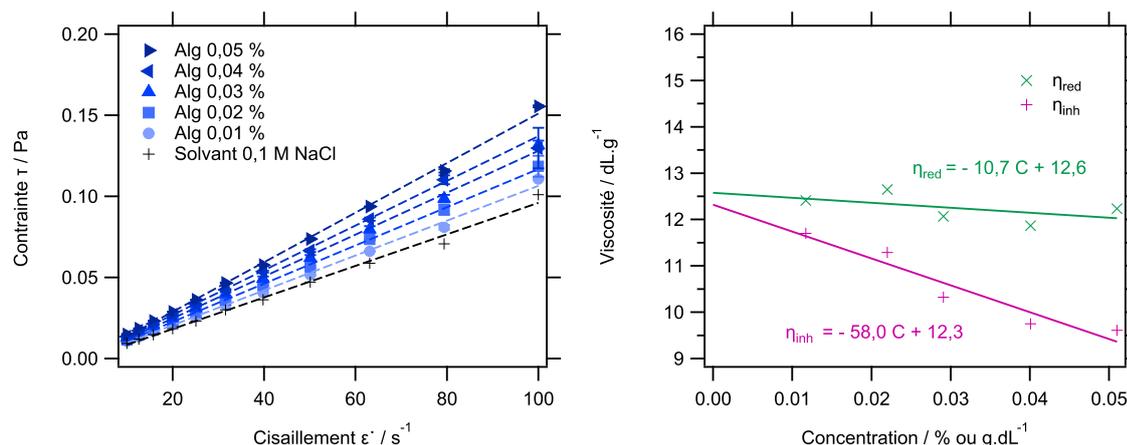


FIGURE 2.4 – Etude rhéologique (rotation cône/plan) de gels d’alginate à différentes concentrations dans 0,1 M NaCl, à 25 °C avec, à gauche, la contrainte mesurée en fonctions du cisaillement et, à droite, la viscosité en fonction de la concentration. Barres d’erreurs comprises dans les symboles.

(figure 2.4, droite). L’application de la loi de Mark-Houwink-Sakurada (équation 2.7) renvoie, avec  $K = 6,9.10^{-6} \text{ mL.g}^{-1}$  et  $\alpha = 1,13$ , une masse molaire viscosimétrique  $M_v = 340 \text{ kDa}$  (ou  $\text{kg/mol}$ ). Cette valeur est proche de la masse déterminée par viscosimétrie capillaire (360 kDa). Il semble ainsi que les deux méthodes soient valides et la valeur de 340 kDa, mesurée par rhéologie, sera considérée pour la suite.

Dans le cas de l’alginate, le deuxième paramètre à déterminer est le ratio M/G. La proportion du rapport M/G peut se faire par RMN. Il s’agit de s’intéresser aux protons anomériques du polysaccharide. En effet, l’environnement de chacun des protons portés par le cycle dépend de la conformation de l’unité considérée ainsi que de celle des unités voisines (figure 2.5, a). En fonction de l’alternance des conformations (GG, MM et GM = MG), la proximité d’un proton avec par exemple les groupements OH va augmenter son déblindage. A la fin des années 70, Grasdalen *et al.*, en utilisant les calculs structurels réalisés par Whittington [10, 10], a assigné les différents signaux anomériques observés en RMN à leurs protons en fonction des conformations de l’alginate (figure 2.5, b) [9, 13]. Les gels d’alginate étant très visqueux, la résolution des spectres RMN est en général faible. Afin de réduire la viscosité des solutions, il est possible d’hydrolyser le polymère. Cette étape préparatoire est toutefois longue et dénaturante. Une autre possibilité consiste à réaliser l’analyse RMN en solution très diluée. Dans ce cas, le signal attribué à l’eau résiduelle contenue dans l’alginate tend à recouvrir la zone d’intérêt pour la détermination du ratio M/G [12, 14]. La méthode DOSY («diffusion order spectroscopy») permet de réduire le signal de petites molécules telles que l’eau [15]. L’augmentation de la température permet quant à elle de diminuer la viscosité tout en décalant le signal de l’eau vers les déplacements chimiques faibles [12]. La combinaison de la méthode DOSY et d’une température élevée permet l’obtention d’un spectre résolu de la zone anomérique (figure 2.5, b).

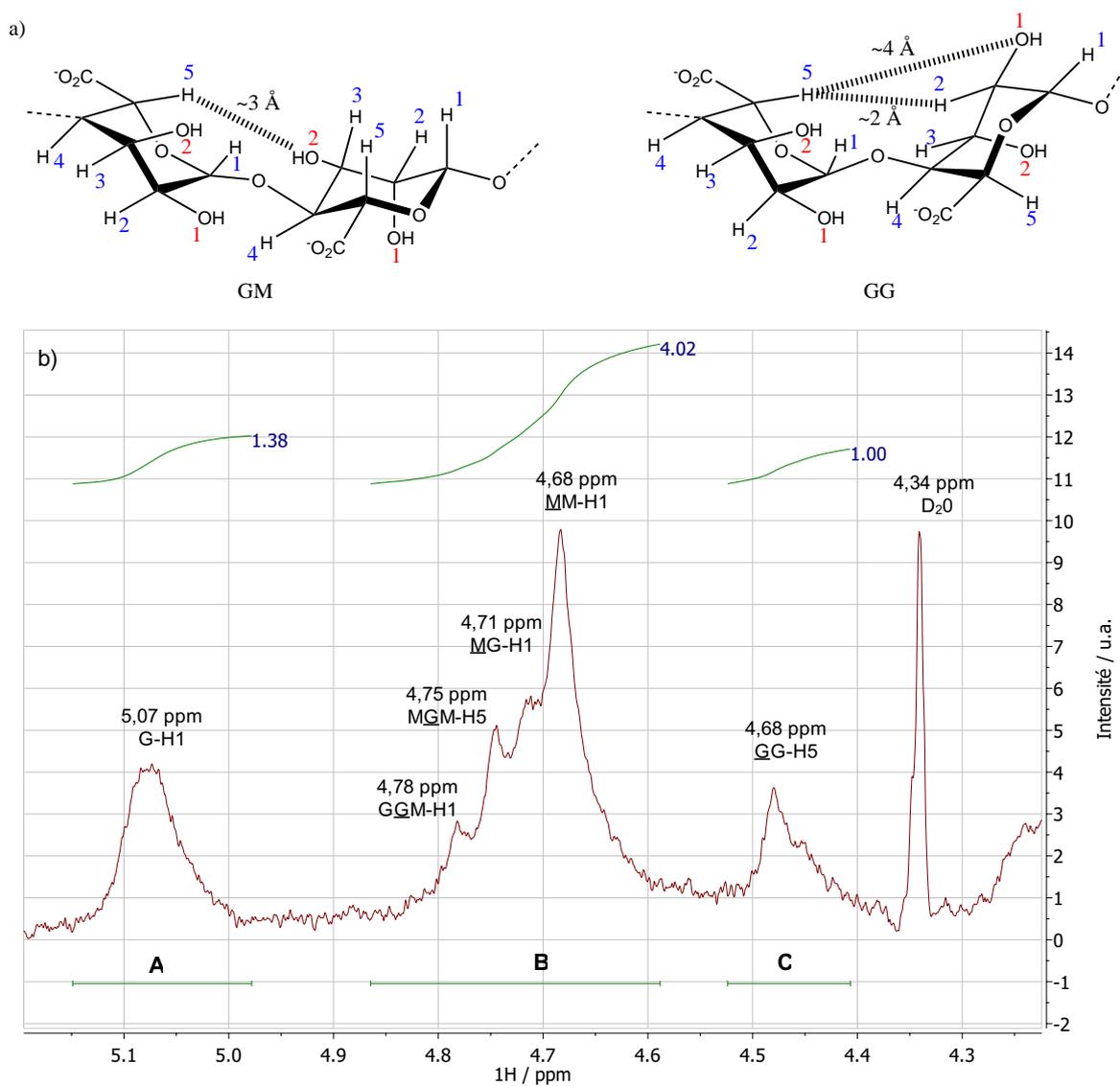


FIGURE 2.5 – (a) Exemples d'alternances des conformations possibles des unités G et M de l'alginate, issus des travaux de Whittinجتon tel que reporté par Grasdalen *et al.* [9–11] et (b) spectre RMN DOSY 1H de l'alginate réalisé à 70 °C. Le signal «A» sert de référence et est fixé 5,07 ppm [12].

Les formules suivantes sont alors utilisées pour calculer les différentes fractions F de l'alginate à partir des intégrales I [12, 13, 16] :

$$F_G + F_M = 1 \quad (2.8)$$

$$F_G = F_{GG} + F_{GM} \quad (2.9)$$

$$F_M = F_{MM} + F_{MG} \quad (2.10)$$

$$F_{GM} = F_{MG} \quad (2.11)$$

Avec

$$F_G = \frac{I_A}{I_B + I_C} \quad (2.12)$$

$$F_{GG} = \frac{I_C}{I_B + I_C} \quad (2.13)$$

Les fractions calculées sont répertoriées tableau 2.1. On retrouve une large majorité d'unités M, avec un ratio M/G de 2,7. Dans la littérature, l'analyse statistique d'une centaine d'alginate commerciaux a montré que les ratios M/G étaient en moyenne de l'ordre de  $1,3 \pm 0,06$ , ce qui renvoie l'alginate étudié ici à la catégorie des alginate riches en unités M [16]. La part des fractions aptes à former un réseau avec le cation  $Ca^{2+}$ , c'est-à-dire les fractions  $F_G$  et  $F_{GM}/F_{MG}$ , est ainsi minoritaire [3]. Toutefois, il a été montré que le ratio M/G n'avait pas d'influence sur la complexation entre l'alginate et le chitosane, dont la caractérisation est présentée dans la section suivante [17].

TABLEAU 2.1 – Les différentes fractions de l'alginate, déterminées par RMN.

Fraction	%
$F_G$	27
$F_M$	73
$F_{GG}$	20
$F_{MM}$	66
$F_{GM}/F_{MG}$	14

## 2.2.2 Chitosane : DA et masse molaire

Les deux paramètres qui caractérisent le chitosane sont sa masse molaire et son *degré d'acétylation* (DA). Ces paramètres influent sur ses propriétés biologiques, mécaniques et sa capacité de complexation (voir section 1.2.2), ils sont donc importants à déterminer avant toute étude [18, 19].

Comme nous l'avons vu dans le cas de l'alginate, la détermination de la masse molaire

viscosimétrique peut s'effectuer par des mesures rhéologiques, plus simples et rapides que la viscosimétrie capillaire. La figure 2.6, gauche, présente des mesures de contraintes face à l'application d'un cisaillement. Tout comme l'alginate, le chitosane exhibe généralement un comportement rhéofluidifiant [20]. Aux concentrations faibles utilisées et sur la gamme étudiée, le comportement observé s'apparente toutefois à un comportement newtonien. La viscosité ne dépend donc pas de la vitesse de cisaillement. En utilisant les équations 2.1 à 2.6, la projection à concentration nulle de  $\eta_{red}$  et  $\eta_{inh}$  renvoie respectivement  $9,0 \text{ dL.g}^{-1}$  et  $8,7 \text{ dL.g}^{-1}$ , soit une moyenne de  $8,85 \text{ dL.g}^{-1}$  (figure 2.6, droite). En considérant les coefficients de Mark-Houwink-Sakurada du chitosane dans une solution aqueuse à  $0,1 \text{ M AcOOH}$  et  $0,2 \text{ M NaCl}$   $K = 1,81 \cdot 10^{-5} \text{ mL.g}^{-1}$  et  $\alpha = 0,93$ , l'équation 2.7 renvoie une masse molaire viscosimétrique  $M_w = 1\,300 \text{ kDa}$  [4].

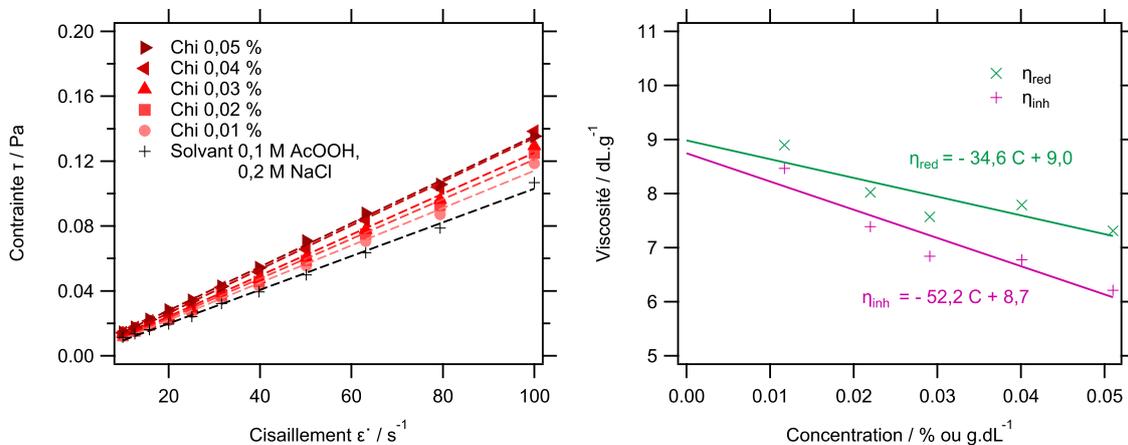


FIGURE 2.6 – Etudes rhéologiques de gels de chitosane dissous dans une solution aqueuse à  $0,1 \text{ M AcOOH}$  et  $0,2 \text{ M NaCl}$ , à  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Barres d'erreurs comprises dans les symboles.

Pour la détermination du **DA**, il existe différentes méthodes, plus ou moins fiables : par spectroscopie UV [22], FTIR [21, 23] ou RMN [24, 25]. La détermination infrarouge est possible selon diverses méthodes. La figure 2.7 présente le spectre FTIR du chitosane. L'assignation des bandes a été effectuée selon Kasaai *et al.* et Lawrie *et al.* [23, 26]. Parmi les méthodes existantes, il a été montré que la méthode de Shigemasa *et al.* était cohérente puisque proche des résultats obtenus en RMN [21, 23]. Pour des **DA** faibles (0-60 %), il apparaît en effet que la relation entre le ratio des aires de la bande des C-H ( $2950\text{-}2880 \text{ cm}^{-1}$ ) et de la bande des amines N-H (autour de  $1560 \text{ cm}^{-1}$ ) est linéaire. La méthode permet alors de calculer le **DA** comme suit :

$$DA = \frac{A_{1560}}{A_{2875}} / 0,0125 - 0,2 \quad (2.14)$$

En utilisant cette relation, on détermine un **DA** de 29 % (figure 2.7). La RMN reste cependant la méthode la plus fiable pour la détermination du **DA**. Comme pour l'alginate, l'acquisition d'un spectre résolu n'est pas chose aisée, d'autant plus que le chitosane n'est

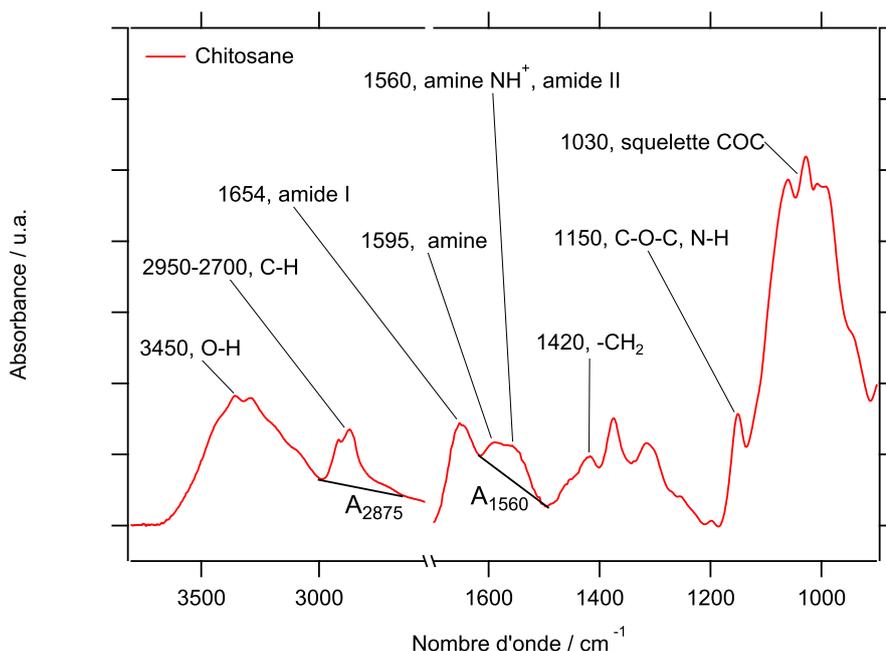


FIGURE 2.7 – Spectre infrarouge (ATR-FTIR) du chitosane. Les aires représentées sont utilisées la détermination du DA par la méthode de Shigemasa [21].

pas hydrosoluble et nécessite la présence d'un acide pour permettre sa solubilisation en milieu aqueux. La spectroscopie RMN  $^{13}\text{C}$  a donc été réalisée sous forme solide (figure 2.8). Les assignations ont été faites suivant Heux *et al.* [24]. Il est alors possible de calculer le DA en calculant le rapport entre les carbones de l'acétyle et les carbones du cycle, en tenant compte de la stœchiométrie. On obtient ainsi la formule [24, 25] :

$$\text{DA}(\%) = \frac{100 \times I_{\text{CH}_3}}{(I_{\text{C}_1} + I_{\text{C}_2} + I_{\text{C}_3} + I_{\text{C}_4} + I_{\text{C}_5} + I_{\text{C}_6})/6} \quad (2.15)$$

Il est alors calculé  $\text{DA} = 23\%$ . La valeur obtenue par FTIR est légèrement supérieure (29 %). Le manque de précision de la mesure par FTIR réside dans la difficulté à définir avec précision les lignes de base à utiliser pour les mesures d'aire. De plus, la relation linéaire entre le ratio des aires et le DA n'est pas si évidente, comme reporté par Miya *et al.* [27], et il semble que la linéarité soit tributaire de conditions d'acquisition des spectres précises [21]. La RMN solide semble donc apporter une information plus précise sur le DA réel du chitosane étudié.

Les résultats de la caractérisation des biopolymères est présentée tableau 2.2. On peut alors s'intéresser à la formation de PECs d'alginate et de chitosane.

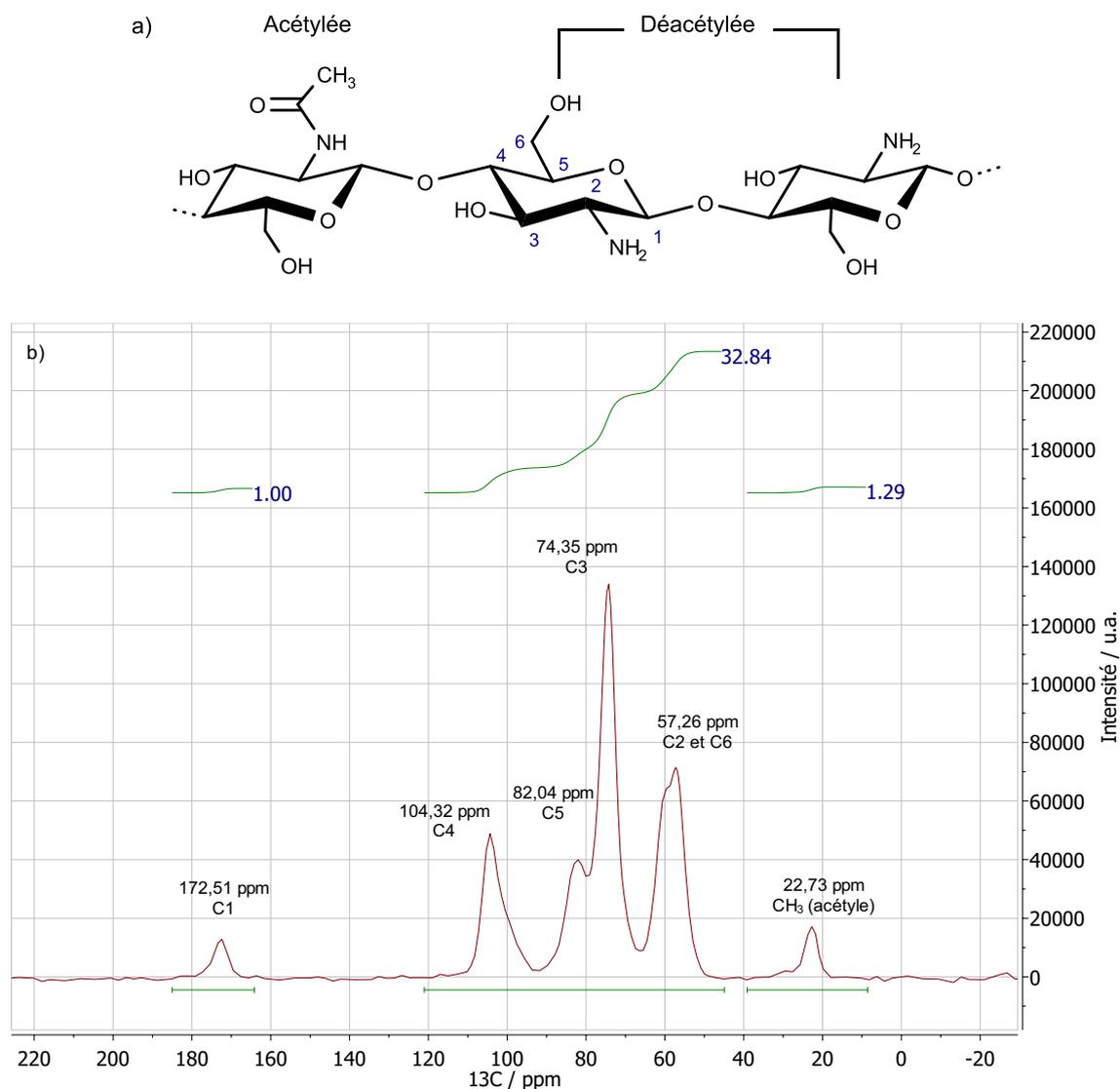


FIGURE 2.8 – (a) La structure du chitosane avec la numérotation des carbones et (b) spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (CP MAS quantitatif) du chitosane. Les assignations sont réalisées à partir de la Ref [24].

TABLEAU 2.2 – Caractéristique de l'alginate et du chitosane utilisés.

	Alginate	Chitosane
Mv (kDa)	340	1 300
M/G	2,7	-
DA (%)	-	23

## 2.3 Formation du complexe polyélectrolyte avant sa mise en forme

Les caractérisations de l'alginate et du chitosane présentées dans la section précédente ont permis de déterminer la nature plus précise des polysaccharides étudiés. La présente section se concentre sur l'étude texturométrique de gels d'alginate et de chitosane isolés, ainsi qu'à leur mélange sous forme de PEC.

L'analyse de texture se réalise en appliquant des forces contrôlées à l'échantillon et en enregistrant les réponses en termes de force, déformation et durée. Le test consiste à faire pénétrer une sonde dans des conditions bien définies dans l'échantillon. Il s'agit donc surtout de réaliser une étude comparative sur une série d'échantillons caractérisés dans les exactes mêmes conditions (contenant), sur le même équipement et avec le même mode opératoire. Les mesures sont faites au moyen d'un analyseur de texture et d'un plongeur cylindrique comme sonde. Il effectue un cycle charge - décharge (montée - descente) dans l'échantillon (figure 2.9). Le résultat de la mesure est un graphique représentant la force (exercée par l'échantillon sur la sonde) en fonction de la distance (parcourue par le bras mobile) (figure 2.10) ou en fonction du temps du test. Il est alors possible de déduire de ce type de courbe différents paramètres. Il est alors possible de déduire de ce type de courbe différents paramètres. Tout d'abord, la consistance, qui représente la résistance à la pénétration, peut être déterminée en relevant la contrainte maximum  $\sigma_{max}$ . L'adhésivité du matériau peut-elle être déterminée en mesurant l'aire sous la courbe après la sortie de la sonde. Il est cependant difficile de définir les limites de l'aire à mesurer. On se propose donc d'utiliser la force minimum,  $\sigma_{min}$ , comme indicateur de l'adhésivité. Enfin, l'élasticité peut être évaluée. Dans le cas d'un matériau purement élastique, on peut en effet supposer que le matériau renvoie la même force lors de la descente de la sonde que de sa remontée. Dans un cas idéal, l'aire de sortie de la sonde  $A_{sor}$  est alors égale à l'aire de pénétration  $A_{pen}$ . On pose alors que l'élasticité E, en pourcentage, est égale à  $A_{sor}/A_{pen}$ .

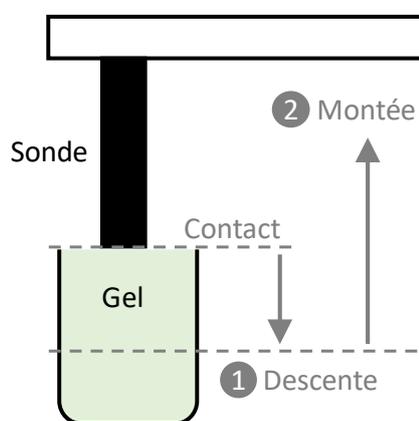


FIGURE 2.9 – Principe de l'analyse de texture.

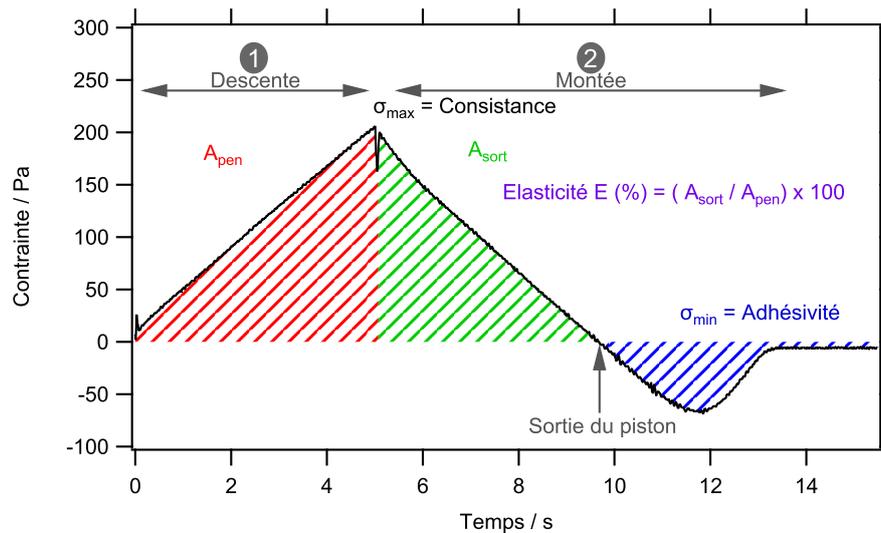


FIGURE 2.10 – Courbe type d’une analyse de texture. La sonde est plongée dans un gel (descente) jusqu’à 1 cm de profondeur. La sonde est alors remontée. Le texturomètre mesure la force, positive (répulsive) ou négative (attractive), ressentie par la sonde lors du trajet. La consistance, l’élasticité et l’adhésivité peuvent être extraites de ce type d’analyse. Courbe type obtenue sur un gel de chitosane.

Pour un matériau élastique idéal, on aurait donc  $E = 100\%$ .

Des gels d’alginate, de chitosane et leur mélange ont été analysés. Pour les mélanges d’alginate/chitosane (ratio massique 63/37), ceux-ci ont été analysés avant (PEC) et après (PEC-UT) homogénéisation à l’Ultra-Turrax (UT), un procédé de mélange impliquant des contraintes de cisaillement élevées. Lors de précédentes études, l’homogénéisation à l’UT s’est en effet montrée optimale pour les propriétés des PECs obtenus en favorisant la formation de liaisons intimes entre l’alginate et le chitosane [28]. En outre, la même étude a révélé de meilleures propriétés pour les PECs réalisés avec le ratio massique de 63/37 alginate/chitosane utilisé ici. La figure 2.11 reporte les courbes de texture obtenues pour les différents gels (Alg, Chi, PEC et PEC-UT). Trois cycles de mesure ont été effectués sur chaque gel. Les différents types de gels montrent alors clairement des comportements différents. La répétition de trois cycles sur les gels d’alginate et de chitosane isolés ne montre aucune variation de comportement entre chaque mesure (figure 2.11, Alg et Chi). Lorsqu’ils sont mélangés (PEC et PEC-UT), il semble que la répétition des cycles entraîne une augmentation de la consistance ( $\sigma_{max}$ ) avec une modification de la pente de la contrainte lors de la pénétration. Cette observation pourrait correspondre à un phénomène d’écrasement plastique (compression non réversible) des gels lors des cycles de descente. Les compressions suivantes seraient alors plus difficiles du fait de l’état plus dense des gels, ce qui traduirait un comportement plus plastique des mélanges PEC et PEC-UT en comparaison des gels d’alginate et de chitosane.

A partir de ces courbes, l’élasticité, la consistance ainsi que l’adhésivité ont été déterminées et sont résumées dans la figure 2.12, haut. Les mesures présentées correspondent à celles obtenues lors des premiers cycles. On retrouve alors en effet des élasticités im-

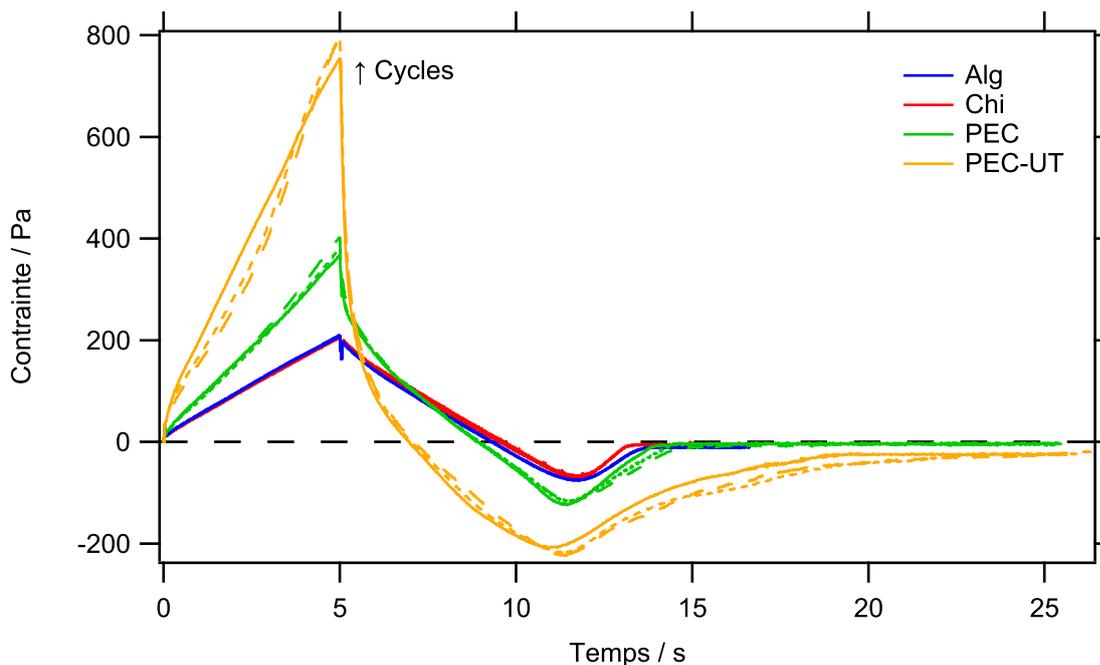


FIGURE 2.11 – Courbes de textures de l’alginate (bleu), du chitosane (rouge) et des PECs avant (vert) et après (orange) passage à l’Ultra-Turrax (PEC-UT). 3 cycles de mesures ont été réalisés sur chaque gel.

portantes pour les gels d’alginate et de chitosane, avec respectivement 68 % et 76 %. Cette élasticité diminue fortement lors du mélange des polymères, avec  $E = 49\%$  pour PEC. La diminution s’accroît lorsque le mélange est homogénéisé à l’UT avec une élasticité mesurée de seulement 16 % pour PEC-UT. Cette élasticité plus faible pour les mélanges est cohérente avec la compression plastique observée lors de la répétition des cycles présentée plus haut et est imputée à la formation d’un réseau entre les deux polymères, c’est-à-dire un complexe polyélectrolyte, qui rend plus difficile le mouvement des chaînes. Comme déjà reporté, le passage à l’UT favorise la formation de ce type de réseau [28].

Dans un même temps, le mélange entre l’alginate et le chitosane s’accompagne d’une nette augmentation de la consistance qui passe d’environ 210 Pa pour les gels isolés à 383 Pa et 781 Pa pour PEC et PEC-UT, respectivement. L’augmentation de la résistance à la déformation corrèle à la diminution de l’élasticité et semble cohérente avec la formation d’un réseau entre l’alginate et le chitosane, favorisé par l’action de l’UT.

Les mesures d’adhésivité mettent en l’avant une augmentation liée à la formation du PEC (figure 2.12, bas). Cette augmentation peut être reliée à une meilleure cohésion du gel pour PEC et PEC-UT, du fait de la présence d’un réseau entre les polymères.

La baisse de l’élasticité associée à l’augmentation de la consistance et de l’adhésivité traduit ainsi la formation d’interactions entre l’alginate et le chitosane. Toutefois, une étude rhéologique des modules  $G'$  et  $G''$  devrait permettre de mieux comprendre le système.

On peut alors s’intéresser aux conditions utilisées pour la formation du PEC, en par-

### 2.3. FORMATION DU COMPLEXE POLYÉLECTROLYTE AVANT SA MISE EN FORME

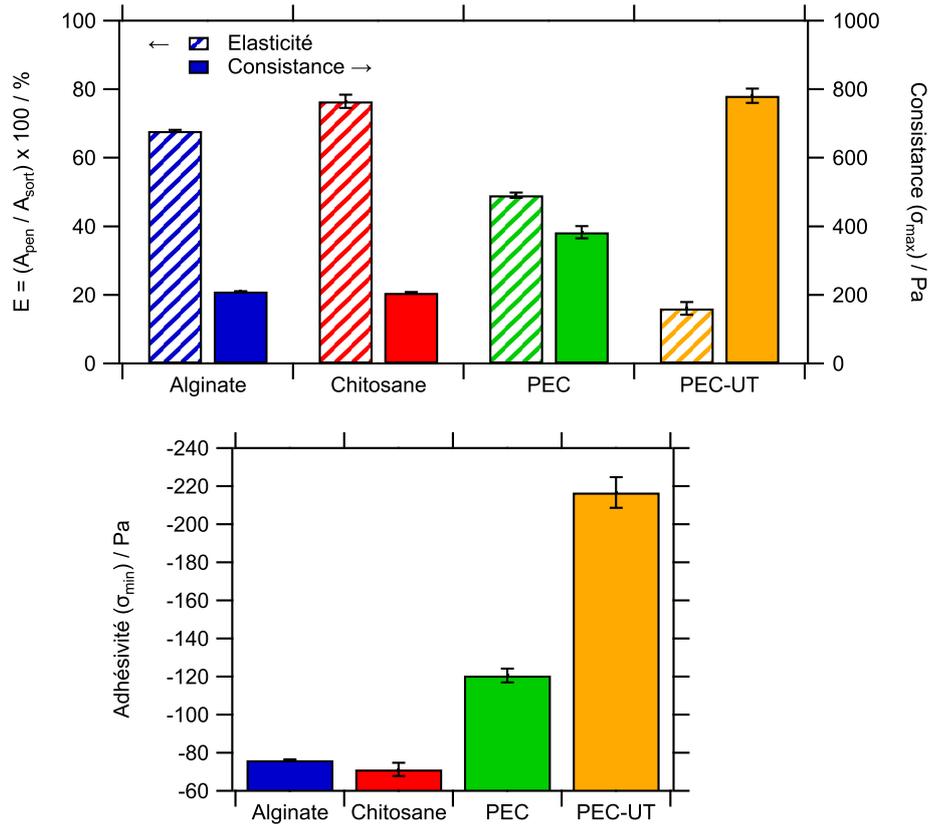


FIGURE 2.12 – En haut, la plasticité (rayures) et consistance (plein) de gels de chitosane, d'alginate et de PECs d'alginate/chitosane avant (PEC) et après passage à l'Ultra-Turrax (PEC-UT). En bas, l'adhésivité de ces mêmes gels.

ticulier le ratio utilisé. Il est suspecté que les PEC d'alginate/chitosane, dans le cas où un excès d'alginate est utilisé, ne forment pas nécessairement des structures interconnectées, mais plutôt des structures cœur/coquille ou pelotes, selon les molarités utilisées (figure 2.13) [29]. Dans notre cas, avec un rapport massique alginate/chitosane de 63/37, nous pouvons déterminer, pour 100g :

$$\text{Moles de COO}^- (\text{alginate}) \quad n_{\text{COO}^-} = \frac{m_{\text{alg}}}{M_{0,\text{alg}}} \quad (2.16)$$

Or, on sait que la masse d'une unité monomérique d'alginate de sodium (R-COO<sup>-</sup>, Na<sup>+</sup>) M<sub>0,alg</sub> est de 198 g/mol, ainsi :

$$n_{\text{COO}^-} = \frac{63}{198}$$

$$n_{\text{COO}^-} = 318 \text{ mmol}$$

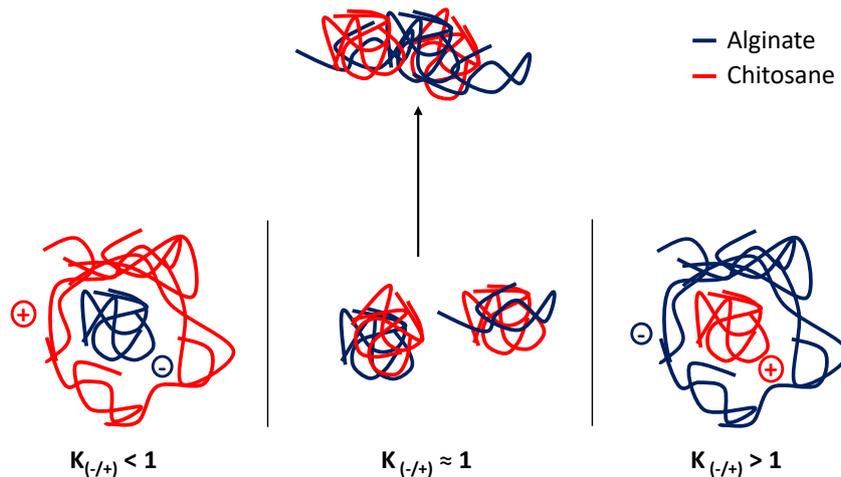


FIGURE 2.13 – Structure d'un PEC en cœur/coquille ou pelote en fonction du ratio de charge net  $K_{(-/+)}$ . Redessiné à partir de la Ref [29].

De même, pour le chitosane :

$$\text{Moles de NH}_3^+ \text{ (chitosane)} \quad n_{\text{NH}_3^+} = \frac{m_{\text{chi}}}{M_{0,\text{chi}}} \quad (2.17)$$

Il convient cependant de prendre en compte le degré d'acétylation ainsi que le taux d'humidité du chitosane, la formule devient alors :

$$n_{\text{NH}_3^+} = \frac{m_{\text{chi}}(1 - \text{DA})(1 - \%_{\text{H}_2\text{O}})}{M_{0,\text{chi}}} \quad (2.18)$$

Avec  $\text{DA} = 23 \%$ ,  $\%_{\text{H}_2\text{O}}$  considéré à  $10 \%$  et  $M_{0,\text{chi}}$  la masse moyenne pondérée entre unités acétylées ( $23 \%$ ,  $M=203 \text{ g/mol}$ ) et déacétylées ( $77 \%$ ,  $M=161 \text{ g/mol}$ ) de  $170,7$ , on obtient :

$$n_{\text{NH}_3^+} = \frac{37 \times (1 - 0,23)(1 - 0,10)}{170,7}$$

$$n_{\text{NH}_3^+} = 150 \text{ mmol}$$

Il a été montré dans la littérature que si les fractions G et GM de l'alginate étaient plus aptes à interagir avec les cations  $\text{Ca}_2^+$ , le rapport M/G du polymère n'influe pas sur les interactions qu'il entretient avec le chitosane [17]. Ainsi, le ratio de charge net  $K_{(-/+)}$  peut directement être calculé tel que :

$$K_{(-/+)} = n_{\text{COO}^-} / n_{\text{NH}_3^+} = \frac{318}{150}$$

$$K_{(-/+)} = 2,12 > 1$$

Avec  $K_{(-/+)} > 1$ , il apparaît que l'alginate est en excès. Un cœur de chitosane entouré

d'une coquille d'alginate peut alors être attendu (figure 2.13) [29]. Le calcul considère toutefois que le chitosane est totalement protoné sous forme  $\text{NH}_3^+$ . Cette hypothèse n'est pourtant pas si évidente, bien que les conditions d'élaboration soient optimisées pour (pH final du mélange autour de 5,5, avec  $\text{pKa}_{alg} \approx 4^1$  et  $\text{pKa}_{chi} = 6,5$ ) [26]. De plus, les auteurs de ce modèle montre que les tailles d'alginate et de chitosane ne semble pas influencer l'organisation des PECs. Dans le cas présent, la différence de Mw des deux biopolymères est cependant importante et l'on pourrait s'interroger sur son impact sur le réseau formé. Quoiqu'il en soit, lors d'études précédentes, le point d'équivalence indiquant la fin de formation du PEC, estimé par conductimétrie à  $m_{chi}/m_{alg} = 0,63$ , était bien en deçà de l'équivalence stœchiométrique calculée à 1,25, ce qui est révélateur de la non-disponibilité d'une partie des fonctions  $\text{R-COO}^-$  de l'alginate [31]. En définitive, la déviation du ratio de charges nettes calculé doit cependant rester minime et il paraît cohérent de considérer  $K_{(-/+)} > 1$ . L'alginate, en excès, est donc, à priori, à l'extérieur du complexe et disponible pour être réticulé par du calcium.

La figure 2.14 présente la cinétique de réticulation de PECs d'alginate et de chitosane après passage à l'UT. Après mélange, les gels sont réticulés en les recouvrant d'une solution de  $\text{CaCl}_2$  à 1 % (m/v). A différents temps, les PECs ont subi une compression (2,5 mm) et la contrainte maximale nécessaire à l'écrasement a été mesurée.

A  $t = 0$ , les PECs sont sous formes gels et la contrainte de compression est ainsi relativement faible (150 Pa). La contrainte augmente cependant rapidement au cours du temps pour atteindre 100 kPa dès 180 minutes (3 H) de réticulation. Visuellement, les gels se solidifient en effet rapidement sous l'action du chlorure de calcium. Au bout de 180 min, la contrainte mesurée commence à se stabiliser et est de 140 kPa après environ 24 H (1 110 min) et de 160 kPa après 48 H (2 880 min). Après 48 H, il semblerait que la réticulation ne soit pas totalement finie et l'on pourrait s'attendre à une légèrement augmentation de

1. pKa allant de 3,4 à 4,5 en fonction des caractéristiques du polymère [30]

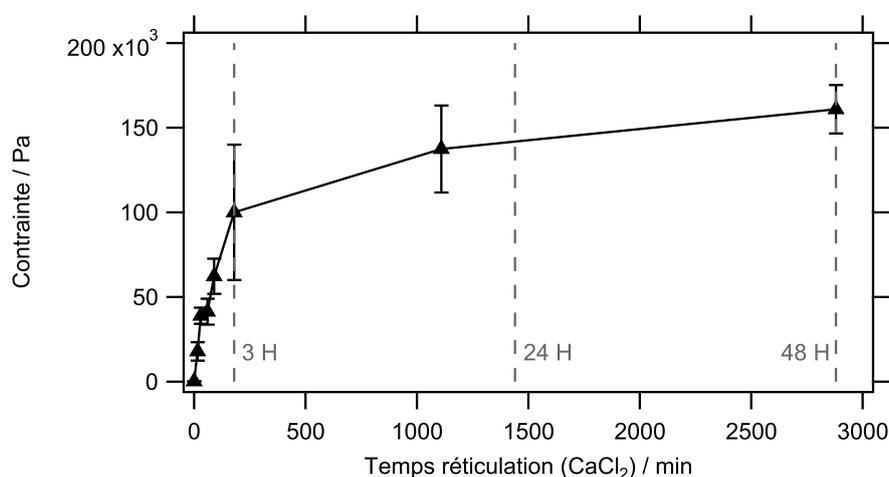


FIGURE 2.14 – Contrainte de compression de PECs (PEC-UT) en fonction du temps de réticulation par une solution de  $\text{CaCl}_2$  à 1 % m/v.

la contrainte au cours du temps. Il se peut que la rapide augmentation de la contrainte observée dans les premiers instants de la réticulation corresponde à la formation d'interactions entre le calcium et l'alginate en excès, accessible comme l'a montré le calcul des charges net ( $K_{(-/+)} > 1$ , figure 2.13). Dans un deuxième temps, le calcium pourrait se substituer au chitosane selon un processus plus lent. L'impact de l'inclusion des ions  $\text{Ca}_2^+$  sur les interactions alginates/chitosane est un point intéressant mais sera abordé plus loin dans ce manuscrit (section 2.5.2). Il est toutefois raisonnable de supposer dans un premier temps que le calcium interagit avec l'alginate en excès. On notera au passage que la réalisation de PECs présentant un excès de chitosane ne donne pas lieu à une réticulation en présence de  $\text{CaCl}_2$ , ce qui tend à valider le modèle présenté figure 2.13.

Le processus de réticulation semble être principalement actif durant les 3 premières heures. Lors de la réalisation de films, contrairement au cas présenté ici, les PECs sont séchés avant d'être réticulés. La réticulation s'effectue donc sur des matériaux plus compacts et capables de gonfler en 20 min : la diffusion des calciums est donc probablement plus rapide au sein du matériau. La formation des PECs et leur réticulation ne constituent néanmoins que la première étape dans le processus d'élaboration de la matrice absorbante. A partir des gels obtenus, les procédés utilisés pour le séchage vont définir les caractéristiques structurelles des matériaux finaux. Le temps de 3 H sera toutefois conservé pour ces études de structuration, puisque le séchage avant réticulation n'est que partiel.

## 2.4 Mise en forme des films : influence du séchage sur les propriétés physico-chimiques de la matrice absorbante

Outre leur composition chimique, la structuration des matériaux est un facteur non négligeable pour les propriétés d'un matériau. Ce projet porte en effet sur l'élaboration d'un pansement chirurgicale avec, en tant que matrice absorbante, un PEC d'alginate et de chitosane. La structuration des matrices absorbantes peut cependant avoir une influence sur les caractéristiques des matériaux obtenus. Entre autres, on peut supposer que l'introduction d'une porosité importante augmenterait les capacités absorbantes de la matrice tout en réduisant les propriétés mécaniques et la résistance enzymatique.

Dans la littérature, les études portant sur les PECs à base d'alginate et de chitosane sont généralement centrées sur la composition du PEC (ratio alginate/chitosane), le DA du chitosane, le rapport M/G ou encore la répartition des unités M et G de l'alginate [32]. La technique de séchage des matériaux reste toutefois peu étudiée. Quelques études existent, mais ces dernières se concentrent sur le séchage par *CO<sub>2</sub> supercritique* (SCC) [33, 34]. Il est pourtant connu que pour de l'alginate [35, 36] ou du chitosane [37, 38] isolé, et plus généralement sur les polymères, la méthode de séchage détermine la structure du matériau obtenu. Il semble donc tout à fait légitime de s'interroger sur l'impact du procédé de séchage sur la structuration des PECs et les propriétés physico-chimiques

qui en découlent. Entre autres, l'impact de la structure sur les capacités de gonflement, que l'on souhaite élevée, est un point clef lors de l'élaboration de pansements. Le comportement en milieu pancréatique simulé ainsi que la cinétique de libération de principe actif sont aussi des facteurs déterminants pour le développement de pansements chirurgicaux. Le séchage par évaporation, la lyophilisation et le séchage par *CO<sub>2</sub> supercritique* (SCC) sont des techniques classiques de laboratoire qui conduisent à des structurations de matériaux très différentes. Tout en gardant les premières étapes de l'élaboration des PECs, l'influence du séchage lors de la dernière étape a donc été étudiée dans cette section.

### 2.4.1 Etude des propriétés structurelles

Les trois types de séchages ont été réalisés sur des hydrogels d'alginate/chitosane. Le ratio alginate/chitosane a été optimisé dans une précédente étude et fixé à 63/37 (m/m) [28]. Après formation du PEC, les mélanges sont séchés partiellement à l'étuve (50 °C). Cette étape facilite l'obtention de films. Elle est suivie par une réticulation à base de CaCl<sub>2</sub> (1 % m/v, 3 H). Comme nous l'avons vu dans la section précédente, la réticulation des chaînes d'alginate, en excès par rapport au chitosane, permet la cohésion et la solidification de l'hydrogel.

Une fois réticulés, les hydrogels sont alors séchés totalement selon les trois méthodes de séchages prévus, à savoir séchage par évaporation, lyophilisation ou SCC. Ces trois techniques impliquent des degrés de complexités divers dans la réalisation, la plus aisée étant bien entendu le séchage par évaporation. Les conditions sont résumées tableau 2.3. On obtient trois matériaux à l'aspect différent (figure 2.15). Les échantillons séchés par évaporation (Xero) sont semi-transparents tandis que ceux lyophilisés (Lyoph) conduisent à une mousse opaque relativement épaisse. Les échantillons séchés en milieu CO<sub>2</sub> (SCC-Mat) sont quant à eux macroscopiquement intermédiaires, c'est à dire fins et opaques. Ces observations laissent supposer des structures internes différentes.

La figure 2.16 montre les micrographies MEB obtenues sur la section transversale des trois types de matériaux. En contrepartie de sa simplicité, le séchage par évaporation élimine toute porosité lors du séchage, du fait des tensions à l'interface air/liquide

TABLEAU 2.3 – Conditions utilisées pour le séchage des PECs. Avant séchage, les PECs sont réticulés au CaCl<sub>2</sub>, 1% m/v, 3 H.

Echantillon	Technique de séchage	Pression (bar)	Température (°C)
Xéro	Evaporation	Pression atmosphérique	50
Lyoph	Lyophilisation	4.10 <sup>-7</sup>	N <sub>2</sub> liquide
SCC-Mat	SCC	100	45



FIGURE 2.15 – Les trois différents matériaux obtenus : (gauche) Xéro séché par évaporation, (milieu) Lyoph séché par lyophilisation et (droite) un SCC-Mat passé au sécheur supercritique SCC.

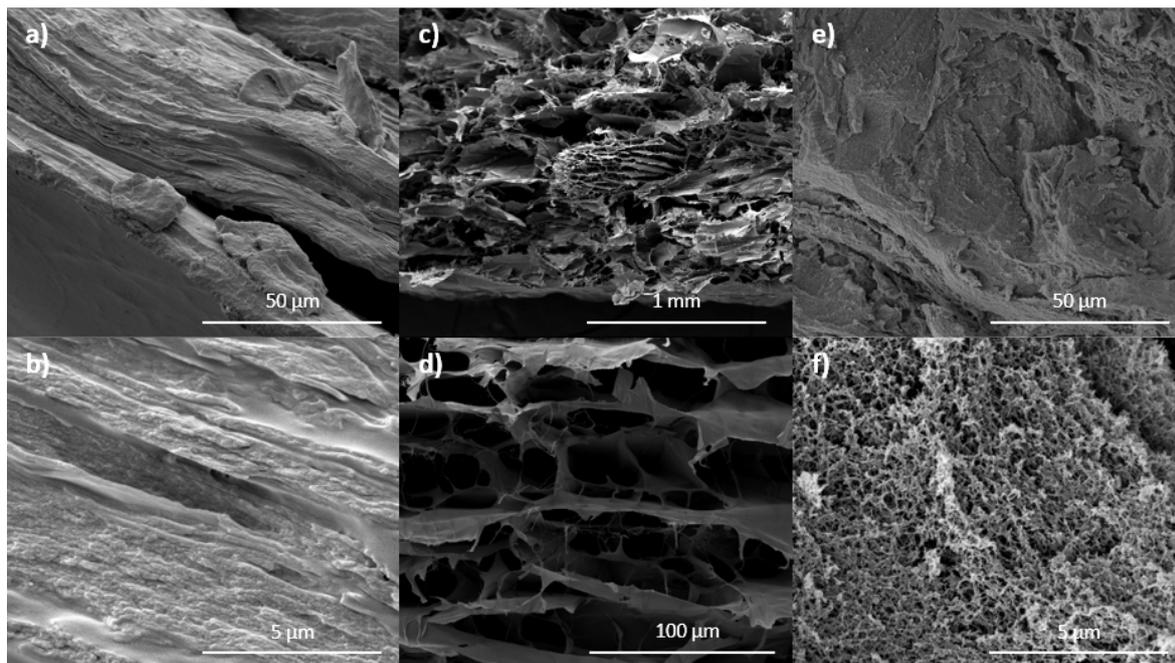


FIGURE 2.16 – Images MEB des sections transversales du (a et b) xérogel, (c et d) lyophilisat et (e et f) SCC-Mat. Des structures de différents types sont obtenues, avec des échelles de structuration différentes.

qui provoque l'écrasement des chaînes polymériques entre-elles pour former un xérogel dense. Néanmoins, on observe une organisation interne du matériau avec une orientation lamellaire. Cette organisation peut être raisonnablement expliquée par l'évaporation «couche par couche» de l'eau durant le procédé de séchage. A contrario, les deux autres séchages permettent d'obtenir des matériaux macroporeux avec des structures d'échelles différentes.

On remarque ainsi un réseau de feuillets en trois dimensions pour les Lyoph. Le procédé de lyophilisation implique en effet la solidification de l'eau contenue dans l'hydrogel. La glace étant un état expansé de l'eau, des cavités se forment à l'intérieur du matériau. L'azote liquide (-196 °C) a ici été utilisé. En solution, ce type de congélation est rapide et passe par la formation de petits cristaux de glace suivis d'une croissance directionnelle [39]. Dans notre cas, l'eau est piégée dans les PECs. Les cristaux de glace croissent alors rapidement ce qui empêche la réorganisation des polymères. De larges cristaux d'eau se forment alors à l'intérieur du matériau et, lors de la sublimation, l'eau solidifiée laisse

## 2.4. MISE EN FORME DES FILMS : INFLUENCE DU SÉCHAGE SUR LES PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES DE LA MATRICE ABSORBANTE

place à de larges pores. L'état gelé des PECs empêche la solvataion des polymères et rigidifie la structure, ce qui empêche son effondrement. Il en résulte une structure en feuillets avec des pores interconnectés, comme il a déjà été observé dans la littérature pour des hydrogels d'alginate [1, 40] ou de chitosane [1, 37]. Aussi, on peut remarquer la formation d'une «croûte» à la surface du *bulk* (figure 2.16, c). Cette «croûte» se forme généralement à l'interface matériaux/air à cause des tensions de surface générées par l'évaporation de l'eau à la surface et est couramment observée pour ce type de séchage [35]. Le séchage par SCC est une alternative à la lyophilisation qui permet d'obtenir un matériau poreux sans avoir à congeler le matériau. De plus, le séchage par SCC est censé conserver au mieux la structure de l'hydrogel. En contrepartie, il est nécessaire de remplacer l'eau par de l'éthanol (on forme ainsi un alcogel). Les interactions PEC/éthanol n'étant pas favorables, une légère rétractation est observée, avec, probablement, un léger changement morphologique [41]. L'éthanol est miscible avec le CO<sub>2</sub> et peut donc être remplacé par des cycles d'injection/expulsion succesifs de dioxyde de carbone. Une fois fait, le CO<sub>2</sub> est alors porté au-delà de son point critique (qui se situe autour de 31 °C, 74 bar, figure 2.17), dans notre cas à 45 °C, 100 bar. Les propriétés d'un fluide supercritique sont complexes et sous continuelles investigations notamment en vertu des nombreuses applications potentielles (principalement en termes de solvant «vert» pour l'extraction ou la synthèse chimique). On peut néanmoins simplement les considérer comme particulières en ceci que, dans cet état, le CO<sub>2</sub> se comporte comme un gaz (faible viscosité), avec des propriétés diffusives intermédiaires entre liquide et gaz [42]. Quoi qu'il en soit, ces propriétés particulières permettent d'éviter les phénomènes d'écrasement dus aux tensions de surface

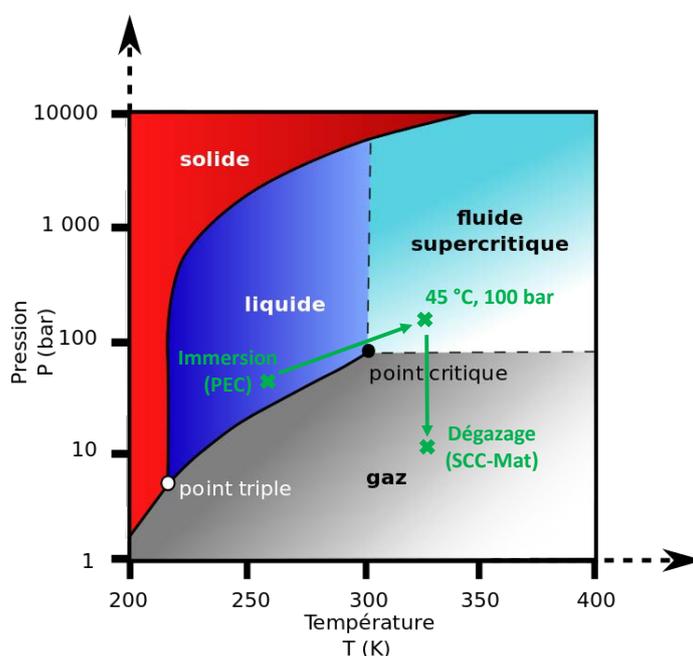


FIGURE 2.17 – Diagramme de phase pression/température du CO<sub>2</sub>. Le passage par un état supercritique permet d'éviter des transitions de phases impliquant l'écrasement de la structure du gel.

en éliminant l'interface liquide/gaz et ainsi de sécher les matrices sans dénaturer leurs structures [43, 44]. Avec des matrices PEC alginate/chitosane, il en résulte des matériaux nanofibreux, probablement proches de la structure de l'hydrogel, comme visible sur la figure 2.16.

Ces observations corrélient les densités apparentes mesurées : 860, 40 et 220 mg.cm<sup>-3</sup> pour Xero, Lyoph et SCC-Mat, respectivement (tableau 2.4). Ses densités sont ainsi reliées à l'état collaspé ou expansé obtenue lors du séchage. La plus faible densité obtenue pour les lyophilisats étant le résultat de l'expansion de l'eau lors de sa solidification, suivis d'une sublimation limitant l'effondrement de la structure.

TABLEAU 2.4 – Propriétés structurelles des matériaux.

Echantillon	Densité apparente (mg/cm <sup>3</sup> )	Surface spécifique <sup>1</sup> (m <sup>2</sup> /g)	C-BET <sup>2</sup>	ΔE <sup>3</sup> (kJ/mol)
<b>Xéro</b>	821 ± 80	-	-	-
<b>Lyoph</b>	37 ± 2	160	160,8	3,3
<b>SCC-Mat</b>	175 ± 31	220	206,6	3,4

<sup>1</sup> déterminée par la méthode BET;

<sup>2</sup> constante BET, calculée via l'équation 2.19;

<sup>3</sup> énergie molaire nette d'adsorption, calculée via l'équation 2.20

Les isothermes d'adsorption d'azote obtenues pour les lyophilisats et les SCC-Mat sont présentés figure 2.18. Les Xero présentant des surfaces spécifiques inférieures à la limite de détection de l'appareil. Leurs isothermes ne sont donc pas présentés, mais confirment l'absence de porosité significative. Les isothermes obtenues pour Lyoph et SCC-Mat sont caractéristiques des structures à base de polysaccharides [41]. L'étude de la sorption d'azote n'est pas adaptée pour les pores larges et les informations recueillies concernent les pores inférieurs à 100 nm. Dans tous les cas, les Lyoph et les SCC-Mat montrent tous les deux des isothermes de type IV (figure 2.18, a et 2.18, b), caractéristique de matériaux méo-sporeux ( $2 \text{ nm} < D_{pores} < 50 \text{ nm}$ ). Ce type d'isotherme s'explique par la formation d'une monocouche à basse pression, ce qui signifie une légère augmentation d'adsorbat, suivie par la formation de multicouches ce qui se caractérise par une importante augmentation de la quantité de N<sub>2</sub> adsorbée. Une hystérésis de type H3 est aussi à remarquer. Ce type d'hystérésis est typique des matériaux présentant des pores en forme de fente [45, 46]. Des quantités d'adsorbat supérieures sont observées pour les échantillons types SCC-Mat, et il a alors été calculé des surfaces spécifiques de 160 et 220 m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup> pour les lyophilisats et SCC-Mat, respectivement (tableau 2.4).

La courbe cumulative des tailles de pore indique un volume poreux total pour les SCC-Mat à peu près deux fois plus grands que celui des lyophilisats (figure 2.18, c). Ce résultat peut surprendre si l'on considère la densité apparente supérieure pour les SCC-Mat, mais le cumul de la taille des pores mesurée par adsorption/désorption ne prend pas en

## 2.4. MISE EN FORME DES FILMS : INFLUENCE DU SÉCHAGE SUR LES PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES DE LA MATRICE ABSORBANTE

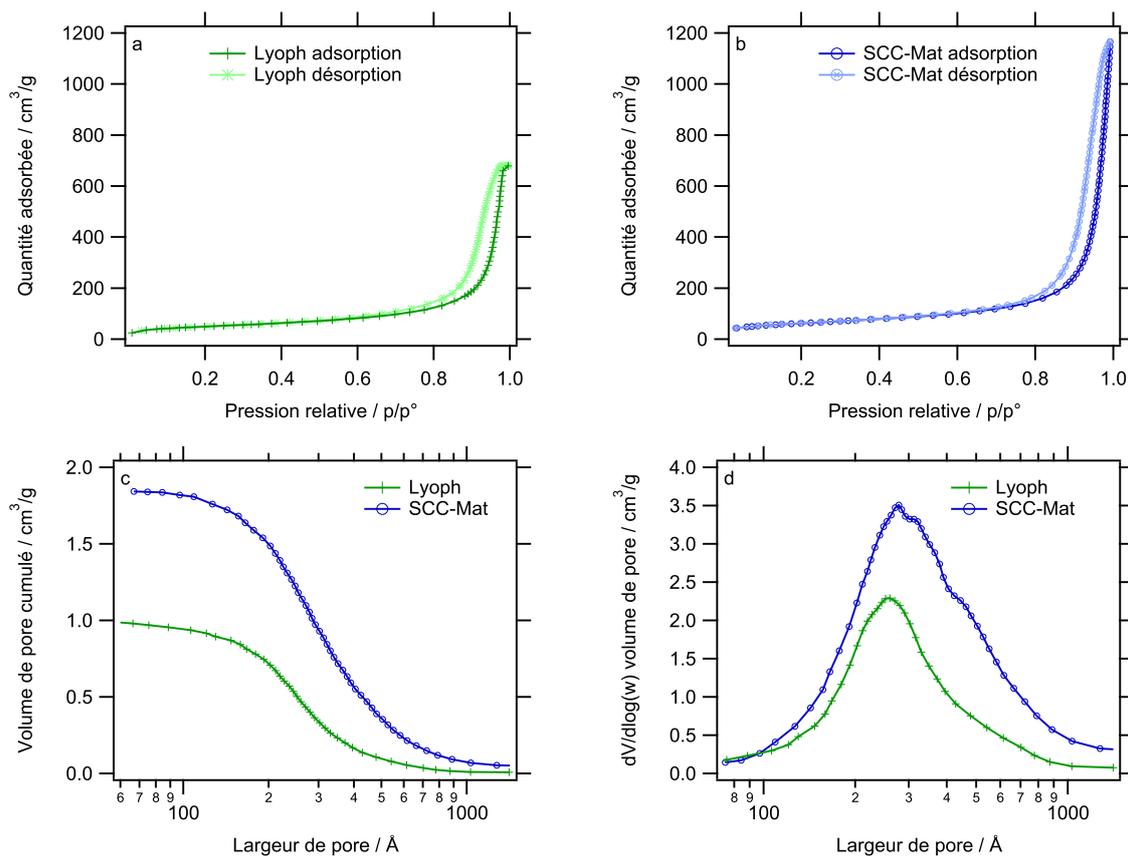


FIGURE 2.18 – Isothermes d’adsorption et de désorption des (en haut à gauche) Lyoph et (en haut à droite) SCC-Mat. (En bas à gauche) courbes cumulatives du volume des pores et (en bas à droite) courbes  $dV/d \log w$ .

compte la macroporosité supérieure à 100 nm du matériau ce qui conduit à une sous-évaluation conséquente de la valeur obtenue. Pour les Lyoph, qui possèdent des structures macroscopiques, les mesures obtenues doivent être considérées avec précaution. Quoi qu’il en soit, le tracé des tailles de pores cumulées montre la plus grande mésoporosité des SCC-Mat. La distribution confirme que, additionnellement aux macropores, les deux types d’échantillons présentent une mésoporosité (figure 2.18, c). En effet, on observe des pores allant de 10 nm à 100 nm en diamètre. En termes de nombre, la majeure partie des pores se situent autour de 25 nm quelque soit la méthode de séchage, mais la taille moyenne est respectivement de 28 contre 35 nm pour les lyophilisats et les SCC-Mat. En outre, la distribution des tailles de pores est plus étroite dans le cas des Lyoph. Ce résultat est consistant avec le procédé de séchage : la formation de cristaux est un processus homogène qui conduit à la formation de pores similaires dans le matériau. On voit ainsi que la porosité, à la fois macroscopique (observée par MEB et adsorption d’azote) et nanométrique (adsorption d’azote), peut être contrôlée par le séchage.

La méthode *Brunauer, Emmett et Teller* (BET) permet d’obtenir un supplément d’informations sur les propriétés de surface. Le tracé BET (figure 2.19) permet de déterminer la constante  $C_{BET}$ , une constante BET reliée à la force d’interaction entre l’adsorbat ( $N_2$ ) et la surface, via la formule :

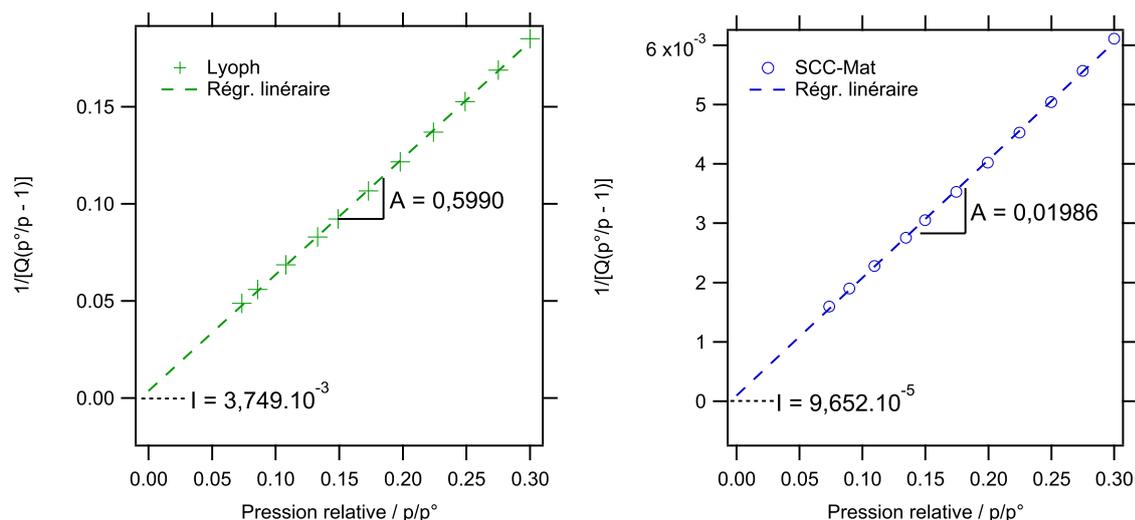


FIGURE 2.19 – Tracés BET permettant la détermination de la constante  $C_{BET}$  à partir de l'équation 2.19. «Q» représente la quantité d'azote adsorbée.

$$C_{BET} = 1 + \frac{A}{I} \quad (2.19)$$

$C_{BET}$  permet ensuite de remonter à l'énergie d'adsorption nette, définie par la relation  $\Delta E = E_{ads} - E_L$ , où  $E_{ads}$  est l'énergie d'adsorption et  $E_L$  l'énergie de liquéfaction (5,6 kJ/mol pour  $N_2$ ), qui peut être calculée via l'équation :

$$\Delta E = RT \ln C_{BET} \quad (2.20)$$

$\Delta E$  représente alors la différence entre l'énergie d'interaction entre la surface et les molécules d'azote impliquées lors de la formation de la première couche d'adsorbat  $E_{ads}$  et l'énergie de liquéfaction  $E_L$  impliquée lors de la formation des couches suivantes et est caractéristique de la surface [41, 47]. Il a ainsi été calculé  $\Delta E = 3,3 \text{ kJ.mol}^{-1}$  pour les lyophilisats ( $C_{BET} = 160,8$ ) et  $3,4 \text{ kJ.mol}^{-1}$  pour les SCC-Mat ( $C_{BET} = 206,6$ ) (tableau 2.4). Ces valeurs donnent une estimation de l'affinité entre le gaz et le solide. Un  $\Delta E$  élevé indique une interaction forte entre la surface à l'adsorbat mais doit être considéré avec précaution lorsque calculé pour des matériaux présentant une mésoporosité, qui peut donner lieu des erreurs de mesure par l'excès. Ces valeurs restent cependant dans la gamme classiquement observée pour les polysaccharides et sont relativement hautes, ce qui est cohérent avec des surfaces de PEC [41]. En effet, les PECs résultent d'interactions électrostatiques, ce qui en fait des matériaux hautement polaires. Cette polarité favorise la réorganisation spécifique des molécules d'azote, elles-mêmes quadripolaires, ce qui permet la formation de couche absorbée plus dense.

Finalement, les énergies d'adsorption nette similaires obtenues pour Lyoph et SCC-Mat indiquent que l'état de surface reste le même, peu importe le procédé. A l'intérieur du PEC, les interactions entre l'alginate et le chitosane ne sont ainsi pas influencées par le procédé de séchage. Malgré cela, les structures internes (mésoporosité et macroporosité) sont

des caractéristiques qui découlent directement de l'étape de séchage. Dans la section suivante, l'influence de ces différentes structurations sur les propriétés physico-chimiques des matériaux a été évaluée.

## 2.4.2 Caractérisation des propriétés d'usage

Dans la section précédente, différentes techniques ont été utilisées pour sécher les [PECS](#). Ces différentes techniques ont conduit à l'obtention de diverses structurations. Les trois matrices résultantes, Xero, Lyoph et SCC-Mat, sont des matériaux similaires en composition, mais dont l'organisation interne diffère en termes d'échelle et d'interconnexion. Xero présente en effet les caractéristiques d'un matériau dense tandis que Lyoph et SCC-Mat sont des matériaux poreux respectivement sous forme de feuillet et de réseau fibreux. La caractérisation des propriétés physico-chimiques de ces structures doivent permettre de déterminer quel type de procédé est le plus à même d'élaborer une matrice absorbante aux propriétés optimales pour l'application pansement.

### 2.4.2.1 Propriétés mécaniques

Les différences de structures observées pour Xero, Lyoph et SCC-Mat peuvent raisonnablement apporter des caractéristiques mécaniques différentes pour chacun des matériaux. Les propriétés viscoélastiques permettent de mieux comprendre le comportement d'un matériau soumis à des contraintes de déformations, tel que lors de l'utilisation d'un pansement chirurgical.

La *analyse mécanique dynamique* (AMD) permet de remonter aux propriétés viscoélastiques des matériaux par le biais des valeurs de modules de conservation ( $E'$ ), de perte ( $E''$ ) et du facteur d'amortissement  $\tan \delta$ , tel que :

$$\tan \delta = \frac{E''}{E'} \quad (2.21)$$

Plus précisément, l'AMD en flexion 3 points consiste à faire fléchir un matériau en oscillation.  $E'$  représente alors la capacité du système à absorber et rendre l'énergie de manière élastique, tandis que  $E''$  mesure la perte d'énergie, c'est-à-dire le comportement inélastique de la déformation qui rend compte de la composante visqueuse du matériau. Le ratio  $\tan \delta$  est donc un indicateur du caractère viscoélastique prévalent, à savoir élastique ou visqueux. Les résultats obtenus à 37°C pour Lyoph et SCC-Mat sont donnés tableau 2.5. Les échantillons Xero étant trop fins, leur AMD n'a pas pu être réalisée. Concernant les autres matériaux, le module de conservation est supérieur pour SCC-Mat ( $E' = 2,7 \cdot 10^7$  Pa) comparé à Lyoph ( $E' = 5,1 \cdot 10^5$  Pa). Il en est de même pour le module de conservation avec  $E'' = 3,2 \cdot 10^6$  et  $5,3 \cdot 10^4$  Pa respectivement pour Lyoph et SCC-Mat. Les échantillons séchés au CO<sub>2</sub> montrent donc un caractère à la fois plus élastique et plus visqueux, probablement lié à une structure plus interconnectée. Dans un même temps, le facteur d'amortissement

TABLEAU 2.5 – Module de stockage ( $E'$ ), de perte ( $E''$ ) et  $\tan \delta$  de Lyoph et SCC-Mat à 37 °C.

Echantillon	$E'$ (Pa)	$E''$ (Pa)	$\tan \delta$
Lyoph	$5,1 \cdot 10^5$	$5,3 \cdot 10^4$	0,10
SCC-Mat	$2,7 \cdot 10^7$	$3,2 \cdot 10^6$	0,12

$\tan \delta$  est du même ordre de grandeur pour SCC-Mat et Lyoph, ce qui montre une organisation tridimensionnelle des chaînes polymériques similaire à l'échelle moléculaire et liée à la formation même du PEC. Cette similarité était déjà suggérée par les  $\Delta E$  proches déterminés par la méthode BET.

### 2.4.2.2 Capacités d'absorption dans différents milieux

#### a) Eau

En tant que matrice absorbante, les capacités de gonflement du matériau sont un point clef. Les propriétés de gonflement dans l'eau, en termes de masse et de volume, ont donc été étudiées (figure 2.20, masse). De précédentes études ont démontré que les capacités de gonflement sont majoritairement corrélées au caractère hydrophile de l'alginate [28]. Les résultats obtenus ici montrent que l'augmentation de la porosité augmente les capacités d'absorption des PEC. Après 24 H, les échantillons ont atteint leur maximum d'absorption. En introduisant une porosité, les capacités d'absorption sont plus que doublées dans le cas de SCC-Mat (6 000 %), comparé à Xero (2 500 %). Dans la littérature,

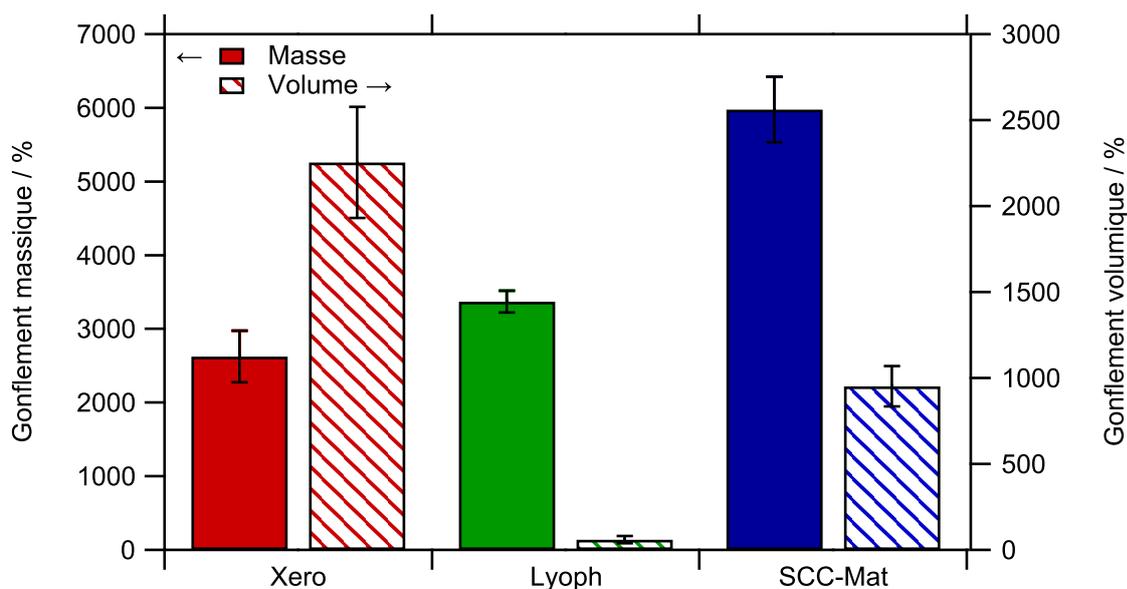


FIGURE 2.20 – Pourcentages de gonflement dans l'eau des xérogels, lyophilisats et SCC-Mat en termes de (gauche) masse et (droite) volume après 24 H.

des gonflements inférieurs (1 600 %, dans tampon TRIS pH 7,4) ont été obtenus pour des matrices d'alginate séchées par CO<sub>2</sub> supercritique [36]. Les lyophilisats montrent ici une absorption intermédiaire de l'ordre de 4 000 %. Des résultats similaires ont été obtenus pour du carboxyméthyl-chitosane lyophilisé (dans tampon phosphate, pH 7,4) [48]. On peut aussi mentionner des éponges de chitosane présentant des absorptions limitées à 2 000 % (dans 2 % agar/eau) [37]. Ces résultats montrent donc des capacités d'absorption intéressantes pour les PECs ici développés, en particulier pour les échantillons obtenus par SCC (SCC-Mat).

En outre, les xérogels tendent à augmenter significativement leur volume lors du gonflement (jusqu'à 2 300 %, figure 2.20, volume). En effet, leur état dense permet une extension de leur structure alors que dans un autre temps les aérogels, en particulier les lyophilisats, restent stables, leurs structures étant déjà expansées. La plus grande élasticité de SCC-Mat, mesurée par AMD, permet une déformation modérée de la structure.

### b) Influence des ions et du pH

Si l'on considère la nature électrostatique des PECs, il convient cependant de tenir compte de l'environnement extérieur sur les propriétés de gonflement. Pour ce faire, trois solutions tampons (pH 7,4) ont été utilisées : PBS, TRIS/NaOH et TRIS<sup>2</sup> (figure 2.21). La différence entre TRIS/NaOH et TRIS réside dans la base utilisée : TRIS/NaOH est ajusté à l'aide de soude tandis que TRIS est ajusté avec la forme basique du composé TRIS, ce dernier ne contient donc pas d'ions sodium ou hydroxyles. Les caractéristiques de milieu sont résumées tableau 2.6. Quoi qu'il en soit, la présence de PBS dans le milieu diminue fortement le taux de gonflement après 24 H de Xero et SCC-Mat tandis que l'influence

2. tris(hydroxyméthyl)aminométhane

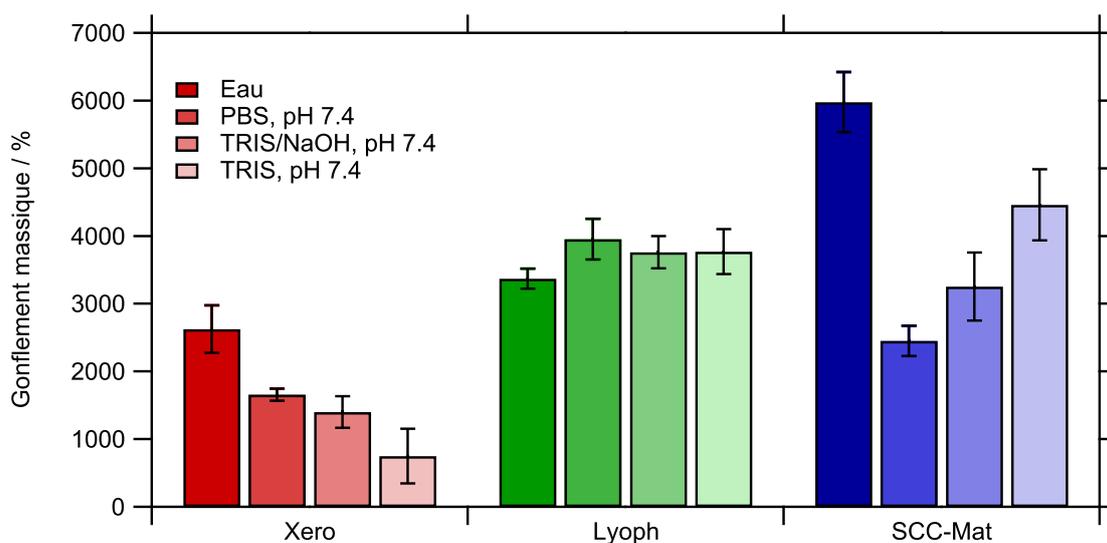


FIGURE 2.21 – Influence du médium sur les taux de gonflement.

TABEAU 2.6 – Les différents milieux de gonflement utilisés : pH et concentration en ions Na<sup>+</sup>.

Milieu	pH	[Na <sup>+</sup> ] <sup>1</sup> (mM)
Eau	6,5	-
PBS <sup>2</sup>	7,4	137
TRIS/NaOH <sup>3</sup>	7,4	7
TRIS <sup>3</sup>	7,4	-

<sup>1</sup> concentration initiale dans le milieu ;

<sup>2</sup> concentration en phosphates H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>2-</sup> /HPO<sub>4</sub><sup>-</sup> : 0,01 M ;

<sup>3</sup> concentration en TRIS : 0,01 M

observée sur Lyoph n'est que peu significative.

Ainsi, les taux de gonflement de Xero et SCC-Mat sont plus importants dans l'eau que dans les tampons. En effet, l'eau distillée présente un pH, mesuré à 6,5, plus faible que les tampons et la proportion d'amines protonées NH<sub>3</sub><sup>+</sup> du chitosane (pKa = 6,5 [49, 50]) est plus faible dans ces milieux tamponnés. Cette différence de protonation est mise en évidence par l'analyse infrarouge des matériaux préalablement gonflés dans les différents milieux (figure 2.22). L'intensité de la bande NH<sub>3</sub><sup>+</sup> du chitosane (1530 cm<sup>-1</sup>) diminue dans les tampons comparé à l'eau. Cette diminution est principalement visible dans le cas du PBS et l'augmentation de la contribution des amines cationiques NH<sub>3</sub><sup>+</sup> pour les tampons TRIS/NaOH et TRIS est attribuée à la liaison de l'amine du TRIS<sup>3</sup> aux COO<sup>-</sup> de l'alginate.

En conséquence, deux hypothèses peuvent être avancées : i) la réduction de la densité de charge du chitosane (*i. e.* déprotonation) induit des interactions hydrophiles avec l'eau moins favorables et ii) cette déprotonation peut mener à la décomplexation du PEC, ce qui conduit à la solubilisation partielle de l'alginate. Dans les deux cas, il s'ensuit une diminution du taux de gonflement. Ces hypothèses ne sont cependant pas suffisantes : la différence de comportement entre PBS, TRIS/NaOH et TRIS met en exergue l'importance de la nature même du sel tampon sur les PECs. Il est alors tout à fait raisonnable d'envisager la substitution des ions Ca<sup>2+</sup> du PEC, qui réticulent l'alginate, par les cations Na<sup>+</sup> contenus dans le milieu, inaptes à la réticulation. De cette dé-réticulation s'en suivrait alors l'effondrement de la structure et/ou la solubilisation des PECs. Cet échange d'ions est subtilement visible en FTIR (figure 2.22). Si l'on s'intéresse aux bandes d'absorption des carboxylates autour de 1600 cm<sup>-1</sup>, il apparait effectivement un décalage du signal qui passe de 1596 cm<sup>-1</sup> (Ca-COO<sup>-</sup>) dans l'eau à 1603 (Na-COO<sup>-</sup>) dans le PBS [26]. Ce déplacement reste cependant léger et n'est pas observé pour les milieux TRIS/NaOH et TRIS. Une *analyse dispersive en énergie* (EDX) est donc nécessaire pour confirmer l'échange d'ions. Les résultats (tableau 2.7) montrent en effet cet échange, avec une substitution

3. Tris(hydroxyméthyl)aminométhane.

## 2.4. MISE EN FORME DES FILMS : INFLUENCE DU SÉCHAGE SUR LES PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES DE LA MATRICE ABSORBANTE

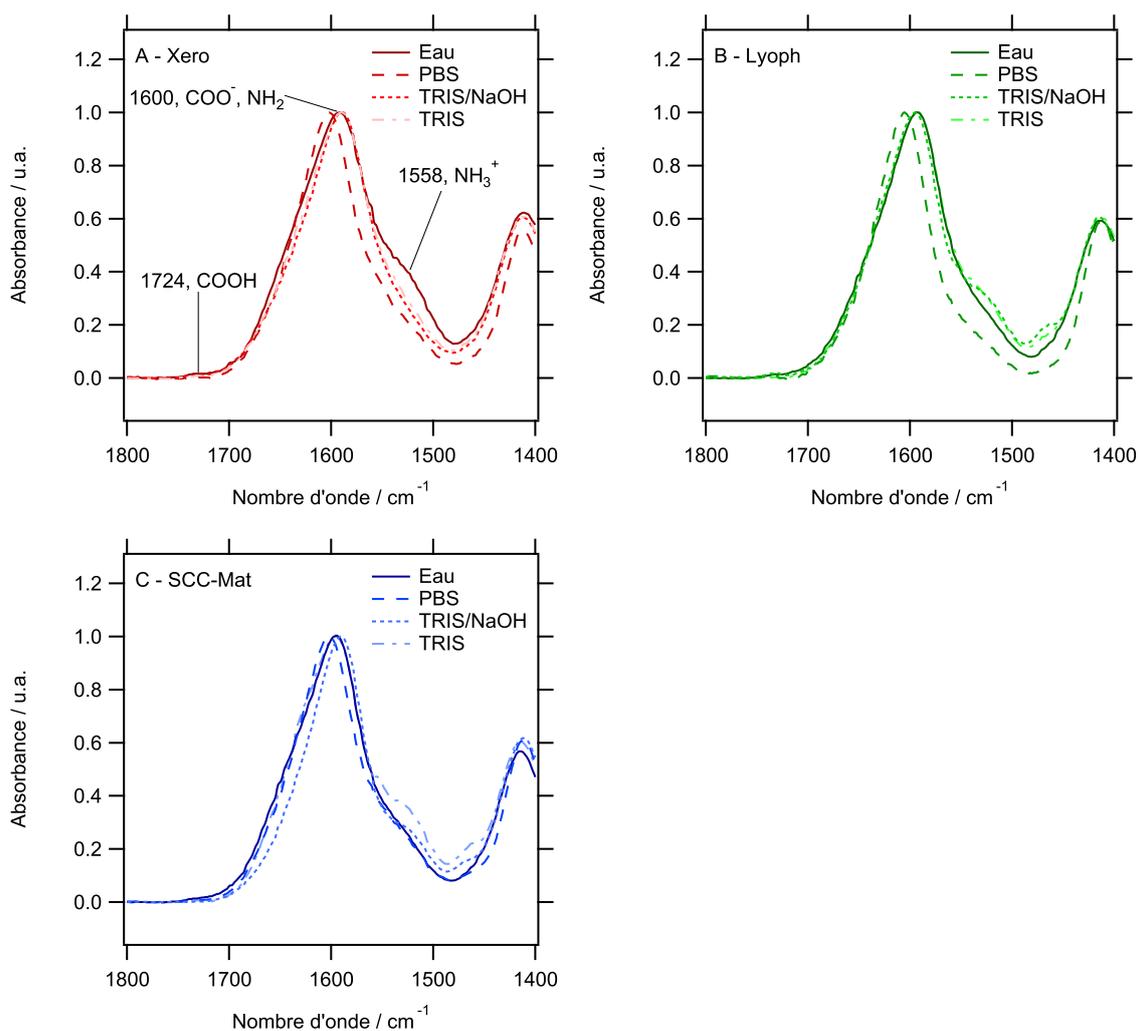


FIGURE 2.22 – Spectres ATR-FTIR de (A) Xero, (B) Lyoph et (C) SCC-Mat après différents traitements (24 H).

des calciums d'autant plus grande que la concentration en sodium dans le milieu est importante; le rapport  $[Na]/[Ca]$  augmente alors. Il est en outre à noter que la substitution est moindre dans le cas du Xero ( $[Na]/[Ca] = 4$ ) dans TRIS/NaOH, comparé aux autres matériaux ( $[Na]/[Ca] \approx 20$ ), probablement du fait de son état plus dense et donc de la disponibilité réduite des ions calcium intercalés à l'intérieur de son réseau.

De manière générale, il semble cohérent de corréliser le taux de gonflement avec le taux de substitution : un taux de substitution élevé conduit à un gonflement faible. Les xérogels semblent cependant faire exception : avec un gonflement de 1 400 % dans TRIS/NaOH, ce dernier est réduit de moitié (750 %) dans le tampon TRIS. La présence de sodium semble ainsi permettre, en substituant le calcium, de faciliter l'expansion du réseau via la formation de Na-alginate. En outre, ce phénomène permet de contrebalancer en partie l'effet négatif de l'augmentation du pH sur la capacité d'absorption du matériau. Enfin, l'indépendance de Lyoph envers son milieu extérieur résulte probablement de ses pores relativement larges, responsable de la majeure partie de l'absorption d'eau. Avec une densité plus faible, la quantité d'eau incluse dans les larges cavités de Lyoph est moins dépen-

TABLEAU 2.7 – Ratios Ca/Na mesurés par EDX à la surface de Xero, Lyoph et SCC-Mat après 24 H dans différents milieux. Le ratio [Ca]/[Na] est normalisé à 1 sur les échantillons immergés dans l'eau.

Milieu	[Na <sup>2+</sup> ] <sup>1</sup> (mM)	[Na]/[Ca] <sup>2</sup>		
		Xero	Lyoph	SCC-Mat
Eau	-	1	1	1
PBS	137	> 100	> 100	> 100
TRIS/NaOH	7	4	23	17
TRIS	-	2	2	2

<sup>1</sup> concentration initiale dans le milieu;

<sup>2</sup> rapport molaire mesuré sur l'échantillon par EDX

dante de l'état des polymères du PEC.

En définitive, le milieu extérieur est déterminant pour les capacités de gonflement exhibées par les matériaux. De plus, des phénomènes de solubilisation sont peut-être à l'œuvre en fonction du pH et des sels présents dans le milieu. Il convient alors de s'intéresser au comportement des PECs dans un milieu proche de celui de l'application visée, c'est-à-dire un milieu pancréatique simulé.

### 2.4.2.3 Comportement en milieu pancréatique simulé

Comme nous l'avons vu dans la section précédente, les propriétés des matériaux dépendent de leur milieu extérieur. En tant qu'objectif majeur, la matrice absorbante développée doit être en capacité d'absorber le jus pancréatique excrété en cas d'apparition de *fistule pancréatiques* (FPs). Le comportement des matériaux en milieu pancréatique simulé a donc été évalué. Il s'agit alors d'observer les propriétés de ces derniers en tant que potentiels pansements, dans des conditions proches de l'application. Notamment, le gonflement tout comme la résistance aux enzymes contenues dans le jus pancréatique sont des points clefs importants à mesurer. Pour ce faire, les PECs (Xero, Lyoph et SCC-Mat) ont été immergés dans un milieu contenant de la *pancréatine porcine* (PP). Le pH de la solution est fixé par l'utilisation d'un tampon phosphate. En effet, la PP est un cocktail d'enzymes digestives produit par les cellules exocrines du pancréas (voir section 1.1.2). Elle est composée, entre autres, d'amylase, de trypsine, de lipase, de ribonucléase et de protéases qui sont censées rejoindre le duodénum via le canal pancréatique pour aider aux fonctions digestives. L'activité enzymatique est dépendante du pH et chaque enzyme possède son propre pH de fonctionnement optimal. Un pH de 8 permet cependant une activité globale efficace tout en reproduisant l'environnement biologique naturel du jus pancréatique [51].

Le gonflement sur 24 H est présenté figure 2.23, gauche. Le gonflement des trois matériaux diminue significativement comparé à ceux obtenus dans la section précédente.

## 2.4. MISE EN FORME DES FILMS : INFLUENCE DU SÉCHAGE SUR LES PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES DE LA MATRICE ABSORBANTE

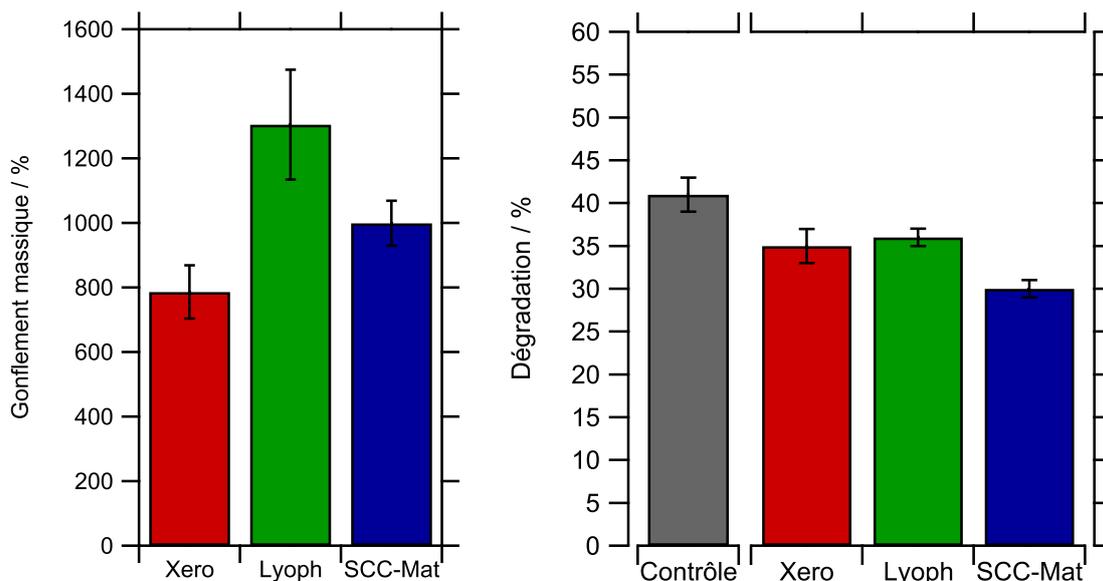


FIGURE 2.23 – (Gauche) pourcentages de gonflement sur 24 H et (droite) de dégradation après 14 jours dans un milieu pancréatique simulé ( $3,5 \text{ g.L}^{-1}$  PP dans tampon phosphate pH 8) à  $37^\circ\text{C}$ . Un contrôle a été réalisé avec un xérogel placé dans un tampon pH 8,  $37^\circ\text{C}$ , sans enzymes.

Comme il a été démontré, les ions en présence dans le milieu, notamment le sodium, ainsi qu'un pH élevé tendent à diminuer les capacités de gonflement des matrices, tout comme la possible dégradation des matériaux du fait de l'activité enzymatique. Une fois encore, Lyoph semble moins affecté par son milieu extérieur et absorbe la plus grande quantité d'eau (1 300 %) tandis que SCC-Mat (1 000 %) et Xero (790 %) présentent des taux de gonflement inférieurs.

Le contrôle de la dégradation dans un milieu pancréatique simulé après 14 jours (temps nécessaire à la cicatrisation) montre des pertes de masse de l'ordre de 35 % pour les différents échantillons, avec une perte de masse légèrement inférieure (30 %) dans le cas du SCC-Mat (figure 2.23, droite). Malgré les conditions drastiques, la perte de masse ne semble pas imputable à l'activité enzymatique, comme le fait remarquer la comparaison avec un contrôle effectué en l'absence d'enzymes (figure 2.23, droite, gris). Il s'agirait donc plutôt d'une solubilisation partielle des polysaccharides, en particulier de l'alginate, ce dernier étant hydrosoluble. En effet, il a déjà été montré que le chitosane possédait une meilleure résistance à ce milieu pancréatique que l'alginate qui, seul, se dégrade totalement au bout de 6 jours [28]. Quoi qu'il en soit, la présence d'enzymes semble même stabiliser les trois types d'échantillons testés, et les pertes de masse (inférieures ou égales à 35 %) semblent suffisantes pour assurer le maintien des propriétés du pansement pendant la période de cicatrisation. De plus, ces résultats suggèrent tout de même une dégradation suffisante au cours du temps pour éviter une seconde intervention chirurgicale, lourde, visant le retrait du dispositif. Dans le cas du SCC-Mat, une conservation légèrement supérieure est observée, ce qui peut être relié à sa structure nanométrique de plus

grande interconnexion qui facilite le maintien d'un état cohésif.

#### 2.4.2.4 Libération de principe actif

Afin de limiter les risques d'infection au niveau du moignon pancréatique, la possibilité de libérer des molécules antiseptiques serait une caractéristique intéressante pour la matrice absorbante. La possibilité à délivrer des molécules actives à partir de matrices d'alginate/chitosane est déjà démontrée. Cependant, les études s'attardent généralement sur l'influence de la composition du PEC [52, 53]. Il est donc intéressant d'observer si la simple modification de structure, à compositions égales, par le choix de la méthode de séchage impacte la libération de molécules actives. L'éosine est une molécule hydrophile qui possède des propriétés antiseptiques et asséchantes. Sous forme commerciale, elle est proposée notamment sous forme de solution diluée rougeâtre bien connue pour le traitement des petites plaies cutanées. Son intérêt en tant que modèle réside dans sa forte coloration qui rend son dosage aisé par spectroscopie visible.

L'étude cinétique de la libération d'éosine s'est réalisée en deux étapes : i) les matériaux sont immergés dans une solution d'éosine (PBS, pH 7,4) à  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$  pendant 12 H, ii) les matériaux sont placés dans une solution (PBS, pH 7,4) sans éosine pour observer la libération. La quantité d'éosine encapsulée dans les matrices est déterminée par dosage indirect et quantifiée à  $92 \pm 4 \text{ mg.g}^{-1}$ ,  $102 \pm 10 \text{ mg.g}^{-1}$  et  $80 \pm 11 \text{ mg.g}^{-1}$  pour Xero, Lyoph et SCC-Mat, respectivement. L'augmentation de la surface spécifique du matériau (Xero < Lyoph < SCC-Mat) ne semble ainsi pas corrélérer avec la quantité d'éosine incorporée (SCC-Mat < Xero < Lyoph). La faible incorporation de SCC-Mat peut s'expliquer par la présence de PBS dans le milieu qui réduit drastiquement son gonflement, comme déjà observé précédemment (figure 2.21). De plus, cet effet peut être amplifié par le procédé de séchage : initialement en contact avec l'eau, les groupements hydrophiles sont orientés vers le milieu extérieur avant le séchage. Par la suite, le passage par un alcogel peut induire une modification de la conformation superficielle des chaînes polymériques du matériau, l'éthanol étant moins polaire que l'eau en plus d'être un non-solvant pour les PECs. La réduction de l'hydrophilicité de surface qui en résulte peut expliquer la baisse d'affinité du matériau envers l'éosine. Dans un même temps, les échantillons Lyoph sont, avant mise sous vide, gelés rapidement ( $\text{N}_{2\text{liq.}}$ ). La conformation en surface est ainsi figée et les groupements hydrophiles restent externalisés.

Cette deuxième hypothèse est toutefois relativisée par les énergies nettes d'adsorption similaires mesurées par la méthode BET pour Lyoph et SCC-Mat qui n'indiquent pas de différence notable d'état de surface (tableau 2.4). Si cette énergie doit être prudemment prise en compte du fait de la mésoporosité des matériaux, la contribution de la macrostructure de Lyoph doit être ajoutée à l'équation, comme vu précédemment lors des études de gonflement (sections 2.4.2 et 2.4.2.3).

Quoi qu'il en soit, l'éosine est, peu importe le type de matériau, principalement libérée

## 2.4. MISE EN FORME DES FILMS : INFLUENCE DU SÉCHAGE SUR LES PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES DE LA MATRICE ABSORBANTE

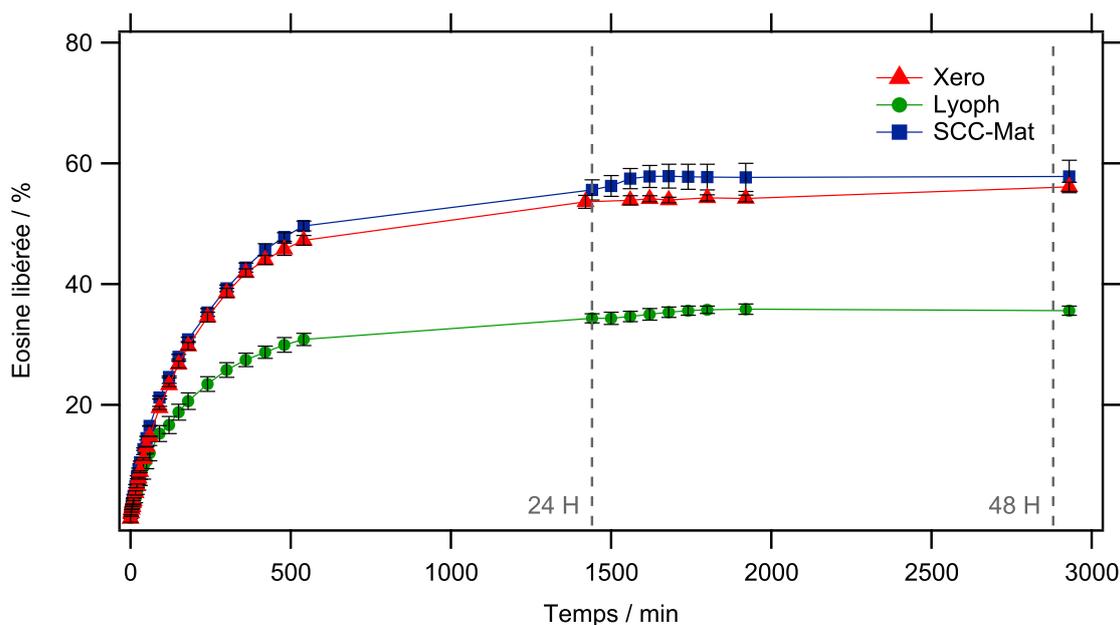


FIGURE 2.24 – Cinétiques de libération d'éosine en pourcentage d'éosine incorporée.

dans les premières 24 H (figure 2.24). Lyoph relargue cependant un pourcentage d'éosine bien inférieur aux autres matrices. Cette observation semble en accord avec la plus grande affinité de l'éosine vis-à-vis de ces échantillons comparé à SCC-Mat. Il n'y a en outre pas de différence majeure entre les profils de libération de Xero et SCC-Mat. Dans le cas de Xero, l'éosine est probablement localisée sur la partie externe du matériau du fait de sa structure plus compacte. La libération d'éosine se fait donc plus rapidement que dans le cas de Lyoph, mais reste légèrement inférieure que pour SCC-Mat.

La diffusion de l'éosine à travers le volume d'échantillon doit aussi être prise en compte. Tous les échantillons ont été taillés avec la même surface, mais les matériaux Lyoph étant plus épais, la distance entre le cœur du matériau et le milieu externe est plus importante pour ces échantillons. Il n'est donc pas anormal d'observer une réduction de la quantité de principe actif relarguée.

Afin de mieux comprendre le système, le modèle de Korsmeyer-Peppas a été appliqué aux cinétiques de libération pour les taux de libération inférieurs à 25 % (15 % pour Lyoph), ce qui correspond au domaine linéaire de la courbe log/log présentée figure 2.25 [54, 55]. Ce modèle est indiqué pour les matériaux à base de polymères et renvoie les paramètres descriptifs  $K$ , la constante de libération, et  $n$ , l'exposant de libération. La faible déviation entre la régression linéaire et les mesures expérimentales ( $R > 0,99$ ) indique que le mécanisme de libération est principalement guidé, à ces faibles pourcentages de libération, par des phénomènes de diffusion. Dans le cas de polymères poreux, deux mécanismes de diffusion peuvent être considérés : i) la diffusion du principe actif à travers l'eau contenue dans les pores et ii) la diffusion des espèces à travers le polymère lors de son gonflement [55].  $K$  incorpore la diffusion globale du soluté ainsi que les caractéristiques géométriques du système. Dans notre cas, il est à rappeler que les matrices sont déjà gon-

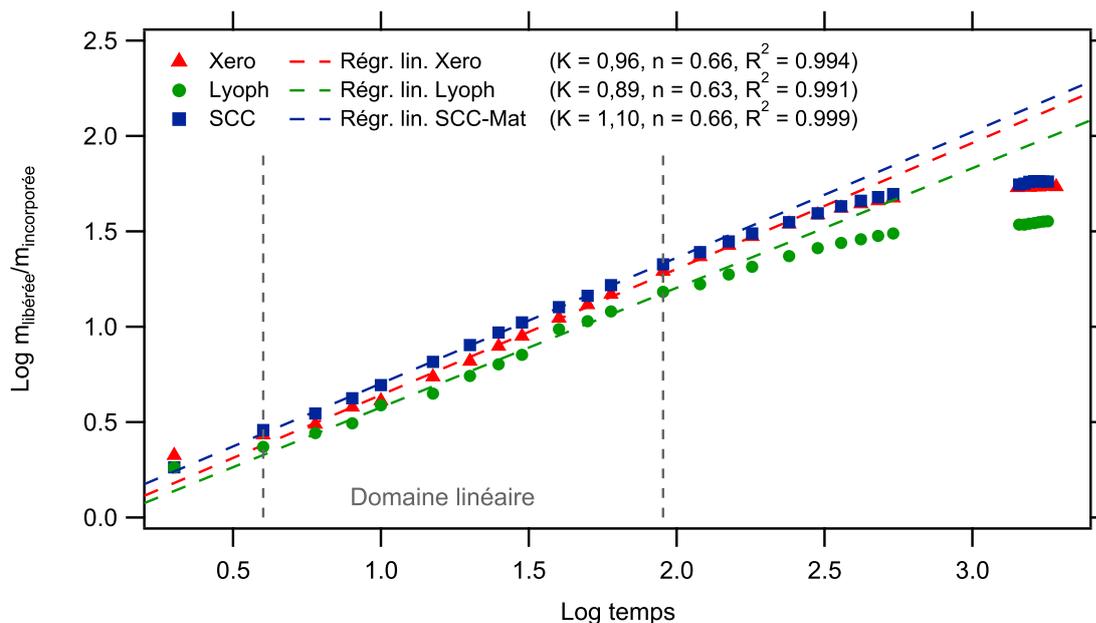


FIGURE 2.25 – Tracés logarithmiques des cinétiques de libération d'éosine (lignes pleines) et leurs régressions linéaires (lignes pointillées).

flées lors de la libération. L'application des modèles montre que le paramètre  $K$  est supérieur pour SCC-Mat, ce qui est en cohérence avec sa surface spécifique supérieure : la plus grande zone de contact interfaciale entre les polymères solvatés (PEC) et le milieu (eau) conduit à un échange d'éosine plus rapide. La diffusion est donc plus directe et la résistance à la diffusion plus faible. Le paramètre  $n$  donne quant à lui des informations sur le mécanisme de libération. Tous les types d'échantillons donnent des exposants  $n$  compris entre 0,60 et 0,70. Ces valeurs sont caractéristiques d'une diffusion non-Fickienne [54, 56]. Ce type de diffusion est révélatrice d'un système polymère/solvant/soluté et indique que les polymères ralentissent la diffusion de l'éosine. En plus de la barrière stérique, ce ralentissement peut aussi être dû aux fonctions carboxylates de l'éosine, capables d'interagir avec les amines du chitosane ( $\text{COO}^- - \text{NH}_3^+$ ). Les matériaux n'agissent donc pas seulement en tant que matrices inertes : les interactions PEC/éosine limitent la libération et près de 40 % de la quantité d'antiseptique reste incorporée dans sa matrice après 2 jours. Au-delà de cette période, il semble cependant qu'une libération très lente continue de se produire.

### 2.4.3 Choix du procédé de séchage

Dans cette section, nous avons comparé l'impact de trois différentes techniques de séchage sur les propriétés finales des PECs. Il est apparu que l'induction d'une porosité (Lyoph et SCC-Mat) permet d'augmenter la capacité de gonflement des matériaux. Le milieu extérieur reste cependant le facteur le plus impactant sur le gonflement. Quel que soit le matériau, les capacités de gonflement sont comprises entre 800 % et 1 300 %

en milieu pancréatique simulé. Il apparaît aussi que les séchages par évaporation (Xero) et CO<sub>2</sub> supercritique (SCC-Mat) conduisent à des matériaux particulièrement sensibles à leur milieu extérieur. Quoiqu'il en soit, cette gamme de gonflement reste acceptable au vu des conditions légèrement plus drastiques qu'un milieu biologique réel puisque, lors de nos études, le matériau est immergé dans de la pancréatine concentrée à 3,5 g/L quand la concentration enzymatique du jus pancréatique réel est de 2,5 g/L [57, 58]. En outre, dans le cas de fistules, le volume des fuites enzymatiques varie de 50 mL à 200 mL par jour [59]. Si l'on considère les xérogels, ceux-ci sont capables d'absorber jusqu'à 8 fois leurs poids. Les films élaborés ici ont une masse approximative de 1 g. Un xérogel pourrait donc absorber jusqu'à 8 mL de jus pancréatique. Les drains déjà classiquement utilisés continueraient à exfiltrer la majeure partie du jus pancréatique excrété, mais le biomatériau permettrait probablement, en obstruant la fistule, de réduire le volume des fuites tout en contenant son épandage dans la cavité abdominale. De plus, la perte de masse en présence d'enzymes pancréatiques montre que 30 à 35 % des PECs se dégradent après 14 jours. On peut alors raisonnablement envisager de maintenir les fonctions absorbantes du pansement pendant ce laps de temps, nécessaire à la cicatrisation, tout en garantissant sa dégradation dans le temps. Finalement, les cinétiques de libération de principe actif montrent que les lyophilisats libèrent une quantité plus limitée d'éosine sur des temps courts, tandis que Xero et SCC-Mat présentent des profils similaires.

La facilité de procédé des xérogels rend ce type de matériau attractif. En milieu pancréatique simulé, le taux de gonflement est satisfaisant et atteint environ 800 % en 24 H tandis que seulement 35 % de dégradation est observé après 14 jours. Le léger gain de gonflement obtenu en introduisant de la porosité via les autres procédés de séchage ne justifie pas leur utilisation au regard de leur complexité de mise en œuvre. La cinétique de libération des xérogels montre en outre que la majorité de la molécule active incorporée est libérée dans les premières 24 H (environ 55 %) et l'on peut supposer que l'éosine toujours présente dans le matériau continue de diffuser au fur et à mesure de la dégradation du biomatériau. De plus, la modification de surface, censée apporter les propriétés bioadhésives du pansement, sur un matériau non poreux permet de limiter le greffage fonctionnel à la surface du *bulk*. Enfin, la surface plane des xérogels rend plus aisée la caractérisation de l'état de surface. Pour ces raisons, la suite des études porteront sur les xérogels obtenus via séchage par évaporation.

## 2.5 Vers la compréhension des xérogels

Dans la section précédente, différents types de matériaux ont été développés. Parmi ces matériaux, les xérogels apparaissent comme les plus simples à élaborer et les plus propices à la fonctionnalisation de surface, tout en garantissant des propriétés d'absorption et de résistance enzymatique suffisantes pour une application de type pansement chirurgical.

Avant de s'intéresser à la modification chimique de la surface de ces matrices absorbantes, il faut poursuivre plus avant la compréhension de ce type de système. Puisqu'il s'agira de modifier l'état de surface de ces matériaux, leurs caractéristiques de surface ont été étudiées en premier lieu. Le comportement de ces matrices dans différents milieux a ensuite été investigué afin de commencer à définir les conditions optimales lors des étapes de modification de surface subséquentes.

### 2.5.1 Propriétés de surface

L'étude de l'état de surface des PECs est importante avant d'envisager toute modification de surface. En premier lieu, les films de PECs (type xérogel) étant élaborés dans des boîtes de Pétri, il est intéressant d'observer la rugosité des deux surfaces, à savoir la surface supérieure, à l'air libre, et la surface inférieure, en contact avec le verre sous-jacent (figure 2.26).

L'imagerie AFM révèle que, comme attendu, la surface supérieure présente une rugosité plus importante, avec une rugosité arithmétique Ra de 230 nm, contre seulement 20 nm pour la face inférieure (figure 2.27). On pourrait alors s'interroger sur la composition chimique des deux faces.

La spectroscopie XPS permet d'obtenir des informations sur l'extrême surface d'un matériau. Son principe sera plus amplement détaillé dans le chapitre suivant (section 3.3.2.2). On retiendra pour le moment que cette analyse consiste à irradier une surface via des rayons relativement énergétiques. Cette irradiation entraîne la photoémission d'électrons, et l'analyse de l'énergie cinétique de ces électrons émis permet de remonter à leur énergie de liaison, qui dépend directement du type d'atome émetteur. Cette technique permet donc d'obtenir la composition atomique en extrême surface (10 nm). Dans notre cas, le pourcentage d'azote peut fournir des informations quant à la composition relative de l'alginate et du chitosane en surface. En effet, le chitosane porte des atomes d'azotes tandis que l'alginate en est exempt (figure 2.28). La composition atomique des deux surfaces est résumée tableau 2.8.

Malgré l'absence d'azote sur les molécules d'alginate, les films d'alginate révèlent la



FIGURE 2.26 – Film PEC (xérogel) avant décollage de sa boîte de Pétri.

présence de 3,9 % de N en surface. Ces quelques pourcents sont attribués à une pollution notamment protéique, du fait de la nature biosourcée du polymère. Les films de chitosane ont été élaborés à partir d'une solution de HCl, afin d'éviter la contribution XPS des acétates liée à l'utilisation de l'acide acétique en tant que milieu de dissolution. Le taux d'azote atteint 6,1 %, ce qui, comparé à l'alginate, est cohérent avec la présence d'atomes d'azotes sur les molécules de chitosane. Si l'on s'intéresse aux faces des PECs, on observe que le taux d'azote est plus important pour la face supérieure (4,1 %) que pour la face

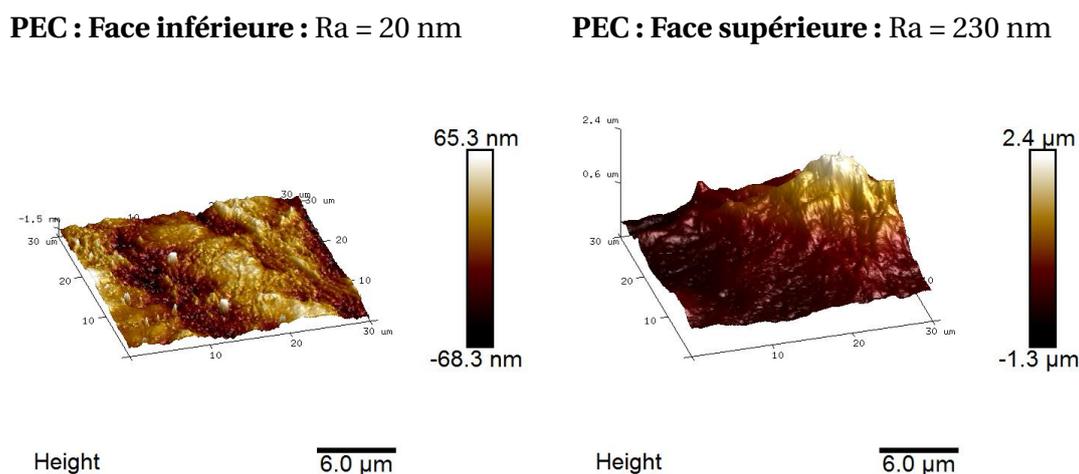


FIGURE 2.27 – Images AFM de (gauche) la face inférieure, en contact avec la boîte de Pétri et (droite) supérieure d'un PEC. «Ra» représente la rugosité arithmétique.

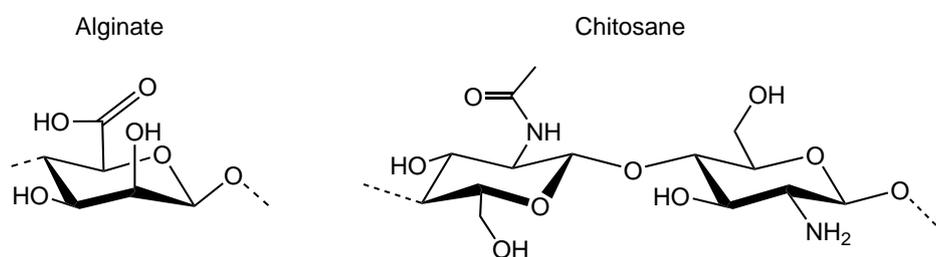


FIGURE 2.28 – Structures chimiques de l'alginate et du chitosane. Le chitosane porte un azote en C2.

TABLEAU 2.8 – Compositions atomiques, en pourcentages, de différents films déterminées par XPS. Ecart type d'environ 0,5 %. Les électrons analysés sont les 1s.

Surface	C (%)	N (%)	O (%)
<b>Alginate</b>	70,3	3,9	25,9
<b>Chitosane</b>	67,5	6,1	26,3
<b>PEC : Face inférieure</b>	62,3	1,7	36,0
<b>PEC : Face supérieure</b>	61,3	4,1	34,4

<sup>1</sup> dissous dans H<sub>2</sub>O, puis séché à 50 °C;

<sup>2</sup> dissous dans HCl/H<sub>2</sub>O (0,4 % v/v), puis séché à 50 °C

inférieure (1,7 %). Bien entendu, cette variation est à considérer avec précaution puisque les compositions mesurées en extrême surface peuvent être sujettes à de la pollution adsorbée. Quoi qu'il en soit, il semble tout de même que la face inférieure soit plus riche en alginate que la face supérieure. Il est possible que le verre support de la boîte de Pétri interagisse, via le silicium Si, avec les carboxylates  $\text{COO}^-$  de l'alginate, favorisant sa présence à l'extrême surface inférieure.

Il semble donc que les compositions des deux faces restent proches, avec, supposément, une proportion d'alginate légèrement supérieure pour la face inférieure comparé à la face supérieure. La modification de surface, qui sera présentée dans le chapitre, peut en être légèrement affectée puisque, avant traitement, les films sont décollés afin de modifier les deux faces.

## 2.5.2 Comportement physico-chimique

Les polysaccharides, leurs structurations ainsi que l'état de surface des PECs ont été caractérisés. La modification chimique de ces matrices dépend de la disponibilité des fonctions réactives en surface. Or, les études de gonflement réalisées précédemment (section 2.4.2) ont montré que les caractéristiques des matériaux développés dépendent de leur environnement. **Pour la modification de surface à venir, le choix du solvant est un critère non négligeable puisqu'il s'agit de garantir un greffage localisé uniquement en surface tout en maintenant l'intégrité du matériau.** Le DMSO, non toxique, permet de s'affranchir du gonflement des matrices et serait donc un solvant de réaction intéressant. De plus, du fait de la nature protique de fonctions réactives de l'alginate ( $\text{COO}^-$ ) et du chitosane ( $\text{NH}_2$ ), il est raisonnable de supposer que les conditions acido-basiques de l'environnement des PECs jouent un rôle sur l'état de ces fonctions ainsi que sur leur disponibilité chimique. Comprendre le comportement des PECs (type xérogel) est une étape importante afin de faciliter les modifications de surface présentées dans le chapitre 3.

Dans cette optique, une étude a été menée pour observer la stabilité des matériaux dans des milieux acides ou basiques, dans un solvant aqueux ou organique (tableau 2.9). L'alginate et le chitosane ont d'abord été étudiés seuls, puis en combinaison sous forme

TABLEAU 2.9 – Solutions utilisées pour l'étude de l'influence du pH sur les films d'alginate, de chitosane et de PECs.

Solvant	Acide/Base	pH
Eau	HCl	2,5
	NaOH	11
DMSO	HCl	3
	NaOH	12-14
	$\text{NH}_4\text{OH}$	>15

de PEC. Enfin, l'influence de la réticulation  $\text{CaCl}_2$  a aussi été investiguée.

### 2.5.2.1 Films de chitosane

Afin d'étudier le comportement du chitosane en milieu alcalin, des films ont été préparés à partir de solutions acides ( $\text{AcOOH}$ , 0,34 % v/v) concentrées à 1,5 % (m/v) de chitosane coulées dans des boîtes de Pétri. Après séchage (étuve, 50 °C), les films sont délicatement décollés et immergés dans différents milieux contenant  $\text{NaOH}$  ou  $\text{NH}_4\text{OH}$ , dans l'eau ou le DMSO.

Après différents temps, les films sont prélevés et séchés avant d'être analysés en spectroscopie ATR-FTIR. La figure 2.29 présente les spectres obtenus sur les films de chitosane après les différents traitements, en comparaison avec l'analyse d'un film de chitosane non traité (Chi-Ref). La zone d'intérêt autour de  $1600\text{ cm}^{-1}$  concentre différents signaux correspondant aux amines et amides, neutres ou protonés [26, 60–64]. La protonation de l'amide n'est cependant pas raisonnablement envisageable dans ces conditions en milieu aqueux, son  $\text{pK}_a$  se situant autour de 0 [65]. Les variations de signaux ne peuvent donc pas être attribuées aux propriétés acido-basiques de l'amide. En revanche, les films de chitosane sont produits en milieu acide ( $\text{AcOOH}$ ), condition nécessaire à la dissolution de ce dernier. On peut donc considérer que la majorité des amines est, avant traitement basique, sous forme protonées. En milieu aqueux (figure 2.29, a), l'augmentation de la bande à  $1641\text{ cm}^{-1}$  (amides I  $\text{NH}^+$ ) au bout de 12 H de traitement peut être due à la présence d'eau dans l'échantillon. En outre, on remarque au fil du temps un léger décalage vers les hauts nombres d'onde du signal d'absorbance à  $1560\text{ cm}^{-1}$  vers  $1595\text{ cm}^{-1}$ . La déprotonation des amines dans le milieu basique augmente en effet la contribution des amines neutres ( $1595\text{ cm}^{-1}$ ). Enfin, on peut noter que dès 10 minutes de traitement, l'aspect du film se détériore, sans pour autant perdre sa cohésion.

Le même traitement est réalisé dans le DMSO (figure 2.29, b). La baisse du signal des amides est associée à la déshydratation du matériau, notamment sur un temps long (12 H). En outre, l'effet du traitement sur les amines semble peu impactant. On peut supposer que la plus faible solubilité de  $\text{NaOH}$ <sup>4</sup> dans le DMSO rend son activité alcaline moins efficace (dissociation  $\text{Na}^+, \text{OH}^-$  moins marquée que dans l'eau). Après traitement, les films, même après 12 H, gardent leur aspect initial.

L'utilisation d'une solution ammoniacale en tant qu'agent alcalin semble plus apte à déprotoner les fonctions amines du chitosane, notamment sur des temps longs (12 H) (figure 2.29, c). La meilleure solubilisation des ions  $\text{NH}_4^+$  en est sans doute la cause. La neutralisation est néanmoins moins importante que dans le cas d'un traitement  $\text{NaOH}/\text{eau}$ , mais contrairement à ce dernier traitement l'intégrité des films n'est ici pas altérée.

4. 350 mg/L, données du fournisseur Gaylord Chemical Company

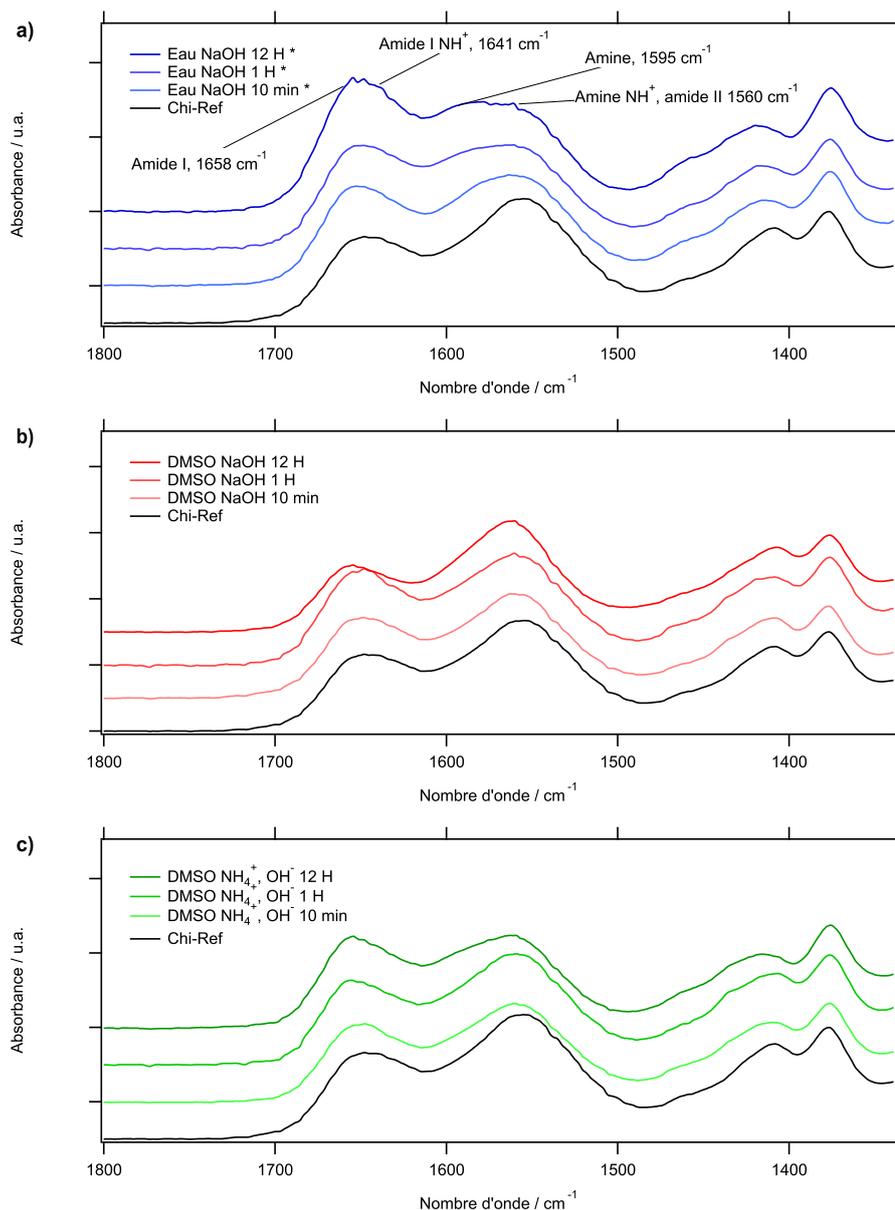


FIGURE 2.29 – Spectres FTIR de films de chitosane après différents traitements basiques. Chi-Ref (noir) désigne le film avant traitement. Une étoile signifie que le film a changé d’aspect pendant le traitement. Deux étoiles signifient que le film s’est dissous et/ou gélifié. Les spectres sont normalisés sur la bande C-O-C.

### 2.5.2.2 Films d’alginate

Les films d’alginate, réticulés au  $\text{CaCl}_2$  (1 % m/v, 1H30, Alg- $\text{CaCl}_2$ ) et non réticulés (Alg) au calcium, ont été préparés à partir de solutions à 1,5 % (m/v) coulées dans des boîtes de Pétri puis séchées (étuve,  $50^\circ\text{C}$ ). Les films ont alors été soumis à divers traitements acides. Après traitement, les films sont de nouveau séchés puis analysés par spectroscopie infrarouge (ATR-FTIR) et comparés à des films n’ayant subi aucun traitement (Alg-Ref et Alg- $\text{CaCl}_2$ -Ref).

Les films d’alginate non réticulés mis dans un milieu aqueux acide se dissolvent rapidement ( $< 10$  minutes). Leurs spectres infrarouges ne sont donc pas représentés. Dans

le DMSO (figure 2.30, a), on observe la diminution du signal correspondant aux carboxylates ( $1600\text{ cm}^{-1}$ ), au profit du signal des formes acides  $\text{COOH}$  ( $1724\text{ cm}^{-1}$ ). De plus, les films se détériorent rapidement dans ce milieu, avec une dissolution bien avancée après 12 H.

La réticulation du gel d'alginate (figure 2.30, b) permet de maintenir l'intégrité du matériau, sans gêner la protonation des carboxylates en milieu organique. Dans ces conditions, la labilité des ions  $\text{Ca}^{2+}$  est donc suffisante pour permettre l'approche d'un proton. Dans l'eau acidifiée (figure 2.30, c), le gel réticulé se tient et se protone plus rapidement,

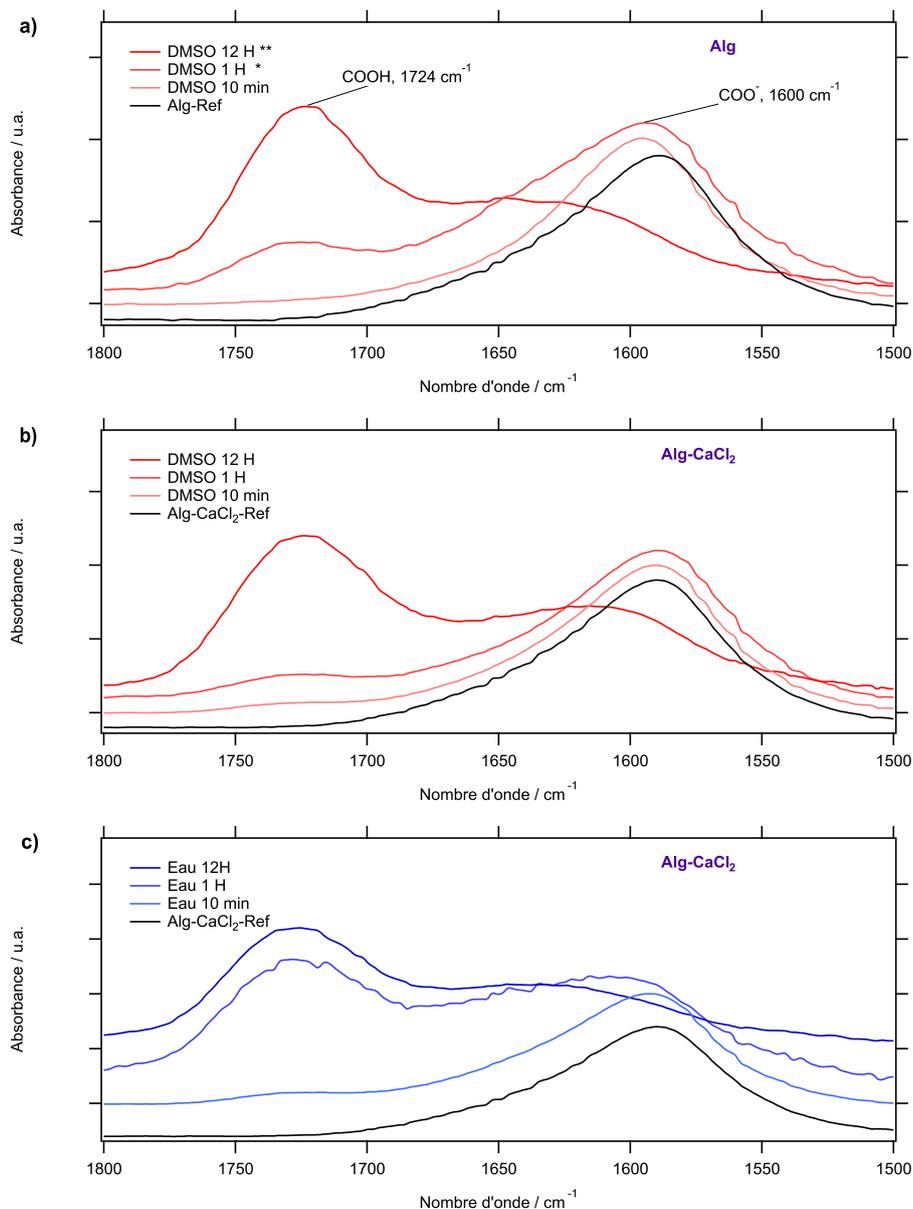


FIGURE 2.30 – Spectres FTIR de films d'alginate (Alg, a) non réticulés et (Alg- $\text{CaCl}_2$ , b et c) réticulés au  $\text{CaCl}_2$  après différents traitements acides (HCl). Alg-Ref et Alg- $\text{CaCl}_2$ -Ref (noir) désignent les films avant traitement. Une étoile signifie que le film a changé d'aspect pendant le traitement. Deux étoiles signifient que le film s'est dissous/gélifié. L'alginate non réticulé traité dans l'eau s'est dissous en moins de 10 min. Les spectres sont normalisés sur la bande C-O-C.

avec une proportion d'acide supérieur à la forme basique dès 1 H de traitement.

### 2.5.2.3 Films PECs

Les études sur les films d'alginate et de chitosane seuls ont permis d'étudier l'influence de l'acido-basicité du milieu sur le comportement des matériaux. La combinaison de ces polysaccharides en PEC risque néanmoins de modifier la disponibilité des fonctions amines (chitosane) et carboxylates (alginate), sensibles au pH. Une fois de plus, il s'agit d'observer l'effet du pH, du solvant et de la réticulation sur ces fonctions afin d'identifier les conditions utilisables pour les modifications de surface qui suivront chapitre 3. Des films de PECs, préparés à partir de solution à 1,5 % (m/v), coulées dans des boîtes de Pétri puis séchées (étuve, 50°C), réticulés au CaCl<sub>2</sub> (1 % m/v, 1H30, PEC-CaCl<sub>2</sub>) ou non (PEC), ont alors été traités dans différents milieux. Leur aspect ainsi que les modifications chimiques engendrées ont été évaluées.

Les spectres infrarouges (ATR-FTIR) des films PECs non réticulés au CaCl<sub>2</sub> mais soumis à un traitement acide ou basique en milieu aqueux ou acide en milieu organique sont présentés figure 2.31, gauche (a, b et c, respectivement). Les films PECs ayant subi les mêmes traitements, mais ayant été préalablement réticulés au CaCl<sub>2</sub> sont présentés figure 2.31, droite (d, e et f, respectivement).

Pour cette étude spectroscopique, il est intéressant d'observer les variations des signaux des fonctions acides et amines, sous forme neutre et ionique (figure 2.31, a). La région spectroscopique étudiée s'alourdit comparé à celle des biopolymères seuls, mais les études précédentes nous ont montré qu'une acidification devrait engendrer une augmentation du signal des COOH (1724 cm<sup>-1</sup>), tandis qu'un traitement alcalin devrait conduire, s'il est effectif, à un décalage de la bande des amines vers les hauts nombres d'ondes. Dans le cas d'un PEC traité dans de l'eau acidifiée, on observe deux phénomènes. Tout d'abord, la bande des COOH augmente, mettant en évidence la protonation de l'alginate. En outre, le signal attribué aux amines (1600 cm<sup>-1</sup>, confondu au signal des COOH) se décale effectivement vers 1558 cm<sup>-1</sup> (amines protonées) où un signal apparaît alors. Ce phénomène, significatif sur des temps supérieurs à 10 minutes, montre que le chitosane est présent de manière non négligeable sous forme neutre dans la matrice PEC avant traitement. Aucune réticulation CaCl<sub>2</sub> n'ayant été effectuée, le pH de la solution de mélange des polymères, pourtant mesuré à 5,5, n'a à priori pas permis une complexation totale des polyélectrolytes alginate et chitosane. Cette complexation partielle est aussi observée dans la littérature [26]. Le signal apparaissant à 1641 cm<sup>-1</sup> est probablement dû à l'hydratation des films. Au bout de 12 H, les films ne se sont ni dissous ni gélifiés, malgré une altération de leur aspect.

Les traitements aqueux alcalins (figure 2.31, au c) ont révélé l'effectivité de la déprotonation des amines, comme signifié par le déplacement du signal des amines protonées (1558 cm<sup>-1</sup>) vers les hautes longueurs d'onde. De plus, le film gélifie rapidement (10 mi-

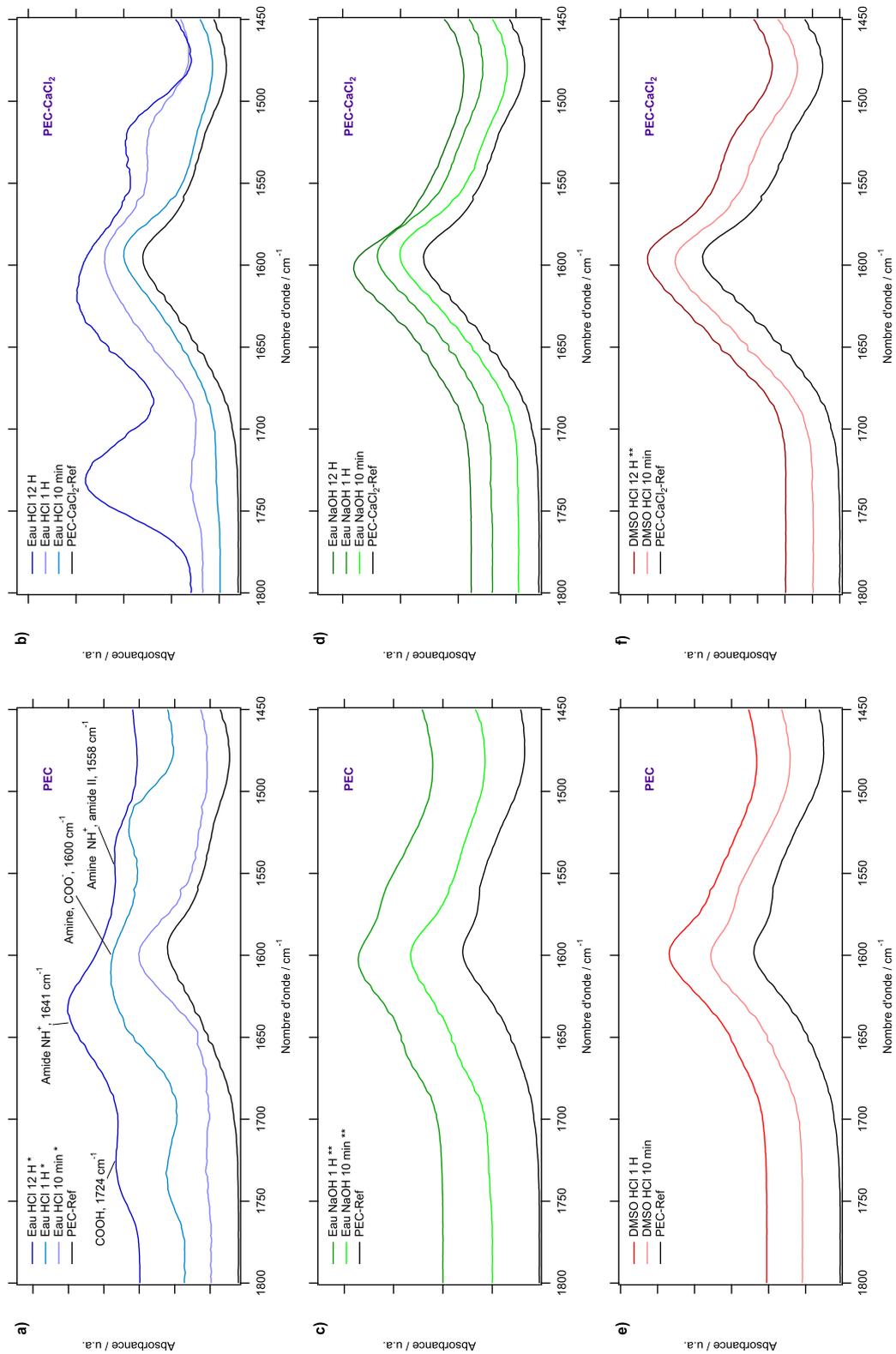


FIGURE 2.31 – Spectres FTIR de films PECs (gauche, PEC, a, c et e) non réticulés et (droite, PEC-CaCl<sub>2</sub>, b, d et f) réticulés au CaCl<sub>2</sub> après différents traitements acides (HCl) et basiques (NaOH). PEC-Ref (noir) désigne le film avant traitement. Une étoile signifie que le film a changé d'aspect pendant le traitement. Deux étoiles signifient que le film s'est dissous/gélinifié. Les spectres non présents sont gélinifiés ou dissous. Les spectres sont normalisés sur la bande C-O-C.

minutes), ce qui met en avant l'importance des amines du chitosane dans le maintien de la cohésion du matériau. Le traitement acide effectué dans le DMSO ne montre quant à lui pas de variation significative au bout d'une heure de traitement (figure 2.31, e). Cependant, au bout de 12 H dans le milieu (DMSO HCl 12H), le PEC s'est gélifié (spectre non réalisable). On peut alors supposer que les fonctions carboxyliques, peu accessibles car impliquées dans des interactions ioniques avec les amines du chitosane et/ou orientées sous la surface du matériau, finissent, via une cinétique lente, par être protonées. Une fois l'alginate protoné, le chitosane ainsi libéré peut alors se solubiliser, partiellement, dans ce milieu acide favorable. La décomplexation peut alors se poursuivre jusqu'à la gélification du matériau.

De manière intéressante, les variations chimiques liées au traitement acide dans l'eau sont bien plus importantes lorsque les PECs sont réticulés au calcium (figure 2.31, b). Les carboxylates semblent notamment beaucoup plus sensibles et se protonent, sur des temps longs, de manière plus conséquente. La mise en présence des PECs aux ions  $\text{Ca}^{2+}$  semble donc engendrer une plus grande disponibilité des fonctions  $\text{COO}^-$ . L'intercalation des ions calcium se fait probablement au détriment des interactions alginate/chitosane et cette liaison  $\text{COO}^-, \text{Ca}^{2+}$  est vraisemblablement plus labile. De plus, après liaison avec le calcium, la mobilité des groupements carboxylate ne peut être qu'augmentée, rendant ces derniers plus aptes à recevoir un proton. Outre cet effet, la réticulation permet au matériau de garder son intégrité cohésive : il ne semble pas souffrir du traitement, et ce même au bout de 12 H, quand les PECs non réticulés montrent des signes de dégradation dès les premières minutes. On pourra aussi noter que la protonation des amines semble quant à elle relativement similaire avec celle des PECs non réticulés, ce qui met en avant la prévalence de la protonation sur les fonctions de l'alginate liées aux cations calcium.

Le traitement basique (figure 2.31, d) ne semble pas avoir d'effet visible, que ce soit macroscopiquement ou en spectroscopie FTIR. Seule une augmentation de la présence d'eau semble décaler légèrement le signal autour de  $1600 \text{ cm}^{-1}$ , avec un épaulement léger autour de  $1640 \text{ cm}^{-1}$ . Le traitement acide dans le DMSO ne montre pas plus d'évolution du signal, si ce n'est une augmentation de l'absorbance des amines protonées (figure 2.31, f). Au bout d'une heure, le matériau est gélifié (spectre irréalisable). Au bout de 12 H, malgré la gélification, on n'observe toujours pas l'apparition de signaux des  $\text{COOH}$ . La protonation des carboxylates semble donc ne pas se produire. Ces derniers privilégient ainsi leurs interactions avec les ions calcium. La mauvaise solvatation des fonctions carboxylates ne favorise donc pas leur protonation, et seul le chitosane semble légèrement affecté par le traitement. Puisque l'alginate reste sous forme anionique, on peut supposer que la destruction de l'intégrité du matériau est liée à la formation d'interactions  $\text{NH}_3^+, \text{Cl}^-$ , au détriment d'interactions alginate/chitosane. Le DMSO, contrairement au milieu aqueux, favorise ainsi les interactions alginate/calcium, alors que les interactions alginate/chitosane restent fragiles.

### 2.5.2.4 Augmentation de la disponibilité des fonctions réactives

A partir des informations obtenues dans la section précédente, il a été possible de comprendre le comportement des différentes fonctions réactives de l'alginate et du chitosane ainsi que leurs interactions en fonction du pH et du solvant.

Il apparait que dans le cas des matériaux réticulés PEC-CaCl<sub>2</sub>, l'inclusion du calcium favorise le changement d'état acido-basique des fonctions COO<sup>-</sup> de l'alginate et NH<sub>3</sub><sup>+</sup> du chitosane lorsque ceux-ci sont dans un environnement acide aqueux. Il semble donc que l'intercalation des cations se fasse au détriment des interactions alginate/chitosane. Toujours dans l'eau, les traitements basiques de plus que les traitements acides dans le DMSO montrent une évolution moindre de l'état de ces fonctions.

Après avoir été acidifiés dans l'eau, on peut ainsi s'attendre à ce que la décomplexation des PECs, du fait de la neutralisation des fonctions COO<sup>-</sup> en COOH de l'alginate, rende ces fonctions, ainsi que les amines du chitosane, plus réactives. Toutefois, afin de limiter l'effet du traitement acide dans l'eau sur l'intégrité du matériau, les PECs réticulés ne devraient pas subir de traitements maintenus de manière prolongée et un temps d'acidification de 1 H semble approprié. **La possibilité de réaliser les réactions de modification chimique des surfaces dans le DMSO reste un objectif qui permettrait de limiter la modification à la surface du fait de l'absence de gonflement dans ce milieu.** Si l'on suppose qu'un traitement acide pourrait améliorer la disponibilité des fonctions de l'alginate et du chitosane, le comportement des PECs réticulés dans le DMSO après acidification reste à élucider.

Des PECs réticulés (PEC-CaCl<sub>2</sub>) ont ainsi été acidifiés pendant 1 H (Eau, H<sub>2</sub>O, HCl pH 2,5). Après séchage, ils ont été placés dans un solvant DMSO simple. Après 3 H, ces derniers ont été analysés par ATR-FTIR (figure 2.32). Le signal obtenu révèle alors que

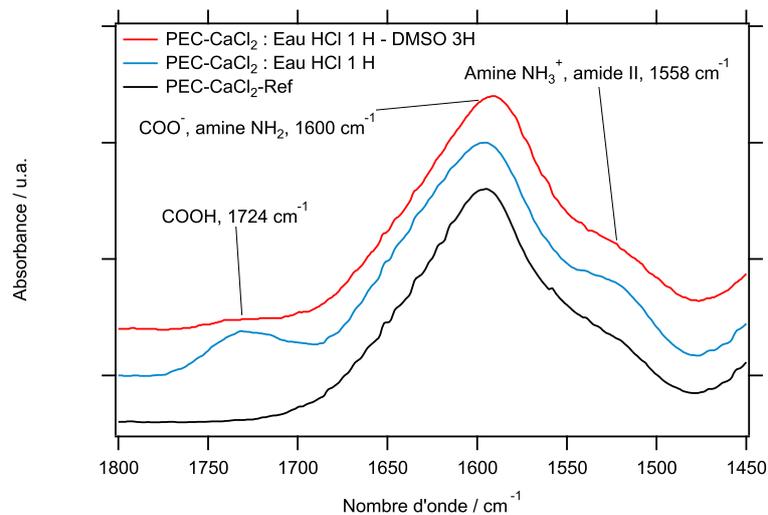


FIGURE 2.32 – Spectres FTIR de films PECs réticulés traités 1 H dans H<sub>2</sub>O, HCl pH 2,5 (bleu) puis trempé dans DMSO pendant 3 H (rouge).

la presque totalité des fonctions carboxyliques, qui s'étaient protonées (COOH,  $1724\text{ cm}^{-1}$ ) lors du traitement acide, ont retrouvées leur état anionique (COO<sup>-</sup>,  $1600\text{ cm}^{-1}$ ). Dans un même temps, les amines du chitosane qui s'étaient protonées dans le milieu acide (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>,  $1558\text{ cm}^{-1}$ ) se déprotonent elles aussi dans le DMSO (NH<sub>2</sub>,  $1600\text{ cm}^{-1}$ ).

A partir de ces observations, il est possible d'élaborer un schéma comportemental des PECs réticulés traités en milieu acide puis placés dans du DMSO simple (figure 2.33). En résumé, la réticulation semble se faire au détriment des interactions alginate/chitosane. Il en résulte un réseau plus sensible au traitement acide. Ce traitement permet quant à lui de décomplexer le matériau, rendant ses fonctions supposément plus disponibles. Toutefois, remis dans un milieu DMSO simple, les fonctions retrouvent leur état initial (COO<sup>-</sup> et NH<sub>3</sub><sup>+</sup>). Ces étapes successives peuvent être envisagées dans le but d'augmenter la dis-

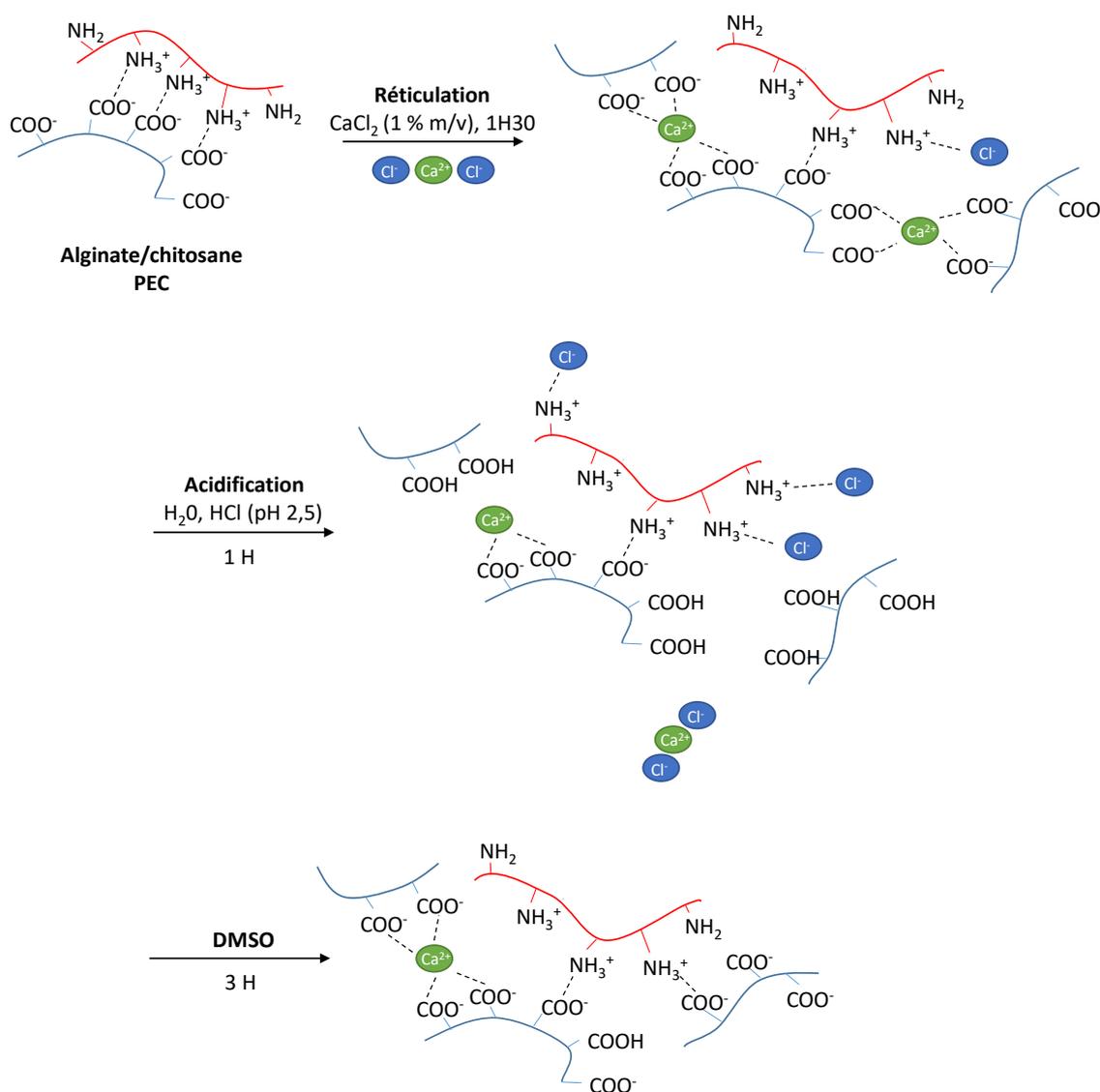


FIGURE 2.33 – Modèle du comportement des matrices PECs lors de différents traitements.

ponibilité des fonctions réactives de l'alginate et du chitosane dans l'optique de faciliter une modification de surface.

## 2.6 Conclusion

Au cours de chapitre, l'élaboration de la matrice absorbante, à base d'alginate et de chitosane, a été étudiée. En premier lieu, la caractérisation des polysaccharides a permis de déterminer le ratio M/G de l'alginate (2,7), le DA du chitosane (23 %) ainsi que leurs masses molaires visosimétriques (340 kDa et 1 300 kDa, respectivement). La formation d'interactions entre ces deux polyélectrolytes, menant à la formation d'un PECs, a pu être observée via l'étude de la texture des gels avant et après mélange. Ces observations gagneraient toutefois à être complétées par la détermination des modules  $G'$  et  $G''$  (rhéologie) lors de la formation du complexe. Quoiqu'il en soit, au sein de ces PECs, la réticulation de l'alginate, en excès, via le cation  $\text{Ca}^{2+}$ , s'accompagne d'une gélification rapide quantifiée par l'augmentation de la résistance à la compression des gels.

La structuration des matériaux obtenus par différents procédés de séchages a été comparée et il est apparu que le séchage par évaporation, conduisant à des xérogels, offrait un bon compromis entre facilité de procédé et propriétés. Avec des gonflements dans l'eau de l'ordre de 800 %, ce qui correspond à l'absorption d'environ 8 fois leur poids, ces matériaux présentent en outre une résistance enzymatique sur 14 jours suffisante (seulement 35 % de perte de masse) pour l'application souhaitée.

L'étude des propriétés de surface a montré que le procédé d'élaboration des films conduisait à un matériau doté de deux faces légèrement différentes : la face inférieure, au contact du support de fabrication, est lisse et supposément plus riche en alginate que la face supérieure, rugueuse.

Enfin, l'étude du comportement des matériaux dans des milieux acides ou basiques a montré l'influence du solvant sur la réactivité des fonctions carboxylates ( $\text{COO}^-$ ) de l'alginate et amines ( $\text{NH}_3^+$ ) du chitosane. Dans les PECs, la réticulation au calcium se fait au détriment des interactions alginate/chitosane rendant leurs fonctions plus sensibles au milieu extérieur. L'utilisation d'un traitement acide peut finalement permettre d'augmenter la disponibilité des fonctions réactives de l'alginate et du chitosane pour la modification de surface, qui est abordée dans le chapitre à suivre.

## Références

- [1] N. Annabi, J. W. Nichol, X. Zhong, C. Ji, S. Koshy, A. Khademhosseini, et F. Dehghani. Controlling the porosity and microarchitecture of hydrogels for tissue engineering. *Tissue engineering. Part B, Reviews*, 16(4) :371–83, 2010. 76, 95

- [2] H. J. Kong, M. K. Smith, et D. J. Mooney. Designing alginate hydrogels to maintain viability of immobilized cells. *Biomaterials*, 24(22) :4023–4029, 2003. [77](#)
- [3] I. Donati, S. Holtan, Y. a. Mørch, M. Borgogna, M. Dentini, et G. Skjåk-Bræk. New hypothesis on the role of alternating sequences in calcium-alginate gels. *Biomacromolecules*, 6(2) :1031–1040, 2005. [77](#), [82](#)
- [4] M. R. Kasaai. Calculation of Mark-Houwink-Sakurada (MHS) equation viscometric constants for chitosan in any solvent-temperature system using experimental reported viscometric constants data. *Carbohydrate Polymers*, 68(3) :477–488, 2007. [77](#), [83](#)
- [5] R. H. Chen. Effects of pH, ionic strength, and type of anion on the rheological properties of chitosan solutions. 46 :41–46, 1994.
- [6] F. Belalia et N.-E. Djelali. Rheological properties of sodium alginate solutions. *Revue Roumaine de Chimie*, 59(2) :135–145, 2014. [77](#), [79](#)
- [7] A. Martinsen, G. Skjåk-Bræk, O. Smidsrød, F. Zanetti, et S. Paoletti. Comparison of different methods for determination of molecular weight and molecular weight distribution of alginates. *Carbohydrate Polymers*, 15(2) :171–193, 1991. [79](#)
- [8] D. Zhong, X. Huang, H. Yang, et R. Cheng. New insights into viscosity abnormality of sodium alginate aqueous solution. *Carbohydrate Polymers*, 81(4) :948–952, 2010. [79](#)
- [9] H. Grasdalen. High-field, 1H-n.m.r. spectroscopy of alginate : sequential structure and linkage conformations. *Carbohydrate Research*, 118 :255–260, 1983. [80](#), [81](#)
- [10] S. G. Whittington. Conformational energy calculations on alginic acid I. Helix parameters and flexibility of the homopolymers. *Biopolymers*, 10(9) :1481–1489, 1971. [80](#)
- [11] S. G. Whittington. Conformational energy calculations on alginic acid. II. Conformational statistics of the copolymers. *Biopolymers*, 10(9) :1617–1623, 1971. [81](#)
- [12] E. M. Vilén, M. Klinger, et C. Sandström. Application of diffusion-edited NMR spectroscopy for selective suppression of water signal in the determination of monomer composition in alginates. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 49(9) :584–591, 2011. [80](#), [81](#), [82](#)
- [13] H. Grasdalen, B. Larsen, et O. Smidsrød. A p.m.r. study of the composition and sequence of uronate residues in alginates. *Carbohydrate Research*, 68(1) :23–31, 1979. [80](#), [82](#)

- [14] H. M. Jensen, T. Salomonsen, F. Larsen, et S. Engelsen. The Quantitative Impact of Water Suppression on NMR Spectra for Compositional Analysis of Alginates. In M. Guðjónsdóttir, P. Belton, et G. Webb, editors, *Magnetic Resonance in Food Science*, number April, pages 12–19. Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2009. [80](#)
- [15] J. M. Prieto, M. Mellinas-Gomez, et M. Zloh. Application of diffusion-edited and solvent suppression <sup>1</sup>H-NMR to the direct analysis of markers in valerian-hop liquid herbal products. *Phytochemical Analysis*, 27(2) :100–106, 2016. [80](#)
- [16] T. Salomonsen, H. M. Jensen, D. Stenbæk, et S. B. Engelsen. Chemometric prediction of alginate monomer composition : A comparative spectroscopic study using IR, Raman, NIR and NMR. *Carbohydrate Polymers*, 72(4) :730–739, 2008. [82](#)
- [17] L. Becherán-Marón, C. Peniche, et W. Argüelles-Monal. Study of the interpolyelectrolyte reaction between chitosan and alginate : influence of alginate composition and chitosan molecular weight. *International Journal of Biological Macromolecules*, 34(1-2) :127–133, 2004. [82](#), [90](#)
- [18] K. Azuma, R. Izumi, T. Osaki, S. Ifuku, M. Morimoto, H. Saimoto, S. Minami, et Y. Okamoto. Chitin, Chitosan, and Its Derivatives for Wound Healing : Old and New Materials. *Journal of Functional Biomaterials*, 6(1) :104–142, 2015. [82](#)
- [19] C. Wenling, J. Duohui, L. Jiamou, G. Yandao, Z. Nanming, et Z. Xiufang. Effects of the degree of deacetylation on the physicochemical properties and Schwann cell affinity of chitosan films. *Journal of biomaterials applications*, 20(2) :157–77, 2005. [82](#)
- [20] J. K. Hwang et H. H. Shin. Rheological properties of chitosan solutions. *Korea-Australia Rheology Journal*, 12(3) :175–179, 2001. [83](#)
- [21] Y. Shigemasa, H. Matsuura, H. Sashiwa, et H. Saimoto. Evaluation of different absorbance ratios from infrared spectroscopy for analyzing the degree of deacetylation in chitin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 18(3) :237–242, 1996. [83](#), [84](#)
- [22] S. C. Tan, E. Khor, T. K. Tan, et S. M. Wong. The degree of deacetylation of chitosan : Advocating the first derivative UV-spectrophotometry method of determination. *Talanta*, 45 :713–719, 1998. [83](#)
- [23] M. R. Kasaai. A review of several reported procedures to determine the degree of N-acetylation for chitin and chitosan using infrared spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, 71(4) :497–508, 2008. [83](#)
- [24] L. Heux, J. Brugnerotto, J. Desbrières, M. F. Versali, et M. Rinaudo. Solid state NMR for determination of degree of acetylation of chitin and chitosan. . . . , 1(4) :746–751, 2000. [83](#), [84](#), [85](#)

- [25] L. Manni, O. Ghorbel-Bellaaj, K. Jellouli, I. Younes, et M. Nasri. Extraction and characterization of chitin, chitosan, and protein hydrolysates prepared from shrimp waste by treatment with crude protease from bacillus cereus SV1. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(2) :345–357, 2010. [83](#), [84](#)
- [26] G. Lawrie, I. Keen, B. Drew, A. Chandler-Temple, L. Rintoul, P. Fredericks, et L. Grøndahl. Interactions between alginate and chitosan biopolymers characterized using FTIR and XPS. *Biomacromolecules*, 8(8) :2533–2541, 2007. [83](#), [91](#), [102](#), [113](#), [116](#)
- [27] M. Miya, R. Iwamoto, S. Yoshikawa, et S. Mima. I.r. spectroscopic determination of CONH content in highly deacylated chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2(5) :323–324, 1980. [84](#)
- [28] M. Castel-Molieres, G. Conzatti, J. Torrisani, A. Rouilly, S. Cavalie, N. Carrere, et A. Tourrette. Influence of Homogenization Technique and Blend Ratio on Chitosan/Alginate Polyelectrolyte Complex Properties. *Journal of Medical and Biological Engineering*, In press, 2017. [87](#), [88](#), [93](#), [100](#), [105](#)
- [29] H. V. Sæther, H. K. Holme, G. Maurstad, O. Smidsrød, et B. T. Stokke. Polyelectrolyte complex formation using alginate and chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 74(4) :813–821, 2008. [89](#), [90](#), [91](#)
- [30] I. Colinet, V. Dulong, T. Hamaide, D. Le Cerf, et L. Picton. New amphiphilic modified polysaccharides with original solution behaviour in salt media. *Carbohydrate Polymers*, 75(3) :454–462, 2009. [91](#)
- [31] M. Castel. *Mise en forme et caractérisation de biomatériaux pour la prévention des fistules pancréatiques après pancréaectomies*. Thèse, Université de Toulouse III - Paul Sabatier, 2017. [91](#)
- [32] B. Bellich, I. D’Agostino, S. Semeraro, A. Gamini, et A. Cesàro. “The Good, the Bad and the Ugly” of Chitosans. *Marine Drugs*, 14(5) :99, 2016. [92](#)
- [33] C. Z. Bueno, Â. M. Moraes, H. C. de Sousa, et M. E. M. Braga. Effects of supercritical carbon dioxide processing on the properties of chitosan–alginate membranes. *The Journal of Supercritical Fluids*, 112 :128–135, 2016. [92](#)
- [34] S. P. Raman, P. Gurikov, et I. Smirnova. Hybrid alginate based aerogels by carbon dioxide induced gelation : Novel technique for multiple applications. *Journal of Supercritical Fluids*, 106 :23–33, 2015. [92](#)
- [35] M. H. Ho, P. Y. Kuo, H. J. Hsieh, T. Y. Hsien, L. T. Hou, J. Y. Lai, et D. M. Wang. Preparation of porous scaffolds by using freeze-extraction and freeze-gelation methods. *Biomaterials*, 25(1) :129–138, 2004. [92](#), [95](#)

- [36] S. Quraishi, M. Martins, A. a. Barros, P. Gurikov, S. Raman, I. Smirnova, A. R. C. Duarte, et R. L. Reis. Novel non-cytotoxic alginate–lignin hybrid aerogels as scaffolds for tissue engineering. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2015. 92, 101
- [37] M. a. a. Kassem, A. N. ElMeshad, et A. R. Fares. Lyophilized Sustained Release Mucoadhesive Chitosan Sponges for Buccal Buspirone Hydrochloride Delivery : Formulation and In Vitro Evaluation. *AAPS PharmSciTech*, 16(3), 2014. 92, 95, 101
- [38] M. Y. Kim et J. Lee. Chitosan fibrous 3D networks prepared by freeze drying. *Carbohydrate Polymers*, 84(4) :1329–1336, 2011. 92
- [39] J. C. Kasper et W. Friess. The freezing step in lyophilization : Physico-chemical fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality attributes of biopharmaceuticals. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 78(2) :248–263, 2011. 94
- [40] T. R. Cuadros, A. A. Erices, et J. M. Aguilera. Porous matrix of calcium alginate/gelatin with enhanced properties as scaffold for cell culture. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 46 :331–342, 2015. 95
- [41] M. Robitzer, A. Tourrette, R. Horga, R. Valentin, M. Boissière, J. Devoisselle, F. Di Renzo, et F. Quignard. Nitrogen sorption as a tool for the characterisation of polysaccharide aerogels. *Carbohydrate Polymers*, 85(1) :44–53, 2011. 95, 96, 98
- [42] P. G. Debenedetti et R. C. Reid. Diffusion and mass transfer in supercritical fluids. *AIChE Journal*, 32(12) :2034–2046, 1986. 95
- [43] S. Cardea, L. Baldino, I. D. Marco, P. Pisanti, et E. Reverchon. Supercritical gel drying of polymeric hydrogels for tissue engineering applications. *Chemical Engineering Transactions*, 32 :1123–1128, 2013. 96
- [44] M. Robitzer, L. David, C. Rochas, F. Di Renzo, et F. Quignard. Supercritically-dried alginate aerogels retain the fibrillar structure of the hydrogels. *Macromolecular Symposia*, 273(1) :80–84, 2008. 96
- [45] G. Leofanti, M. Padovan, G. Tozzola, et B. Venturelli. Surface area and pore texture of catalysts. *Catalysis Today*, 41(1-3) :207–219, 1998. 96
- [46] D. A. D. H.-d. Rio, A. F. Aguilera-alvarado, I. Cano-aguilera, M. Martínez-rosales, et S. Holmes. Synthesis and Characterization of Mesoporous Aluminosilicates for Copper Removal from Aqueous Medium. 2012(July) :485–491, 2012. 96
- [47] W. Trisunaryanti. Calculation of nitrogen adsorption enthalpy on various catalysts. *Journal of Materials Science and Engineering*, 3(8) :40–43, 2009. 98

- [48] L. Zhao, Y. Wu, S. Chen, et T. Xing. Preparation and characterization of cross-linked carboxymethyl chitin porous membrane scaffold for biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*, 126 :150–155, 2015. [101](#)
- [49] I. Younes et M. Rinaudo. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Marine Drugs*, 13(3) :1133–1174, 2015. [102](#)
- [50] C. Pillai, W. Paul, et C. P. Sharma. Chitin and chitosan polymers : Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*, 34(7) :641–678, 2009. [102](#)
- [51] W. D. Worthington Biochemical Corporation. *Manual of Clinical Enzyme Measurements*. 1972. [104](#)
- [52] X. Meng, F. Tian, J. Yang, C. N. He, N. Xing, et F. Li. Chitosan and alginate polyelectrolyte complex membranes and their properties for wound dressing application. *Journal of Materials Science : Materials in Medicine*, 21(5) :1751–1759, 2010. [106](#)
- [53] P. A. Williams, K. T. Campbell, H. Gharaviram, J. L. Madrigal, et E. A. Silva. Alginate-Chitosan Hydrogels Provide a Sustained Gradient of Sphingosine-1-Phosphate for Therapeutic Angiogenesis. *Annals of Biomedical Engineering*, 45(4) :1003–1014, 2017. [106](#)
- [54] S. Dash, P. N. Murthy, L. Nath, et P. Chowdhury. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta poloniae pharmaceutica*, 67(3) :217–23, 2001. [107](#), [108](#)
- [55] R. W. Korsmeyer, R. Gurny, E. Doelker, P. Buri, et N. A. Peppas. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *International Journal of Pharmaceutics*, 15(1) :25–35, 1983. [107](#)
- [56] P. Costa et J. M. Sousa Lobo. Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(2) :123–133, 2001. [108](#)
- [57] P. Meyer, editor. *Physiologie humaine*. Flammarion edition, 1977. [109](#)
- [58] H. Guénard. *Physiologie Humaine*. Editions p edition, 2009. [109](#)
- [59] N. Oneil Machado. Pancreatic Fistula after Pancreatectomy : Definitions, Risk Factors, Preventive Measures, and Management—Review. *International Journal of Surgical Oncology*, 2012 :1–10, 2012. [109](#)
- [60] J.-P. Chen et T.-H. Cheng. Thermo-responsive chitosan-graft-poly(N-isopropylacrylamide) injectable hydrogel for cultivation of chondrocytes and meniscus cells. *Macromolecular bioscience*, 6(12) :1026–39, 2006. [113](#)

- [61] T. Qu, A. Wang, J. Yuan, J. Shi, et Q. Gao. Preparation and characterization of thermo-responsive amphiphilic triblock copolymer and its self-assembled micelle for controlled drug release. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, 72(1) :94–100, 2009.
- [62] M. Klein Gunnewiek, A. Di Luca, X. Sui, C. A. van Blitterswijk, L. Moroni, et G. J. Vancso. Controlled Surface Initiated Polymerization of N-Isopropylacrylamide from Polycaprolactone Substrates for Regulating Cell Attachment and Detachment. *Israel Journal of Chemistry*, 52(3-4) :339–346, 2012.
- [63] R. Umapathi, P. M. Reddy, A. Kumar, P. Venkatesu, et C.-J. Chang. The biological stimuli for governing the phase transition temperature of the "smart" polymer PNIPAM in water. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 135 :588–595, 2015.
- [64] A. Zajac, J. Hanuza, M. Wandas, et L. Dymińska. Determination of N-acetylation degree in chitosan using Raman spectroscopy. *Spectrochimica Acta - Part A : Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 134 :114–120, 2015. [113](#)
- [65] J. Clayden, N. Greeves, et S. G. Warren. *Organic chemistry*. Oxford University Press, 2e edition edition, 2012. [113](#)



---

# Chapitre 3

## Modification chimique pour une bioadhésion thermorégulée

### Sommaire

---

<b>3.1 Introduction</b> . . . . .	<b>129</b>
<b>3.2 Synthèse de PNIPAM fonctionnalisé : contrôle de la longueur de chaîne</b> .	<b>132</b>
3.2.1 La polymérisation RAFT : choix du solvant . . . . .	133
3.2.2 La polymérisation RAFT : synthèse de PNIPAM-COOH . . . . .	138
<b>3.3 Modifications chimiques</b> . . . . .	<b>145</b>
3.3.1 L'amidification . . . . .	146
3.3.2 Etudes préliminaires . . . . .	151
3.3.3 Fonctionnalisation de surface des PECs . . . . .	169
<b>3.4 Conclusion</b> . . . . .	<b>181</b>
<b>Références</b> . . . . .	<b>182</b>

---

### 3.1 Introduction

Dans le chapitre précédent, une matrice d'alginate et de chitosane a été développée. Les conditions utilisées sont récapitulées dans le tableau 3.1.

TABLEAU 3.1 – Paramètres d'élaboration de la matrice absorbante.

Echantillon	Alginate/Chitosane	CaCl <sub>2</sub>	Séchage
PEC-Ref	63/37	1 h 30	Evaporation (50 °C)

La matrice absorbante doit cependant posséder des propriétés bioadhésives thermorégulées afin de faciliter la pose du biomatériau. Plus précisément, il s'agit d'obtenir un biomatériau peu adhérent lors de sa pose sur l'organe pendant l'opération, afin de permettre un placement précis. Durant l'intervention, la cavité abdominale étant ouverte et

l'air des blocs opératoires frais (entre 19 °C et 26 °C [1]), on peut en effet supposer que la surface de l'organe du patient se trouve à une température inférieure à la normale du corps humain (37 °C). Après opération, la montée en température du dispositif correctement positionné doit assurer son maintien sécurisé sur le pancréas. Le PNIPAM est connu pour conférer aux surfaces des propriétés bioadhésives dépendantes de la température [2].

La figure 3.1 représente le biomatériau envisagé dans cette étude pour l'élaboration du pansement chirurgical destiné à la prévention des FPs. Une modification de surface doit permettre de conserver les propriétés intrinsèques de la matrice absorbante tout en conférant des propriétés de surfaces avancées grâce au caractère thermosensible du PNIPAM.

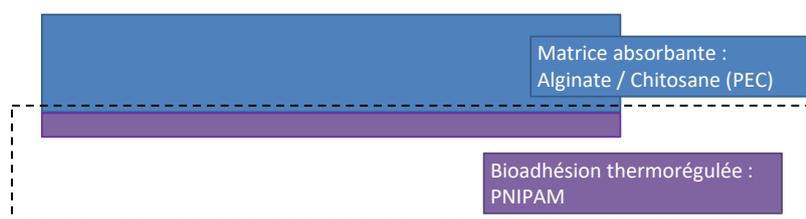


FIGURE 3.1 – Structure du biomatériau étudié dans cette thèse.

Deux approches peuvent être envisagées : la modification physique et le greffage chimique. La première méthode consiste à créer une couche adsorbée en surface via la formation d'interactions physiques. Diverses solutions permettent de réaliser une modification de surface physique. Parmi la quantité de méthodes disponibles, on peut citer le «spin-coating» ou encore le «dip-coating», déjà utilisés pour recouvrir des surfaces par du PNIPAM [3, 4]. Ces deux méthodes, simples, consistent à déposer le polymère sur la surface, soit en étalant une goutte par la rotation du substrat («spin-coating»), soit en trempant ce dernier directement dans une solution contenant le polymère à adsorber. Cette deuxième technique, le «dip-coating», a été utilisée afin de vérifier la faisabilité du dépôt physique d'une couche de PNIPAM sur les surfaces des PECs d'alginate/chitosane. Brièvement, le substrat PEC est placé sur un porte-support. Il est alors trempé dans un mélange eau/PNIPAM (10 % m/v), avant d'être retiré puis séché à l'étuve. Le PNIPAM est ainsi adhérent par interaction physique.

La modification physique par «dip coating» n'a cependant pas mené à des résultats concluants. En effet, si l'on peut observer le dépôt d'une couche uniforme sur la surface (figure 3.2, gauche), la spectroscopie infrarouge de surface (ATR-FTIR) révèle qu'au bout de 2 jours en milieu aqueux, le PNIPAM ne semble pas rester adhérent en surface, puisqu'on observe une disparition des bandes amides caractéristiques du PNIPAM ( $1624\text{ cm}^{-1}$  et  $1535\text{ cm}^{-1}$ , figure 3.2, droite, PNIPAM) sur les PECs modifiés (PEC-PNIPAM-H<sub>2</sub>O-2j-25°C). Une température supérieure à la LCST ne permet en outre pas de préserver la couche superficielle de PNIPAM, malgré son caractère supposé hydrophobe à cette tem-

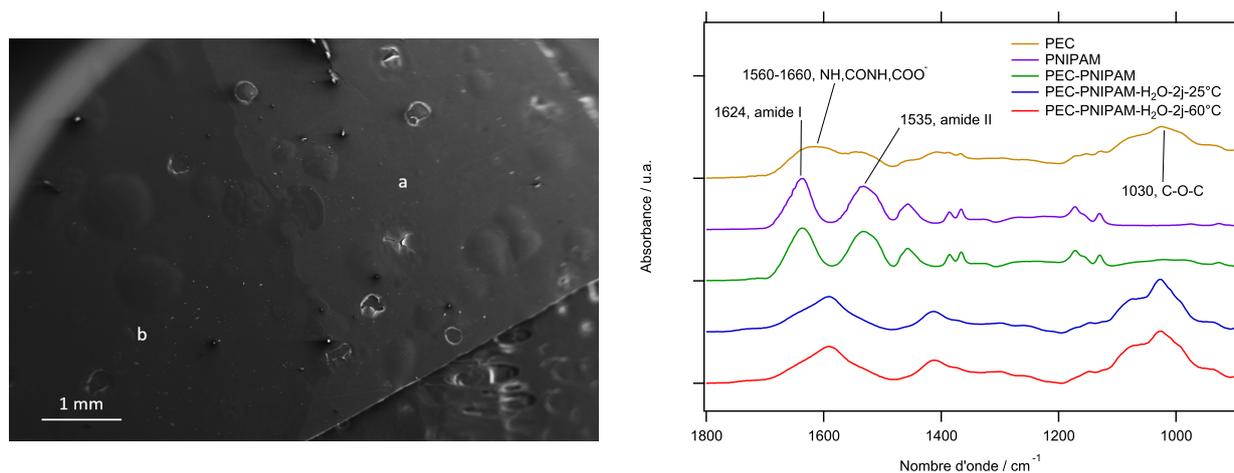


FIGURE 3.2 – (Gauche) micrographie MEB d'une surface de PEC (a) nue et (b) passée dans une solution de PNIPAM (10 % dans H<sub>2</sub>O) et (droite) ATR-FTIR du matériau avant (PEC-PNIPAM) et après 2 jours dans l'eau, à 25 °C et 60°C.

pérature (PEC-PNIPAM-H<sub>2</sub>O-2j-60°C).

Il est donc nécessaire d'envisager une modification chimique afin de maintenir un état de surface stable, approprié en milieu aqueux. Le greffage chimique, outre de permettre une meilleure cohésion entre la couche superficielle de **PNIPAM** et le substrat d'alginate/chitosane, permet la formation d'une structure en peigne («brush»). Ce type de structure autorise, comme nous l'avons vu section 1.4.1, un bon contrôle de l'état de surface. En effet, en plus de la taille des chaînes de polymères greffées, la densité de greffage peut être modulée en jouant sur les conditions réactionnelles. Comme nous l'avons vu section 1.4.3, ces deux paramètres influent sur les propriétés bioadhésives des surfaces et il est donc important d'envisager une approche permettant de les contrôler [2].

Deux types de stratégies sont possibles quant à la formation d'une structure en peigne à la surface d'un matériau : le "*grafting from*" et le "*grafting to*" (voir section 1.4.2). Le "*grafting from*" consiste à faire croître le polymère que l'on souhaite greffer, dans notre cas le **PNIPAM**, directement depuis la surface, quand le "*grafting to*" consiste à greffer le polymère préalablement synthétisé sur la surface. Le "*grafting from*" permet de produire des structures peignes plus denses : cette stratégie a donc initialement été envisagée. La stratégie a alors consisté à greffer un initiateur radicalaire en surface des **PECs**, puis à initier la polymérisation depuis ces surfaces, en présence de monomère. La difficulté de caractérisation s'est cependant avérée être un obstacle majeur. Ce type de stratégie est préférable sur des systèmes bien maîtrisés et l'utilisation du "*grafting to*" s'est rapidement imposée comme une alternative plus raisonnable. Ainsi, seules les expériences relatives au "*grafting to*" seront présentées. Dans tous les cas, la réactivité des polysaccharides composant la matrice absorbante est à considérer.

L'alginate et le chitosane possèdent des sites réactifs avec, respectivement, des fonctions acides carboxyliques R-COOH et amines R-NH<sub>2</sub>. Un **PNIPAM** portant un acide car-

boxylique en bout de chaîne peut alors être greffé sur les fonctions amines du chitosane via la formation d'amides (figure 3.3, 1). La stratégie de "*grafting to*" proposée ici consiste alors à augmenter le nombre de sites réactifs en surface en greffant, lors d'une première étape, une diamine sur les acides carboxyliques de l'alginate (**2a**). Il en résulterait une amination de l'alginate et le PNIPAM-COOH pourrait alors se lier, covalentement, en créant des fonctions amides avec la diamine de l'alginate en plus des amines du chitosane (**2b**). L'ajout de l'étape intermédiaire **2a**, c'est-à-dire le greffage de la diamine, permettrait donc d'augmenter la densité de greffage du PNIPAM en surface. Les matériaux obtenus seront comparés à ceux obtenus par greffage direct (**1**) : ces deux types de matériaux présenteront, en théorie, des densités de greffages différentes.

Enfin, le PNIPAM greffé doit être fonctionnalisé via une fonction R-COOH et sa taille modulée. Pour ce faire, il est possible de synthétiser ce polymère à partir du monomère, le NIPAM, via une polymérisation contrôlée. Parmi les solutions possibles, on se propose d'utiliser la polymérisation RAFT (voir section 1.4.2.2). C'est donc sur ce premier point que ce chapitre va tout d'abord être axé.

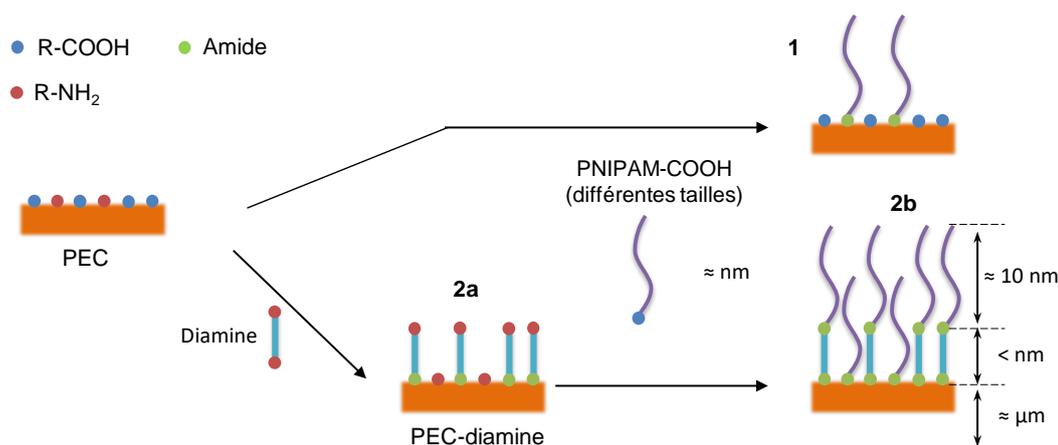


FIGURE 3.3 – Stratégies de greffage chimique du PNIPAM sur la surface des PECs. Deux paramètres sont étudiés : la taille du polymère greffé et le greffage préalable d'une diamine, censée augmenter le nombre de sites réactifs en surface et donc la densité de greffage. Les différents éléments ne sont pas dessinés à l'échelle et les ordres de grandeur mentionnés ne sont que des approximations.

## 3.2 Synthèse de PNIPAM fonctionnalisé : contrôle de la longueur de chaîne

Le greffage du PNIPAM nécessite que ce polymère soit réactif. Les fonctions carboxyliques (R-COOH) sont réactives envers les amines (R-NH<sub>2</sub>) via la formation d'amides et peuvent donc permettre son greffage sur les surfaces de PECs. Cet aspect sera plus amplement développé section 3.3.1. L'autre intérêt de ces groupements réside dans la grande



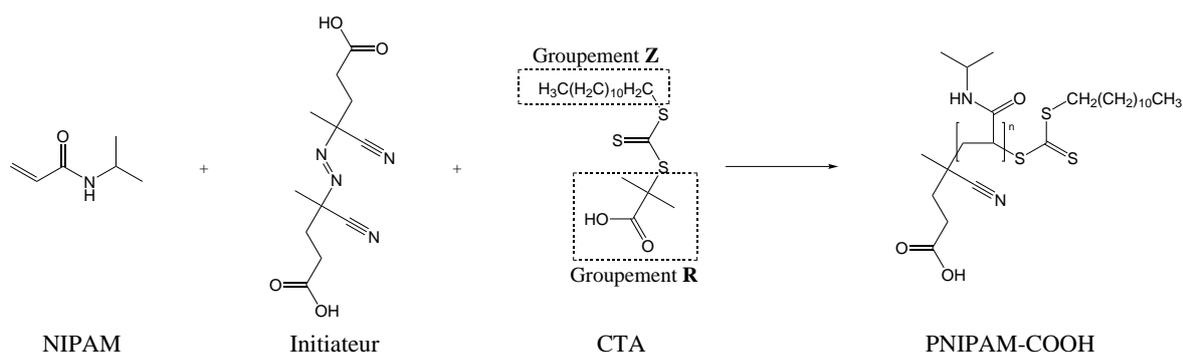


FIGURE 3.5 – Polymérisation RAFT du PNIPAM, donnant lieu à un polymère fonctionnalisé COOH en bout de chaîne. Le groupement Z sert à stabiliser le radical tandis que le groupement R est un groupe partant.

TABLEAU 3.2 – Polymérisation du NIPAM (2 g) dans différents solvants ( $V = 5$  mL). La polymérisation est considérée comme ayant eu lieu lorsque le milieu s'est viscosifié ou solidifié. Les concentrations utilisées sont les suivantes : monomère = 3,5 mol/L; initiateur = 2,5 mmol/L; CTA = 19,7 mmol/L, pour un  $Mn_{th} = 20\ 000$  g/mol (calculée à partir de l'équation 3.1).

Solvant	Température	Observation
Dioxane	70°C	Pas de polymérisation après 12 h
Dioxane	80°C	Pas de polymérisation après 12 h
DMF	70°C	Pas de polymérisation après 12 h
THF	70°C	Polymérisation rapide (<1 h)
MeTHF	70°C	Polymérisation rapide (<1 h)

reporté des phénomènes d'oxydation de l'agent RAFT du fait la présence de peroxydes générés par l'exposition prolongée du dioxane à l'air [10, 11]. Cette oxydation conduit à la désactivation du CTA et peut expliquer l'absence de polymérisation. La polymérisation ne se déroule pas non plus, sur 12 h, lorsque le solvant choisi est le DMF. Ce solvant est pourtant parfois utilisé pour la polymérisation RAFT du PNIPAM bien que l'initiateur ou le CTA soient différents [12, 13]. Dans certaines conditions peuvent aussi se produire des phénomènes de transfert des radicaux vers ce solvant [8, 14]. On voit ainsi l'interdépendance du monomère, du CTA, de l'initiateur et du solvant dans la conduite efficace de la polymérisation [15]. Entre autre, la solubilisation des différentes espèces produites lors du procédé RAFT entre en compte, et le choix des conditions reste principalement empirique. Ainsi, le tétrahydrofurane (THF), à l'instar du dioxane, peut conduire à la formation de peroxydes. Toutefois, dans ces conditions, il semble être un bon solvant puisque le milieu se viscosifie jusqu'à devenir solide dès la première heure qui suit l'ajout de l'initiateur. Cependant, le THF est un solvant nocif<sup>1</sup>. Le 2-Méthyl tétra hydrofurane (MeTHF) se présente comme une alternative : il s'agit d'une substance biosourcée non cancérigène [16]. Ce solvant se montre de plus apte à accueillir la polymérisation au même titre que le THF (tableau 3.2).

1. Entre autres, H302 (nocif en cas d'ingestion) et H351 (susceptible de provoquer le cancer); source Sigma-Aldrich, fiche de données sécurité (FDS).

Une étude plus poussée est alors nécessaire pour déterminer la validité ou non des solvants. De plus, il s'agit de déterminer les masses réellement obtenues en polymérisant du PNIPAM-COOH à deux différentes tailles théoriques visées : 20 000 g/mol et 60 000 g/mol. La détermination de la masse molaire est effectuée par CES. Des suivis cinétiques ont été effectués dans différentes conditions, les résultats sont résumés dans le tableau 3.3. Lors de cette expérience, les conditions pour obtenir la masse finale visée ( $Mn_{th}$ ) ont été déterminées via l'équation 3.1 :

$$M_{n_{th}} = \frac{[Mono]_0}{[CTA]_0} \times M_{Mono} \times conv. + M_{CTA} \quad (3.1)$$

où  $M_{Mono}$  correspond à la masse molaire du monomère,  $[Mono]_0$  sa concentration initiale,  $conv.$  est le taux de conversion (que l'on considèrera à 100 %),  $M_{CTA}$  le poids moléculaire du CTA et  $[CTA]_0$  sa concentration initiale [12, 13].

Il ressort de ces résultats que les temps de polymérisation sont relativement courts et, dans tous les cas, inférieurs à 120 minutes (tableau 3.3). Les polymérisations effectuées dans le THF avec un  $Mn_{th} = 20\ 000$  g/mol montrent des masses atteignant 17 100 g/mol, avec des IP de 1,2. Rappelons que l'IP, défini comme le ratio Mw/Mn, donne une idée de la polydispersité du polymère obtenu. Plus ce dernier est bas, plus le polymère est mono-disperse, le cas idéal étant un IP de 1. Les IP mesurés, autour de 1,2, sont représentatifs d'une polymérisation relativement contrôlée. En outre, les mesures effectuées à 60 min et 90 min révèlent les mêmes masses Mn. Le temps nécessaire pour mener la polymérisation à terme est donc inférieur à 60 min. Lorsque le  $Mn_{th}$  est fixé à 60 000 g/mol, la masse obtenue Mn n'atteint qu'environ 35 000 g/mol. La masse théorique est donc divisée de moitié, et le contrôle moins efficace que pour les petites masses (IP = 1,4). La synthèse de

TABLEAU 3.3 – Données cinétiques concernant la polymérisation du NIPAM (2 g) dans différents solvants (V = 5 mL). Toutes les polymérisations semblent arriver à terme dans les premières 30 à 120 minutes. Les concentrations utilisées sont les suivantes : monomère = 3,5 mol/L; initiateur = 2,5 mmol/L.

Solvant	[CTA] <sub>0</sub> <sup>1</sup> (mmol/L)	Mn <sub>th</sub> <sup>2</sup> (g/mol)	Temps	Mn <sup>3</sup> (g/mol)	IP <sup>3</sup>
THF	19,7	20 000	60 min	17 700	1,2
			90 min	17 100	1,2
	7,0	60 000	30 min	33 800	1,3
			60 min	34 600	1,4
MeTHF	19,7	20 000	60 min	10 000	1,1
			120 min	9 500	1,1
	7,0	60 000	120 min	12 500	1,1
			24 h	9 500	1,6

<sup>1</sup> concentration en CTA;

<sup>2</sup> masse molaire théorique du PNIPAM obtenu, calculée à partir de l'équation 3.1; <sup>3</sup> mesurée par SEC

polymères de masses plus élevées semble donc plus difficile que pour de petites masses. La polymérisation semble toutefois complète au bout de 30 min seulement.

Dans le cas du MeTHF, il semble que la taille du polymère synthétisé soit limitée, comme l'indique la perte de contrôle et le plafonnement autour de 10 000 g/mol (tableau 3.3,  $Mn_{th} = 65\ 000$ ). De plus, les prélèvements effectués à des temps inférieurs à 120 minutes n'ont pas révélé la présence de suffisamment de polymère pour être analysés. Un effet de retardement de la polymérisation peut en être la raison. Ce phénomène, lié à la cinétique de formation des radicaux par la décomposition de l'initiateur, est connu dans la littérature et difficile à anticiper [17, 18]. Le comportement dans le MeTHF étant plus difficile à prévoir et la taille des polymères obtenus limitée, la poursuite de l'étude se focalisera sur la polymérisation dans le THF.

Un suivi cinétique plus précis de l'évolution de la masse molaire dans le THF ( $Mn_{th} = 60\ 000$ , figure 3.6, a) révèle alors que la polymérisation semble se stabiliser au bout d'environ 15 minutes, avec un Mn final de 35 000 g/mol. L'IP est quant à lui relativement stable tout au long du suivi, oscillant entre 1,1 et 1,4. Ces faibles IPs semblent indiquer que le CTA joue son rôle et que la synthèse suit un mécanisme RAFT. Comme déjà remarqué, on constate que le polymère obtenu est plus petit de près de moitié par rapport au  $Mn_{th}$ .

L'évolution du taux de conversion, mesuré par RMN (voir section expérimentale, Chapitre 5), ralentit, de la même manière que Mn, au bout d'environ 15 minutes pour atteindre une conversion du monomère de 86 % au bout d'une heure (figure 3.6, b). La conversion n'étant pas totale, la masse du polymère obtenu ne peut être qu'inférieure à la masse théorique visée, calculée en considérant un taux de conversion de 100 %. Toutefois, si l'on compare les masses réelles obtenues aux masses théoriques  $Mn_{th}$  en fonction du taux de conversion, il apparaît que l'écart entre la théorie et la masse mesurée n'est pas uniquement lié au taux de conversion lui-même (figure 3.6, c). Peu de points ont été mesurés, mais il semble tout de même que l'évolution des masses suit le comportement linéaire théorique jusqu'à environ 60 % de conversion. Au-delà, le monomère continu à être consommé, sans que le Mn mesuré n'augmente significativement.

Aux hauts taux de conversion, les cinétiques ralentissent du fait de la faible concentration en monomère. Les autres phénomènes sont ainsi plus enclins à déstabiliser le mécanisme de réaction. La désactivation d'une partie du CTA par d'éventuels peroxydes peut ainsi expliquer le décalage observé, mais ce n'est pas la seule hypothèse possible. La polymérisation est de nature exothermique [8, 17, 19]. L'évacuation de la chaleur générée lors de la réaction est donc un point important qui n'a, au vu des conditions expérimentales utilisées, probablement pas été optimale. Une augmentation de la température au sein du milieu peut conduire à la dégradation du CTA [20] ou à la favorisation des phénomènes de «backbitting» et scissions  $\beta$  [8]. Le «backbitting» est le terme associé au déplacement du radical placé en bout de chaîne vers «l'arrière», c'est-à-dire sur un carbone situé plus en amont sur la chaîne polymérique. Ce phénomène peut être suivi via une scission  $\beta$  (coupure de la chaîne de polymère au niveau du radical) par la désactivation de la chaîne

### 3.2. SYNTHÈSE DE PNIPAM FONCTIONNALISÉ : CONTRÔLE DE LA LONGUEUR DE CHAÎNE

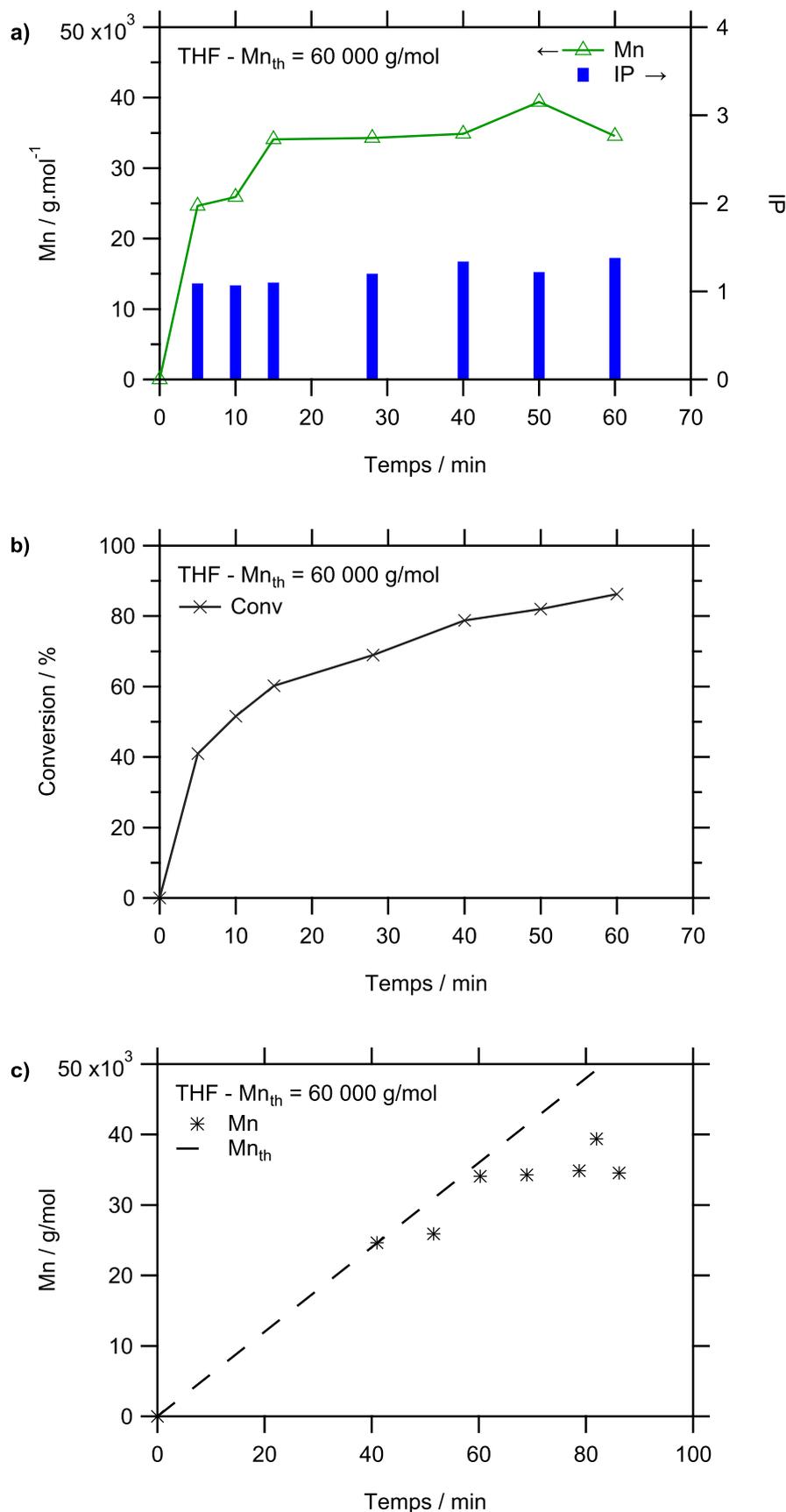


FIGURE 3.6 – Suivi cinétique d’une polymérisation RAFT dans le THF avec un  $Mn_{th}$  de 60 000 g/mol avec (a) l’évolution des masses Mn mesurées par chromatographie d’exclusion stérique (SEC), (b) les taux de conversion du monomère déterminés par RMN et (c) l’évolution de Mn en comparaison avec  $Mn_{th}$  en fonction du taux de conversion.  $Mn_{th}$  est calculé via l’équation 3.1.

ou à la formation d'un polymère non linéaire, ce qui en définitive conduit à la diminution de la taille du polymère obtenu [8, 17].

La polymérisation RAFT s'esquisse donc comme bien plus complexe que préalablement présentée section 1.4.2.2. En cause, l'effet du solvant par le biais de plusieurs phénomènes : i) la solubilité des différentes espèces, avec la formation possible de complexes solvant-polymère ou solvant-CTA [21], ii) le transfert des radicaux vers le solvant, déjà reporté pour le DMF [8, 14] ou le THF [22] et iii) la dégradation du CTA par les peroxydes présents dans le solvant dans le cas du dioxane et du THF [10, 11]<sup>2</sup>. Tous ces phénomènes ne sont pas encore totalement compris dans la littérature et il est difficile de déterminer quels effets sont réellement à l'œuvre. Dans tous les cas, seuls le THF et le MeTHF semblent permettre la polymérisation dans ces conditions. Dans le MeTHF, la taille du polymère obtenu semble atteindre une limite. Le  $M_n$  obtenu diminue sur les temps de polymérisation longs simultanément à une augmentation importante de l'IP, ce qui peut être la conséquence de «backbiting». La limitation de la taille peut aussi être caractéristique d'un transfert vers le solvant. La présence du méthyle peut en effet favoriser la stabilisation d'un radical sur le cycle, en position alpha de l'éther [22]. Cette hypothèse semble cohérente avec la possibilité du THF, qui ne présente pas de méthyle, de conduire à des polymères de tailles plus importantes. Le THF semble être le solvant le plus indiqué pour la synthèse de PNIPAM contrôlé. Ce solvant étant nocif, il faudra cependant s'assurer de son absence après purification du polymère en vue des évaluations *in vitro*. Dans tous les cas, des études complémentaires doivent permettre de synthétiser du PNIPAM pour la modification de surface des PECs.

### 3.2.2 La polymérisation RAFT : synthèse de PNIPAM-COOH

Afin de mieux comprendre le comportement de la polymérisation RAFT du PNIPAM dans le THF, différentes expériences ont été réalisées (tableau 3.4). Les conditions utilisées dans la section précédente sont reprises en tant que conditions références (PNI-1 et PNI-4), à ceci près que le  $M_{n_{th}}$  de 20 000 g/mol est légèrement augmenté jusqu'à 25 000 g/mol puisque, comme vu précédemment, les masses obtenues sont généralement inférieures à celles visées (taux de conversion inférieur à 100 %, phénomènes parasites). La polymérisation de masses plus importantes étant plus difficile, le  $M_{n_{th}}$  de 60 000 g/mol est maintenu. Enfin, les réactions sont conduites pendant 12 H afin de s'assurer d'une conversion maximale du monomère sans nécessiter un suivi cinétique systématique.

Différents paramètres ont alors été étudiés. L'impact du CTA (tableau 3.4, PNI-1 et PNI-4) a été comparé à la polymérisation radicalaire classique (PNI-N). Deux tailles de polymère théoriques  $M_{n_{th}}$  ont aussi été visées. Pour ce faire, les conditions initiales sont modulées : le ratio entre la concentration initiale en monomère ( $[M_0]$ ) et le CTA ( $[CTA_0]$ )

---

2. la distillation du solvant devrait permettre d'éliminer les peroxydes afin de vérifier l'hypothèse de leur impact

### 3.2. SYNTHÈSE DE PNIPAM FONCTIONNALISÉ : CONTRÔLE DE LA LONGUEUR DE CHAÎNE

TABLEAU 3.4 – Conditions expérimentales utilisées pour la polymérisation du NIPAM dans le THF. PNI-N est réalisé sans CTA et sert de référence.

Echantillon	Volume (mL)	$m_{M_0}$ <sup>1</sup> (g)	$[M_0]$ <sup>2</sup> (mol/L)	$[I_0]$ <sup>3</sup> (mmol/L)	$[CTA_0]$ <sup>4</sup> (mmol/L)	T (°C)	$Mn_{th}$ <sup>5</sup> (g/mol)
PNI-N	5	2	3,5	2,5	-	70	-
PNI-1	5	2	3,5	2,5	16,5	70	25 000
PNI-2	38	15	3,5	2,5	16,5	70	25 000
PNI-3	38	15	3,5	2,5	16,5	70	25 000
PNI-4	5	2	3,5	2,5	7,0	70	60 000
PNI-5	38	15	3,5	2,5	7,0	70	60 000
PNI-6	7	2	2,5	1,8	5,0	70	60 000
PNI-7	53	15	2,5	1,8	5,0	70	60 000
PNI-8	38	15	3,5	1,1	7,0	70	60 000
PNI-9	38	15	3,5	1,1	7,0	60	60 000

<sup>1</sup> masse de monomère; <sup>2</sup> concentration en monomère;

<sup>3</sup> concentration en initiateur; <sup>4</sup> concentration en CTA;

<sup>5</sup> masse molaire théorique du PNIPAM, calculée à partir de l'équation 3.1

est calculé pour obtenir 25 000 g/mol (PNI-1 à PNI-3) et 60 000 g/mol (PNI-4 à PNI-9). Dans l'objectif de synthétiser suffisamment de PNIPAM pour le greffage des surfaces PECs, l'augmentation des quantités a aussi été étudiée (PNI-2, 3, 5, 7, 8 et 9). Enfin, l'étude a aussi porté sur l'impact de la diminution de la quantité d'initiateur (PNI-5 et PNI-8) et de la température (PNI-8 et PNI-9).

En premier lieu, afin de vérifier si la polymérisation suit bien un mécanisme RAFT, celle-ci a été effectuée avec et sans CTA dans 5 mL de THF (PNI-N, PNI-1 et PNI-4). La figure 3.7 présente la détection par indice de réfraction (dRi) des chaînes de polymères en

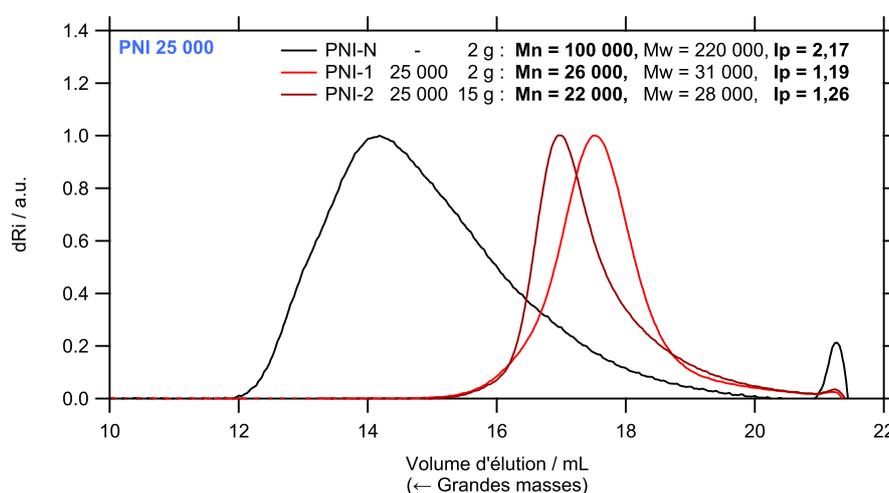


FIGURE 3.7 – Analyse par SEC d'un polymère obtenu dans le THF (noir, PNI-N) à partir de 2 g de monomère, sans présence de CTA, (rouge clair, PNI-1) en présence de CTA ( $Mn_{th} = 25\ 000$ ) et (rouge foncé, PNI-2) à partir de 15 g de monomère, en présence de CTA ( $Mn_{th} = 25\ 000$ ).

fonction de leur volume d'élution par CES. Rappelons que le volume d'élution diminue avec la taille des chaînes de polymère. En l'absence de CTA (PNI-N), on mesure une taille de polymère moyenne, en nombre, importante, de l'ordre de 100 000 g/mol. Le  $M_w$  associé monte jusqu'à 220 000 g/mol. Il en résulte une polydispersité importante ( $IP = 2,17$ ), ce qui montre l'absence de contrôle de la polymérisation. Si l'on ajoute, dans les mêmes conditions, une quantité de CTA de sorte d'obtenir, d'après l'équation 3.1, un  $M_{n_{th}}$  de 25 000 g/mol, on observe que la masse molaire obtenue est proche de la valeur théorique ( $M_n = 26 000$  g/mol) et est donc contrôlée (figure 3.7, PNI-1). Cela se traduit par un décalage du pic d'élution vers les grands volumes (petites masses). De plus, le pic d'élution est affiné, ce qui est caractéristique d'un  $IP$  réduit (1,19). On peut alors raisonnablement supposer que la polymérisation suit bien un mécanisme RAFT lorsque le CTA est utilisé et que ce dernier permet le contrôle de la masse du polymère obtenu. La quantité de polymère a été augmentée afin de vérifier si la production de PNIPAM-COOH à plus grande échelle était possible dans ces conditions (figure 3.7, PNI-2). Ainsi, lorsque la quantité de monomère passe de 2 à 15 g (facteur multiplicatif de 7,5), la taille de polymère diminue jusqu'à un  $M_n$  de 22 000 g/mol, avec une légère perte de contrôle ramenant l' $IP$  à 1,26. Il semble donc que l'augmentation des quantités modifie les caractéristiques du polymère obtenu. Le tableau 3.5 résume les résultats obtenus. L'expérience PNI-3, réalisée dans les mêmes conditions que PNI-2, met en avant la répétabilité de la synthèse. La baisse de l' $IP$  jusqu'à 1,09 démontre qu'il est possible d'obtenir des polymères de tailles très contrôlées et que l'expérience acquise par l'expérimentateur est aussi un point impactant.

TABLEAU 3.5 – Résultats de la polymérisation du PNIPAM réalisée dans différentes conditions, en visant 25 000 g/mol.

Echantillon	Volume (mL)	$m_{M_0}$ (g)	$[M_0]$ (mol/L)	$[I_0]$ (mmol/L)	$[CTA_0]$ (mmol/L)	T (°C)	$M_{n_{th}}$ (g/mol)	$M_n^1$ (g/mol)	$IP^2$
PNI-N	5	2	3,5	2,5	-	70	-	100 000	2,17
PNI-1	5	2	3,5	2,5	16,5	70	25 000	26 000	1,19
PNI-2	38	15	3,5	2,5	16,5	70	25 000	22 000	1,26
PNI-3	38	15	3,5	2,5	16,5	70	25 000	24 000	1,09

<sup>1</sup> mesurée par SEC; <sup>2</sup> rapport  $M_w/M_n$

La synthèse d'un PNIPAM-COOH de plus grande taille a aussi été étudiée (figure 3.8). Pour ce faire, un  $M_{n_{th}}$  de 60 000 g/mol a été ciblé. Comme pour le cas précédent, l'ajout de CTA permet de réduire drastiquement l' $IP$  à 1,29 (figure 3.8, PNI-4). Le  $M_n$  associé est lui aussi bien inférieur au  $M_{n_{th}}$ , plafonnant à 35 000 g/mol. Des masses molaires élevées impliquent une viscosité plus importante du milieu et il se peut que l'évacuation thermique soit insuffisante pour maintenir des équilibres efficaces tout au long de la polymérisation (dégradation du CTA, «backbiting») [8, 20]. Lors de l'augmentation des quantités (figure 3.8, PNI-5), la masse finale du polymère est une fois de plus diminuée jusqu'à 22 000 g/mol, équivalent ainsi à PNI-2. Cependant, le contrôle est largement inférieur puisque

### 3.2. SYNTHÈSE DE PNIPAM FONCTIONNALISÉ : CONTRÔLE DE LA LONGUEUR DE CHAÎNE

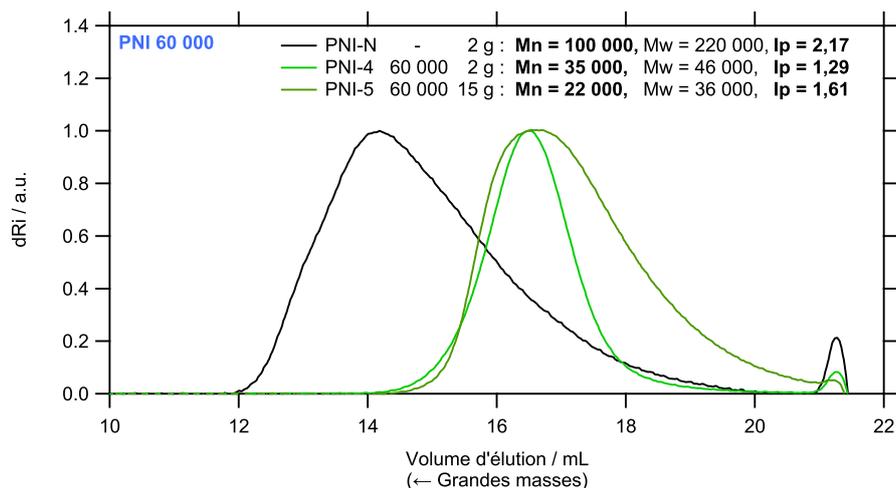


FIGURE 3.8 – Analyse par SEC d’un polymère obtenu dans le THF (noir, PNI-N) à partir de 2 g de monomère, sans présence de CTA, (vert clair, PNI-4) en présence de CTA ( $Mn_{th} = 60\ 000$ ) et (vert foncé, PNI-5) à partir de 15 g de monomère, en présence de CTA ( $Mn_{th} = 60\ 000$ ).

l’IP calculé atteint 1,61. La difficulté pour la polymérisation de s’effectuer dans de bonnes conditions peut s’expliquer une fois encore par la viscosification importante du milieu réactionnel jusqu’à devenir solide. Cette viscosification importante rend difficile la diffusion des espèces et de la température. Des augmentations importantes de la température peuvent alors apparaître, la réaction étant exothermique.

Afin d’atteindre des masses de polymère plus importantes, différentes stratégies ont été employées. Les résultats sont résumés tableau 3.6. Si la limitation des masses obtenues pour PNI-4 et PNI-5 sont dues à des difficultés de diffusion, l’augmentation du volume pourrait, en diminuant la viscosité du milieu, améliorer l’efficacité de réaction. Des synthèses similaires à PNI-4 et PNI-5 ont donc été effectuées dans des volumes de réaction légèrement supérieurs (7 mL et 38 mL), ce qui implique la diminution de la concentration des différents réactifs (PNI-6 et PNI-7). Il apparaît que l’augmentation de volume réduit le contrôle lorsqu’on travaille sur de petites quantités (PNI-6), avec une augmentation de l’IP (1,62) et une diminution de la masse obtenue (29 000 g/mol), en comparaison

TABLEAU 3.6 – Résultats de la polymérisation du PNIPAM réalisée dans différentes conditions, en visant 60 000 g/mol.

Echantillon	Volume (mL)	$m_{M_0}$ (g)	$[M_0]$ (mol/L)	$[I_0]$ (mmol/L)	$[CTA_0]$ (mmol/L)	T (°C)	$Mn_{th}$ (g/mol)	Mn (g/mol)	IP
PNI-N	5	2	3,5	2,1	-	70	-	100 000	2,17
PNI-4	5	2	3,5	2,5	7,0	70	60 000	35 000	1,29
PNI-5	38	15	3,5	2,5	7,0	70	60 000	22 000	1,61
PNI-6	7	2	2,5	1,8	5,0	70	60 000	29 000	1,62
PNI-7	53	15	2,5	1,8	5,0	70	60 000	19 000	1,63
PNI-8	38	15	3,5	1,1	7,0	70	60 000	24 000	1,53
PNI-9	38	15	3,5	1,1	7,0	60	60 000	29 000	1,27

à PNI-4. L'**IP** obtenu lors de la polymérisation de 15 g de monomère (PNI-7, 1,63) est similaire à celui de PNI-5, bien qu'une diminution de la masse moyenne jusqu'à 19 000 g/mol se produise. La polymérisation **RAFT** s'effectue généralement en milieu concentré et il semblerait qu'une concentration des espèces moins importante, bien que limitant la viscosité, déstabilise le mécanisme, comme déjà observé dans la littérature [23].

Enfin, l'influence du ratio initiateur/CTA a aussi été étudiée (PNI-5 et PNI-8). Les quantités sont gardées constantes à l'exception de l'initiateur, avec un ratio  $[CTA_0]/[I_0]$  de 2,8 et de 6,4 pour PNI-5 et PNI-8, respectivement. On notera que pour les expériences ciblant le **PNIPAM** à 20 000 g/mol (PNI-1 à PNI-3), le ratio molaire était d'environ 6, or on sait que ce ratio peut avoir une influence sur le contrôle de la polymérisation [13, 23]. On remarque ici que l'augmentation du ratio jusqu'à 6,4 permet de diminuer l'**IP**, passant de 1,61 pour PNI-5 à 1,53 pour PNI-8. Une quantité plus faible d'initiateur permet en effet d'éviter la formation trop importante de radicaux dans le milieu. Enfin, l'abaissement de la température à 60 °C (PNI-9) permet, en diminuant la cinétique de décomposition de l'initiateur et les phénomènes de «backbiting», d'obtenir un polymère de masse plus importante (29 000 g/mol) avec un **IP** plus bas à 1,27, proche de PNI-4.

Afin d'en apprendre plus les propriétés des polymères synthétisés, deux polymères ont été étudiés plus précisément. PNI-3 est un polymère issu d'une polymérisation bien contrôlée (**IP** = 1,09). Bien qu'avec une taille relativement proche, PNI-7 est quant à lui bien plus polydisperse, avec un **IP** de 1,63. La quantification du nombre de fonctions acides par chaîne de polymère peut apporter des informations sur la différence de contrôle observée, tout en confirmant le caractère fonctionnel de ces polymères, donnée importante pour une potentielle utilisation pour un greffage sur la surface des **PECs**. La figure 3.9 présente le dosage pH-métrique de ces deux polymères par une solution de soude

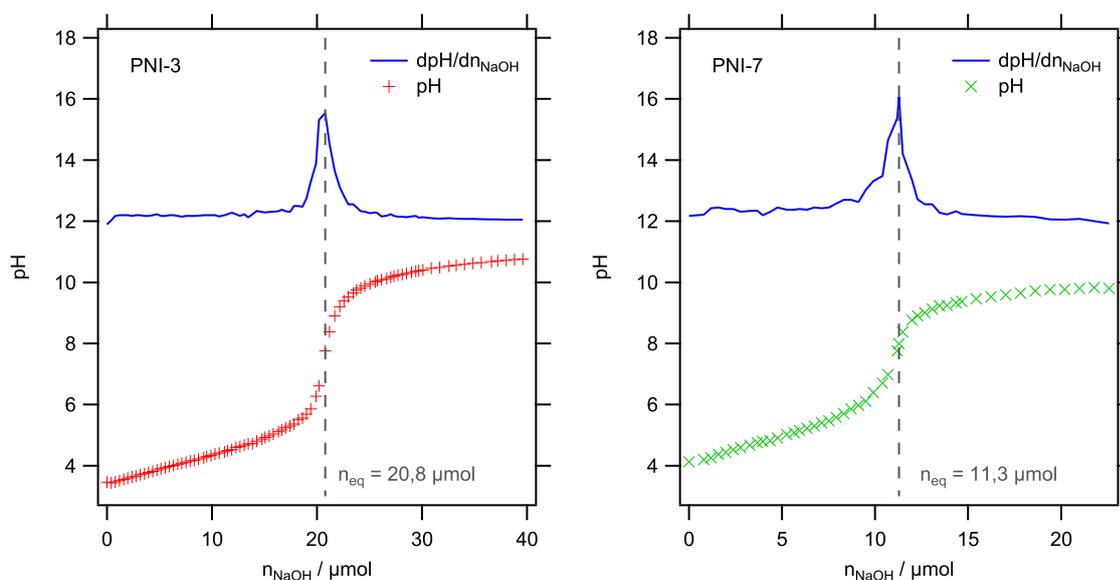


FIGURE 3.9 – Dosages pH-métriques de (gauche) PNI-3 et (droite) PNI-7. En bleu, les dérivées utilisées pour la détermination de l'équivalence.  $m_{pni} \approx 0,5$  g,  $[NaOH] \approx 0,02$  M.

NaOH. Tout d'abord, le pKa mesuré, qui correspond à  $pH_{eq}/2$ , se situe autour de 4. Ce pKa est en cohérence avec le dosage d'acides carboxyliques. La quantité de soude à l'équivalence  $V_{eq}$  correspond au nombre de fonctions R-COOH présentes sur le PNIPAM en solution.

On en déduit la quantité d'acide carboxylique par chaîne de polymère (tableau 3.7, COOH/PNI). Il apparaît alors que PNI-3 porte une fonction carboxylique par chaîne de polymère (COOH/PNI = 1,0). Ce résultat est en accord avec le faible IP obtenu. Le bon contrôle de la polymérisation implique le placement du CTA sur les chaînes actives (addition). La fonction acide est portée par le groupe partant du CTA, communément appelé «R». En se fixant sur une chaîne, le groupe partant peut être éjecté (désactivation de la chaîne par fragmentation). Ce dernier peut alors se fixer sur un monomère pour ré-initier la polymérisation (figure 3.4). En l'absence de recombinaison importante, les chaînes se retrouvent donc fonctionnalisées en leur bout par l'acide carboxylique porté soit par l'initiateur, soit par le groupe partant du CTA [8]. La quantité d'initiateur reste cependant relativement faible en comparaison du CTA, sa présence en bout de chaîne devrait donc être minoritaire. L'augmentation de l'IP s'accompagne d'une diminution du rapport COOH/PNI (tableau 3.7, PNI-7). Avec 0,4 fonction acide par chaîne de polymère, il semble évident que des réactions de recombinaison ou de transfert au solvant ont eu lieu, limitant la fonctionnalisation du PNIPAM. Il se peut toutefois que dans ce cas la proportion des acides en bout de chaîne issus de l'initiateur soit plus importante que pour PNI-3, mais il n'est pas possible de confirmer cette hypothèse. L'utilisation d'un initiateur de formule chimique proche mais non fonctionnalisé par un acide carboxylique pourrait permettre de calculer la contribution de chaque espèce dans la fonctionnalisation du PNIPAM (expérience non réalisée).

TABLEAU 3.7 – Détermination du nombre d'acides carboxyliques par chaîne de PNIPAM (COOH/PNI) à partir de la quantité de soude à l'équivalence  $n_{eq}$ .

	Mn (g/mol)	$m_{PNI}$ (g)	$n_{PNI}$ ( $\mu$ mol)	IP	pKa	$n_{eq}$ ( $\mu$ mol)	COOH/PNI
<b>PNI-3</b>	24 000	0,499 1	20,8	1,09	3,9	11,3	1,0
<b>PNI-7</b>	19 000	0,515 1	27,1	1,63	4,0	20,8	0,4

La faible fonctionnalité de PNI-7 en fait un polymère peu propice à son greffage en surface. Si cela n'a pas été vérifié, la fonctionnalité des polymères synthétisés est probablement d'autant plus faible que l'IP est important. PNI-3 s'avère quant à lui être un polymère fonctionnel portant un acide carboxylique par chaîne de PNIPAM et présentant une taille gravitant autour de 24 000 g/mol relativement monodisperse (IP = 1,09). La spectroscopie RMN, présentée figure 3.10 confirme la structure du PNIPAM et permet de vérifier l'absence de monomère après purification. La double liaison, présente dans le monomère, apparaît en effet normalement autour de 5,5 ppm et n'est pas détectable sur l'échantillon [24]. La bonne purification du polymère est un point important si

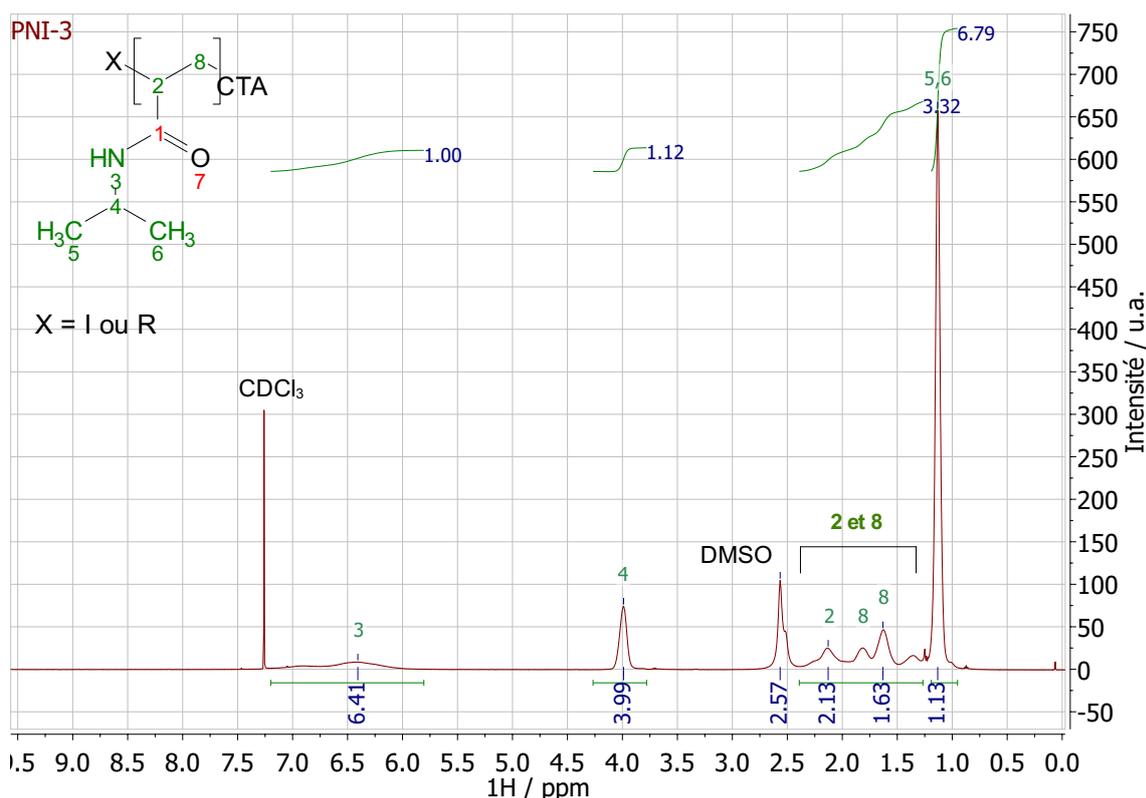


FIGURE 3.10 – Spectroscopie RMN ( $^1\text{H}$ ) de PNI-3. L'absence de double liaison à 5,5 ppm confirme la bonne purification du polymère.

l'on veut l'étudier *in vitro*, le monomère étant cytotoxique [4]. Le THF, solvant nocif, qui présente habituellement deux signaux à 1,8 ppm et 3,6 ppm ne semble pas présent en quantité importante dans le polymère [25]. Du DMSO (2,5 ppm) issu des étapes de purification est cependant présent. Ce solvant non toxique ne présente toutefois pas de risques toxiques importants et sera étudié en tant que milieu de réaction pour le greffage du PNI-PAM dans les sections suivantes. Le polymère a toutefois été séché jusqu'à observer une masse constante afin d'éliminer le maximum de solvant.

Ainsi, PNI-3 sera utilisé pour la fonctionnalisation de surface. En plus d'être un polymère fonctionnel et monodisperse, la taille de ce dernier ( $M_n = 24\ 000\ \text{g/mol}$ ) se situe dans une gamme de longueurs intéressante pour la bioadhésion thermorégulée (estimée à 20 nm une fois greffé [5]), les tailles trop importantes n'étant pas favorables à l'adhésion cellulaire [5, 26]. Afin d'étudier l'influence de la taille de polymère sur les propriétés bioadhésives, ce dernier sera comparé avec un PNIPAM commercial de plus petite taille ( $M_n = 5\ 000\ \text{g/mol}$ ). Ce dernier sera d'ailleurs utilisé, pour des raisons pratiques, pour la mise en place des protocoles de modification chimique des surfaces.

### 3.3 Modifications chimiques

La modification chimique des PEC est une tâche complexe au vu de la nature des surfaces. Les surfaces sont composées d'un mélange entre l'alginate, qui présente des fonctions R-COOH, et le chitosane, qui présente des fonctions R-NH<sub>2</sub>. L'amidification est un procédé de synthèse qui permet de lier des amines sur les acides carboxyliques. Il est alors possible, dans le cas du chitosane, de faire réagir directement un polymère de type PNIPAM-COOH, tel que synthétisé par procédé RAFT dans la section précédente. Dans le cas de l'alginate, il convient de fonctionnaliser par amidification ce dernier par une diamine, afin d'obtenir des amines sur ce polysaccharide qui pourront, lors d'une seconde étape, accueillir le PNIPAM-COOH.

La modification de surfaces complexes reste cependant aventureuse du fait de la difficulté de caractérisation de l'état de surface, comme discuté section 1.4.2.3. Si des techniques telles que l'XPS permettent d'observer l'état de surface sur des épaisseurs nanométriques, la composition du polymère greffé, le PNIPAM, reste proche de celle des polysaccharides, et notamment du chitosane, avec la présence d'oxygène, de carbone et d'azote pour les deux composés. Avant de modifier directement les surfaces de PECs, plusieurs **études préliminaires** ont donc été mises en place. Dans un premier temps, le greffage chimique du PNIPAM a été réalisé **sur des gels** d'alginate et de chitosane, afin de vérifier la faisabilité de l'amidification sur ces polysaccharides par le biais de caractérisations plus aisées que l'XPS (figure 3.11, a). Dans un deuxième temps, la **fonctionnalisation de surfaces de films d'alginate** devrait permettre de projeter la réaction d'amidification sur des surfaces simples. Les substrats d'alginate étant exempts d'azote, la détection de la présence du PNIPAM en surface par XPS devrait être plus aisée que sur des PECs. L'utilisation

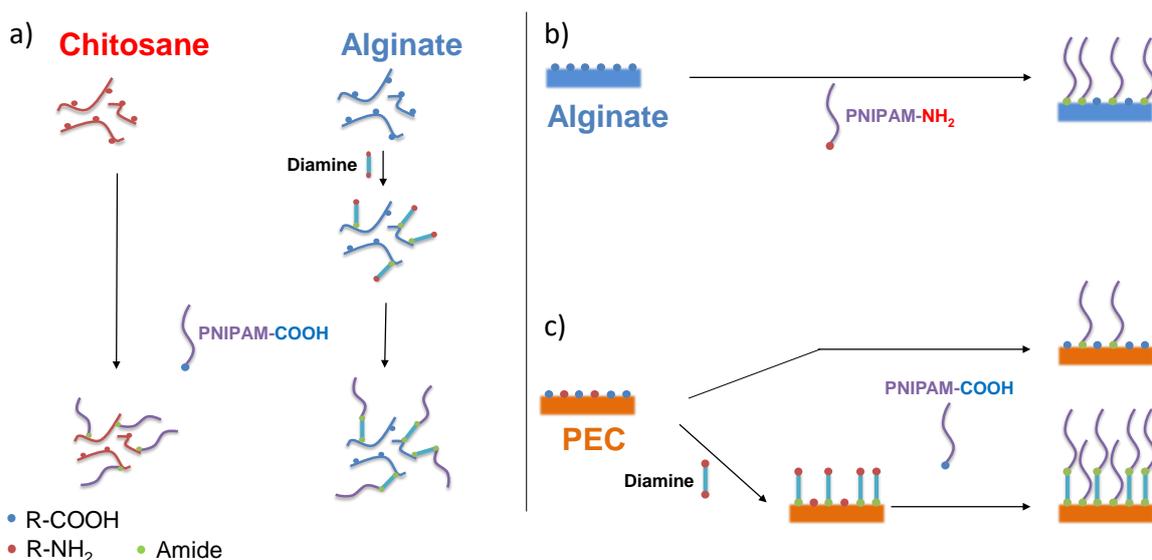


FIGURE 3.11 – Stratégie d'élaboration de la modification de surface : a) l'étude de la modification des gels permettra de vérifier la faisabilité de la synthèse avant b) d'étudier la surface sur une surface simple telle que l'alginate pour finalement c) s'intéresser au greffage à la surface des PECs.



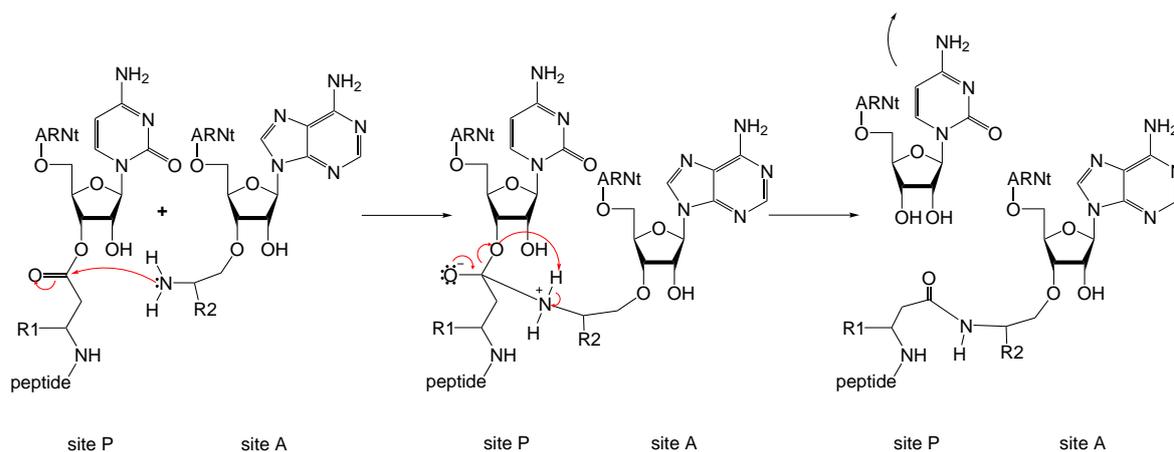


FIGURE 3.13 – Synthèse biochimique des polypeptides par amidification.

avec les ARNt. Un ARN d'initiation est alors au site P qui correspond au premier codon de la séquence codante. Le site A, prochain codon, accueille alors le premier aminoacyl-ARNt. Ce dernier se liera au site de A de manière sélective, de sorte que les bons acides aminés soient utilisés pour la fabrication de la protéine (décodage).

On voit bien dans cet exemple que, outre la nécessité d'une sélectivité importante dans la construction des protéines, l'amidification est un processus qui a besoin d'être catalysé. Pour les organiciens, il va s'agir de développer des voies de synthèses afin de favoriser la formation de l'amide. Il existe de nombreuses solutions, que ce soit par l'utilisation de formes plus réactives telles que les halogénures d'acyle ou l'utilisation d'agents de couplages tels que *1,1'-carbonyldiimidazole* (CDI) ou *N-hydroxysuccinimide* (NHS) / *1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide* (EDC).

### 3.3.1.1 Halogénures d'acyle

La réaction de l'acide carboxylique sur l'amine n'est pas une réaction favorable. Une des stratégies possibles consiste alors à rendre ce groupe fonctionnel plus réactif, on parle alors d'activation de l'acide. En remplaçant l'hydroxyle (-OH) par un meilleur groupe partant, par exemple un halogène, on peut alors rendre la réaction plus efficace. Les halogénures d'acyle sont des composés qui portent un halogène en  $\alpha$  du carbonyle (R-CO-X, figure 3.14). Plus le numéro atomique de l'halogène considéré diminue, plus ce dernier sera électro-négatif (écran-tage électronique), plus l'halogénure d'acyle sera réactif. Classi-

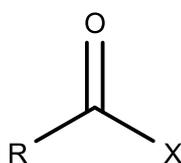


FIGURE 3.14 – Structure chimique d'un halogénure d'acyle, ou X = F, Cl, Br ou I.

quement, on utilise des chlorures d'acyle. Il en est de même pour les bromures, mais dans une moindre mesure, de par leur réactivité plus limitée [27]. Le fluorure d'acyle, très réactif, est parfois utilisé, mais sa toxicité limite son intérêt pour les applications biologiques.

L'utilisation des chlorures d'acyles pour la formation d'amides est donc largement plus répandue et plus aisée. Cette réaction s'effectue en deux étapes. Premièrement, il s'agit de former le chlorure d'acyle à partir de l'acide carboxylique. Pour ce faire, une multitude de réactifs sont utilisés :  $\text{POCl}_3$ ,  $\text{PCl}_5$ ,  $\text{COCl}_2$  ou encore, plus classiquement,  $\text{SOCl}_2$  [27, 29, 30]. Ce dernier composé, le chlorure de thionyle, réagit comme présenté figure 3.15. On remarque que la formation du chlorure d'acyle implique la formation d'acide chlorhydrique. Cet acide peut être problématique, notamment si l'on travaille sur des molécules sensibles comme des polysaccharides. Il existe d'autres précurseurs permettant d'éviter la formation de  $\text{HCl}$ . Par exemple, le chlorure de cyanure peut être utilisé en combinaison avec une base telle que la triéthylamine, maintenant ainsi un pH alcalin. La triphénylphosphine est aussi un précurseur possible qui fonctionne en milieu basique. Simplement, cette réaction nécessite une source de chlore comme le chloroforme, hautement toxique et limitant pour des applications biomédicales.

Quoi qu'il en soit, une fois le chlorure d'acyle formé, il faut alors qu'il réagisse sur l'amine (figure 3.16). Cette fois encore, de l'acide chlorhydrique est généré durant la réaction. Il est d'usage de le piéger avec une base, type triéthylamine. Alternativement, un ajout de pyridine permet de former un sel d'acyle de pyridinium qui va catalyser la réaction et piéger  $\text{HCl}$  [27, 31]. Toutefois, les chlorures d'acyle doivent être utilisés rapidement ou stockés avec précaution : ils sont sensibles à l'eau. De fait, ils sont souvent utilisés dans des solvants organiques secs, compliquant la synthèse, bien que certains auteurs reportent leur utilisation en milieu aqueux [27, 32].

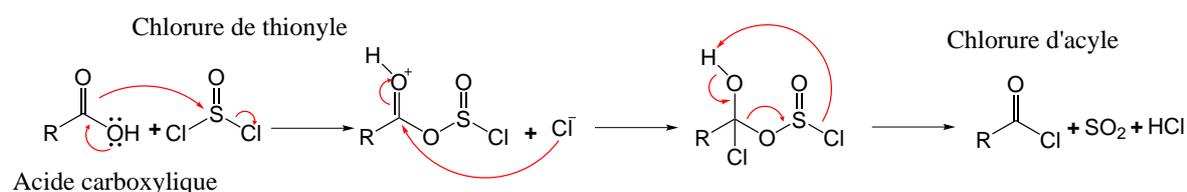


FIGURE 3.15 – Mécanisme d'action du chlorure de thionyle sur l'acide carboxylique. On notera la formation d'acide chlorhydrique.

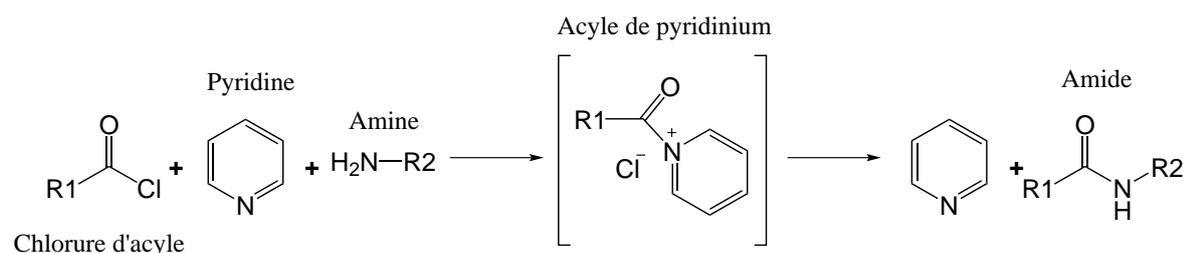


FIGURE 3.16 – Formation de l'amide par action du chlorure d'acyle sur l'amine. L'intermédiaire réactionnel, le sel d'acyle de pyridinium, permet de catalyser la réaction.

Cette voie de synthèse présente le désavantage majeur de devoir employer des conditions drastiques (acides ou basiques) ou bien des composés hautement toxiques. Dans le cas des PECs d'alginate/chitosane, cela engendrerait une possible hydrolyse et donc une perte de contrôle de l'intégrité du matériau [33, 34]. Pour cette raison, des solutions alternatives sont étudiées. Ces dernières emploient alors des agents de couplages.

### 3.3.1.2 Agents de couplage

Un agent de couplage est un composé qui permet, via la formation d'intermédiaires réactionnels réactifs, de favoriser la formation de l'amide. Parmi les nombreux agents existants, on peut citer les sels d'uronium tels que le TBTU<sup>6</sup> ou sa variante le HBTU<sup>7</sup>, les sels d'ammoniums comme le DMTMM<sup>8</sup> ou encore les sels de phosphore comme le BOP<sup>9</sup> [27]. Néanmoins, la plupart de ces agents de couplage nécessitent des conditions assez particulières ou produisent des sous-produits toxiques. D'autres classes d'agents considérés comme moins toxiques existent. C'est le cas des agents EDC et NHS — on parle de couplage NHS/EDC — ou encore le CDI [35, 36]. Leurs faibles toxicités ont promu l'utilisation de ces agents, notamment pour la modification des polysaccharides à potentielle vocation biomédicale [37–42].

#### a) CDI

Le CDI est un composé fréquemment utilisé pour la fonctionnalisation de polysaccharides [27, 43–46]. Le mécanisme d'action de cet agent, présenté figure 3.17, ne forme que des sous-produits non toxiques, à savoir du CO<sub>2</sub> et de l'imidazole, ce qui explique l'intérêt qui lui est porté.

Le CDI n'est pas exclusivement réservé à la formation d'amides et peut ponter différentes fonctions :

- COOH sur NH<sub>2</sub>, via la formation d'une liaison amides R1-CONH-R2 [47]
- NH<sub>2</sub> sur NH<sub>2</sub>, via la formation d'une liaison urée R1-NHCONH-R2 [48]

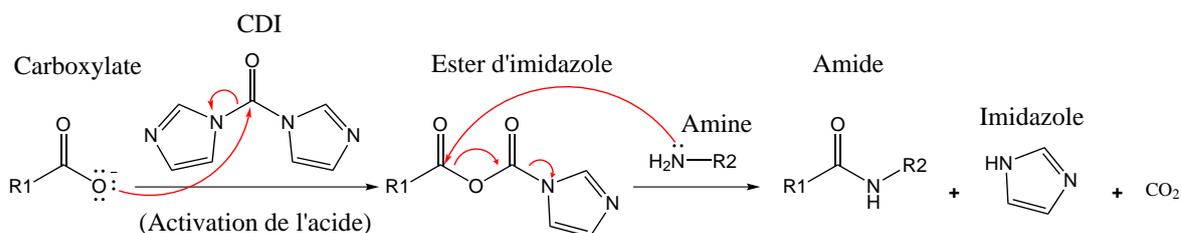


FIGURE 3.17 – Mécanisme d'action du CDI. La formation de l'ester d'imidazole permet d'activer l'acide carboxylique, favorisant la formation de l'amide.

— OH sur NH<sub>2</sub>, via la formation d'une liaison uréthane R1-COONH-R2 [48]

Cette faible sélectivité peut être préjudiciable en conduisant à la formation d'espèces non désirées. Entre autres, la réticulation des amines doit être prise en compte lorsque l'on souhaite former des amides. Dans une procédure typique, l'acide carboxylique (1 eq) et le CDI (1 eq) sont mélangés à 60 °C pour activer l'acide via la formation de l'ester d'imidazole [44]. Cette activation est parfois maintenue pendant 12 H afin de s'assurer que la totalité du CDI ait réagi avant l'ajout de l'amine. Des exemples d'utilisation sur substrats polysaccharides dans la littérature sont présentés dans le tableau 3.8.

TABLEAU 3.8 – Exemples de l'utilisation du CDI sur des polysaccharides.

Matériaux	Conditions	Ref
Gélatine/agarose	DMSO/air	[40]
Chitosane/PEI	liquide ionique	[42]
Cellulose/diamines	toluene/DMF	[48]
Gélatine/gélatine	acétone/eau	[41]

Le CDI ainsi que l'intermédiaire s'hydrolysent en présence d'eau [49]. La réaction se fait donc idéalement dans un solvant anhydre, sous atmosphère contrôlée. Ces conditions contraignantes ainsi que la faible sélectivité de cet agent diminuent son attractivité. Néanmoins, il ne doit pas être exclu du fait de sa faible toxicité ainsi que de son faible coût.

#### b) NHS/EDC

Le couplage NHS/EDC est, tout comme le couplage CDI, un procédé d'amidification considéré comme peu toxique. Le seul sous-produit provient d'EDC et est un dérivé type urée, non toxique [35]. Il n'en demeure pas moins qu'il s'agit probablement de la voie de synthèse la plus utilisée dans le domaine des biomatériaux. Le mécanisme d'action de NHS/EDC est présenté figure 3.18. La réaction peut s'effectuer en milieu organique ou aqueux, auquel cas on préférera utiliser sulfo-NHS et le sel EDC,HCl, hydrosolubles. En pratique, il est possible de n'utiliser qu'EDC et de se passer de la présence de NHS. Cependant, si le complexe formé à partir d'EDC sur l'acide carboxylique peut s'hydrolyser en présence d'eau, l'adjonction de NHS permet de former un intermédiaire plus stable et donc d'améliorer le rendement de réaction [35, 50, 51].

D'un point de vue pratique, la réaction peut se faire à température ambiante, sans précautions particulières. Le pH de la solution doit être idéalement supérieur au pKa de l'acide, car l'anion est plus réactif [50]. L'acide carboxylique est parfois laissé seul quelques minutes avec NHS/EDC avant l'ajout de l'amine, afin d'assurer une bonne activation de ce dernier. Un résumé des utilisations de ce type de couplage est donné tableau 3.9.

Cet agent, tout comme le CDI, est, au vu de sa faible toxicité, attractif pour la modification de surface et sera donc étudié en tant que promoteur de l'amidification entre le PNIPAM et les PECs.

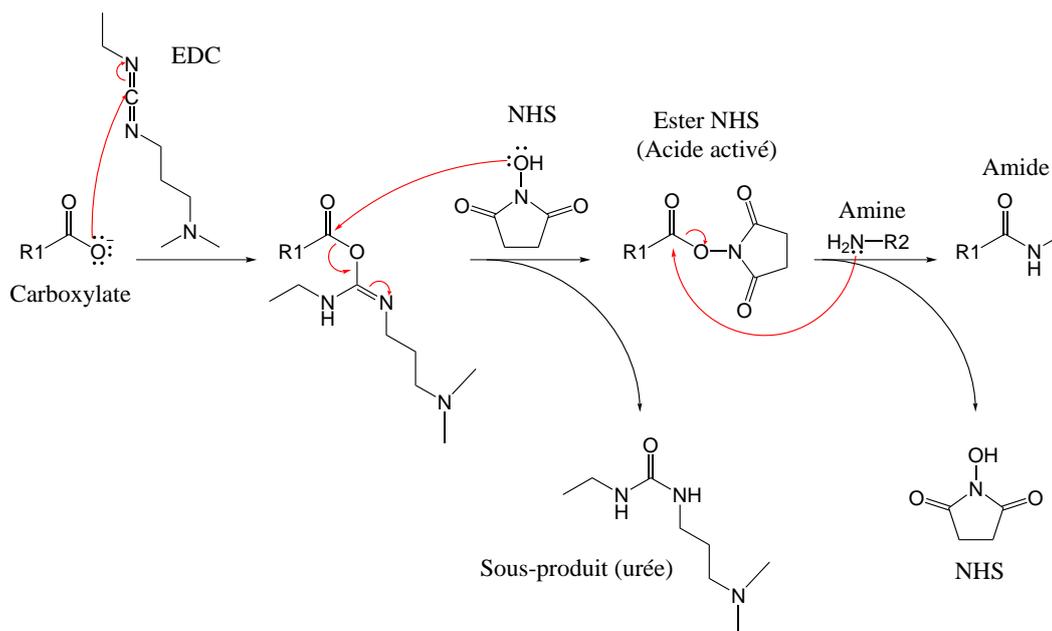


FIGURE 3.18 – Schéma réactionnel du couplage NHS/EDC.

### 3.3.2 Etudes préliminaires

Afin de mettre au point la modification de surface des matrices absorbantes développées dans le chapitre précédent, des études préliminaires portant sur la modification de gels d'alginate et de chitosane ont été réalisées. Ces études sont suivies par la modification de films d'alginate, dont les surfaces sont relativement simples. Ces étapes doivent permettre de définir des conditions favorables à la fonctionnalisation des PECs.

#### 3.3.2.1 Modification chimique des gels : faisabilité du couplage NHS/EDC

Afin d'étudier l'efficacité et les conditions favorables au couplage NHS/EDC, le greffage de PNIPAM sur des gels de chitosane et d'alginate a été étudié (figure 3.19). Le travail sur des gels permet, à l'inverse de la modification de surface, de caractériser de manière simple l'efficacité de l'amidification. Pour des raisons pratiques, le PNIPAM utilisé est commercial et présente un Mn de 5 000 g/mol<sup>10</sup>. Il s'agit avant tout de déterminer l'impact du choix du solvant ainsi que des conditions de pH sur la réaction. Le choix du solvant est en effet un paramètre important pour les modifications de surface ultérieures et un solvant organique permettrait de s'affranchir des phénomènes de gonflement de la matrice alginate / chitosane. La réaction d'amidification par couplage NHS/EDC est possible à la fois en milieu aqueux et en milieu organique.

10. Données fournisseur.

TABLEAU 3.9 – Exemples de l'utilisation du couple NHS/EDC.

Acide carboxylique	Amine	NHS	EDC	Solvant	Activation	Ref
CTA - 50 mg (0,13 mmol)	PolyHIPE-NH <sub>2</sub> - 100 mg	15 mg (0,13 mmol)	26 mg (0,13 mmol)	DMF/EtOH	-	[12]
CNC - 50 mg	Proparfyamine - 60 µL	72 mg (0,62 mmol)	120 mg (0,6 mmol)	MES pH4	-	[52]
MDT - 38 mg (0,104 mmol)	NH <sub>2</sub> -PEG-NH <sub>2</sub> - 152 mg	12,9 mg (0,110 mmol)	21,5 mg (0,111 mmol)	DMF	3 H	[53]
PNIPAM-COOH - 5 g	Chitosane - 0,1 à 0,5 g	1 375,3 mg (11,92 mmol)	458,2 mg (2,29 mmol)	MES pH5	-	[37]
PNVCL-COOH	Chitosane	1 eq	2 eq	0,5 % AcOOH	-	[54]
Collagène - 1 eq	Collagène - 1 eq	5 eq	5 eq	MES acide ou basique	-	[55]
PMA	Collagène	-	-	MES acide ou basique	10 min	[51]
Au-COOH	Protéine	0,05 M	0,2 M	Eau	7 min	[56]
Cellulose-COOH	Cellulose-NH <sub>2</sub>	60 mM	50 mM	phosphate de potassium pH5	30 min	[57]

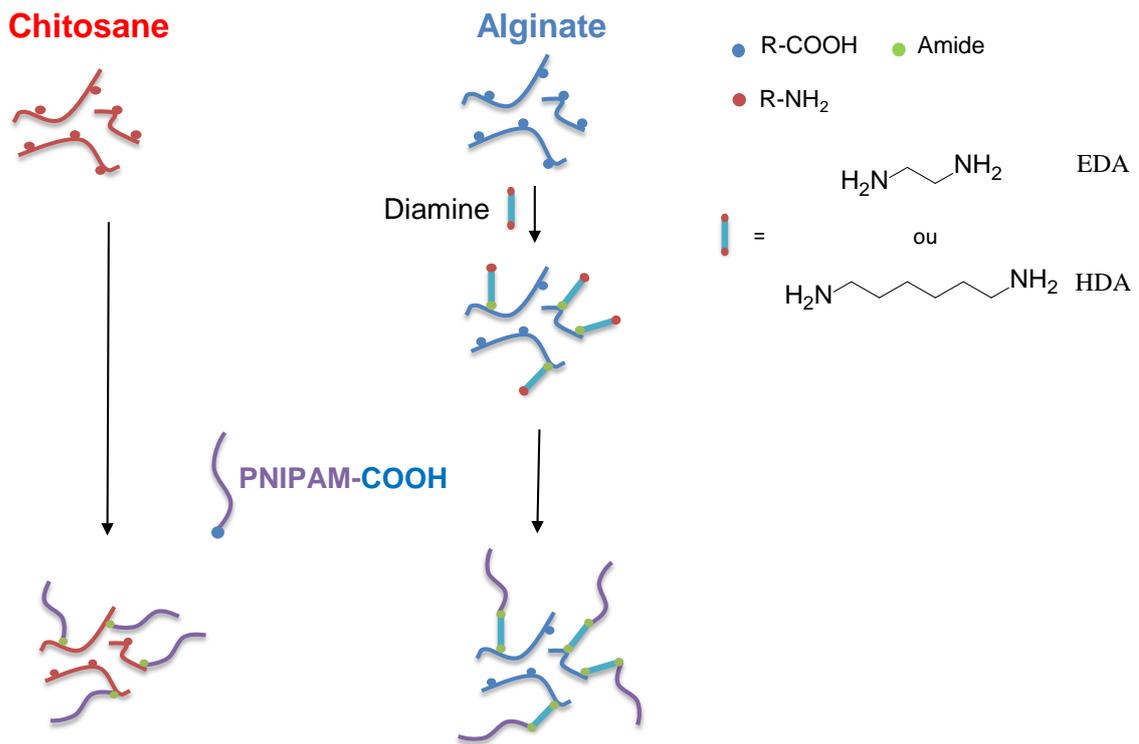


FIGURE 3.19 – Greffage du PNIPAM sur des gels d'alginate et de chitosane via la formation d'amides.

Dans la littérature, la solution est parfois tamponnée [50, 51, 55]. L'impact d'une solution tampon sera donc évalué afin de vérifier si son utilisation permettrait une augmentation du rendement de couplage, en comparaison avec un milieu aqueux simple. Enfin, le DMSO, qui n'entraîne pas le gonflement des matrices PECs est un solvant qui faciliterait une modification uniquement en surface tout en empêchant le délitement de la matrice pendant le traitement. Son utilisation en tant que solvant de réaction sera donc aussi étudiée.

Dans le cadre de l'alginate, deux diamines de longueurs différentes, l'*éthylènediamine* (EDA) et la *1,6-hexanediamine* (HDA), ont de plus été comparées.

#### a) Modification des gels de chitosane

Pour s'assurer de la faisabilité du couplage NHS/EDC sur notre système, des gels de chitosane (1,5 % m/v) ont été modifiés avec du PNIPAM-COOH ( $M_n = 5000$  g/mol) via le couplage NHS/EDC (figure 3.20). La réaction se fait en deux étapes. Brièvement, du PNIPAM-COOH est mis à réagir avec les agents NHS/EDC avant d'être ajouté à des milieux contenant du chitosane, qui porte des amines. Cette réaction a été effectuée dans 3 milieux différents : H<sub>2</sub>O, solution tampon ou DMSO.

Pour H<sub>2</sub>O, le chitosane est solubilisé dans un milieu légèrement acide. Lorsque le mi-

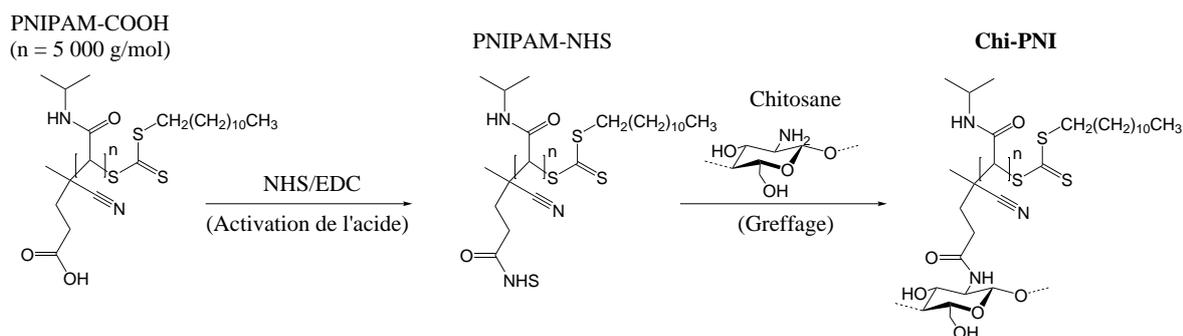


FIGURE 3.20 – Modification chimique du chitosane par du PNIPAM-COOH ( $M_n = 5000$ ) via amidification NHS/EDC.

lieu est tamponné, la formation de PNIPAM-NHS est réalisée à pH 6 (tampon *acide 2-(N-morpholino)éthanesulfonique (MES)*), l'ajout sur l'amine du chitosane se fait ensuite à pH 7,4 (*tampon phosphate salin (PBS)*). En effet, la formation de l'ester NHS (PNIPAM-NHS) est généralement effectuée à un pH supérieur au pKa de l'acide carboxylique, afin qu'il soit sous forme anionique, plus réactive [50]. Lors de l'ajout de l'amine, ici portée par le chitosane, rehausser le pH permet de s'assurer de la déprotonation, au moins partielle, de cette dernière pour libérer un doublet non-liant réactif. Dans tous les cas, l'activation de l'acide du PNIPAM-COOH est maintenue pendant 3 H. Après ajout sur le chitosane, l'amidification est maintenue pendant 12 H. Les conditions réactionnelles sont récapitulées tableau 3.10.

Après réaction, les gels sont dialysés pendant 3 jours sur une membrane 12 000 g/mol afin d'éliminer le PNIPAM-COOH n'ayant pas réagi. Ils sont ensuite lyophilisés puis analysés par FTIR. Les résultats sont présentés figure 3.21. Le PNIPAM présente des bandes caractéristiques, avec notamment le signal des amides I à  $1624\text{ cm}^{-1}$  (principalement élongation C=O) et des amides II à  $1535\text{ cm}^{-1}$  (déformation N-H) [37, 58–60]. L'élongation des N-H est aussi présente à  $3300\text{ cm}^{-1}$ . On retrouve ces bandes caractéristiques sur les trois chitosanes modifiés (Chi-PNI-Eau, Chi-PNI-Tampon et Chi-PNI-DMSO). Certaines

TABEAU 3.10 – Conditions expérimentales pour le greffage de PNIPAM-COOH sur des gels de chitosane, dans différents solvants. Dans le cas du tampon, le pH est fixé à 6 (MES) lors de l'activation de l'acide, puis à 7 (PBS) lors de l'ajout du chitosane. Dans tous les cas, l'activation de l'acide est maintenue pendant 3 H. Après ajout du chitosane, l'amidification est maintenue pendant 12 H.

Echantillon	Solvant	$m_{\text{PNI}}$ (mg)	$n_{\text{COOH}}^1$ ( $\mu\text{mol}$ )	$m_{\text{Chi}}$ (mg)	$n_{\text{NH}_2}^2$ ( $\mu\text{mol}$ )	$n_{\text{EDC}}$ ( $\mu\text{mol}$ )	$n_{\text{NHS}}$ ( $\mu\text{mol}$ )
Chi-PNI-Eau	eau <sup>3</sup>	100	20 (1 eq)	100	400 (10 eq)	80 (4 eq)	40 (2 eq)
Chi-PNI-Tampon	Tampon <sup>4</sup>	100	20 (1 eq)	100	400 (10 eq)	80 (4 eq)	40 (2 eq)
Chi-PNI-DMSO	DMSO	100	20 (1 eq)	100	400 (10 eq)	80 (4 eq)	40 (2 eq)

<sup>1</sup> en considérant une fonction COOH par chaîne de PNIPAM;

<sup>2</sup> en considérant un DA de 0,25 % pour le chitosane;

<sup>3</sup> le chitosane est solubilisé dans un milieu légèrement acide (0,34 % AcOOH);

<sup>4</sup> eau tamponnée MES, pH 6, puis PBS, pH 7,4

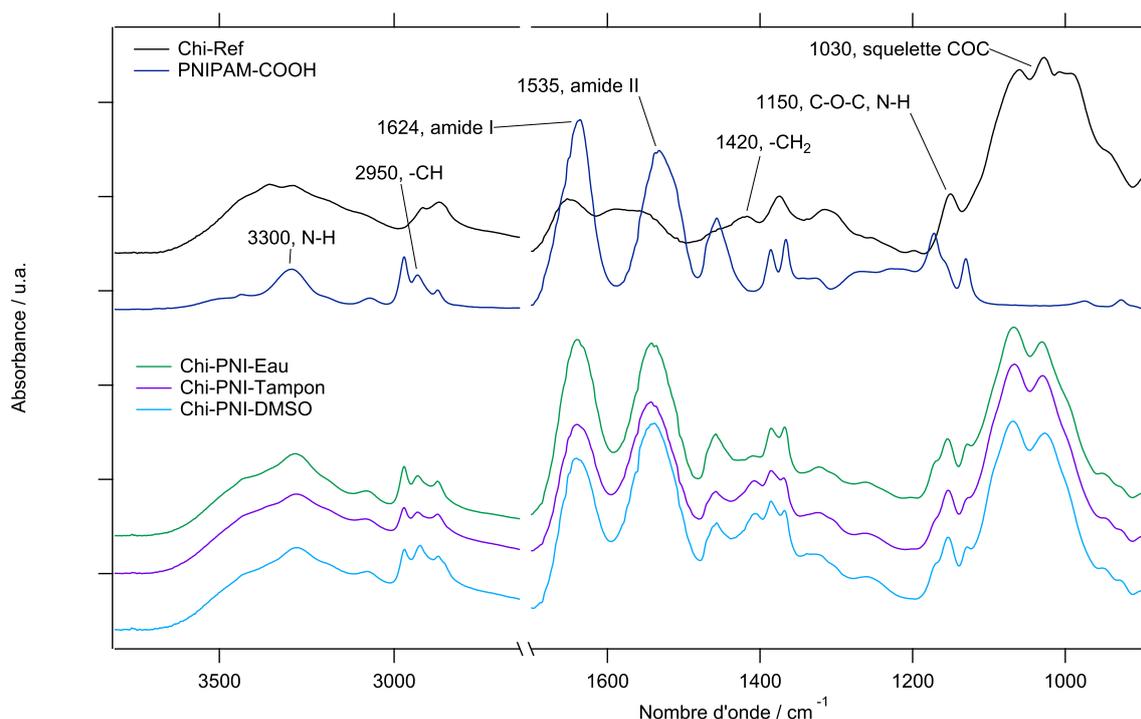


FIGURE 3.21 – Spectres FTIR du (haut, noir) gel de chitosane initial, (haut, bleu) du PNIPAM et des gels modifiés dans (bas, vert) l'eau, (bas, rouge) un tampon et (bas, violet) du DMSO.

de ces bandes recouvrent les signaux du chitosane, on remarque cependant la présence des bandes caractéristiques des polysaccharides : élongation antisymétrique des C-O-C et symétrique des N-H à  $1150\text{ cm}^{-1}$  et la bande de vibration du squelette C-O-C autour de  $1030\text{ cm}^{-1}$  [61, 62]. La présence d'un signal à  $1420\text{ cm}^{-1}$ , assigné à la déformation des  $-\text{CH}_2$ , est aussi une signature du chitosane. La modification semble donc avoir fonctionné, peu importe le choix du solvant. Il est toutefois difficile de déterminer les proportions de chitosane/PNIPAM-COOH par analyse infrarouge.

L'analyse calorimétrique différentielle (DSC) permet de mesurer le dégagement ou l'absorption de chaleur lors d'une montée ou descente en température. La transition du PNIPAM étant endothermique, la transition de la LCST est observable par cette méthode. La quantification de l'énergie absorbée lors de la transition permet ainsi d'estimer la quantité de PNIPAM dans un matériau [6, 54, 63]. L'analyse reste cependant délicate. Pour cause, la nécessité de travailler en milieu aqueux, avec une concentration en gel greffé suffisante pour que la transition LCST soit détectable. Le travail en concentration élevée est difficile avec des gels du fait de leurs viscosités importantes. Toutefois, la transition à la LCST étant une transition hydrophile/hydrophobe, elle s'accompagne lors de la montée en température d'une précipitation (figure 3.22). Cette précipitation peut être quantifiée par des méthodes optiques telles que la diffusion de lumière dynamique (DLS) [63]. Néanmoins, la méthode la plus simple pour essayer d'estimer la quantité de PNIPAM d'un gel reste la mesure de l'absorbance à une longueur d'onde donnée [37]. La précipitation du gel entraîne en effet une augmentation de la turbidité, et la comparaison de cette aug-

mentation doit permettre de déterminer quels gels contiennent une plus grande proportion de PNIPAM.

La figure 3.23 présente les mesures d'absorbance de gels de chitosane greffés PNIPAM (Chi-PNI-Eau, Chi-PNI-Tampon et Chi-PNI-DMSO) en comparaison à une référence de chitosane n'ayant subi aucun traitement (Chi-Ref). Chi-Ref ne montre pas de différence significative entre son absorbance à 25 °C et à 50 °C, avec des absorbances inférieures à 0,04. Une différence importante s'observe pour tous les autres échantillons, avec des absorbances à température ambiante très faibles (inférieurs à 0,32) qui augmentent au passage de la LCST. Réalisé en milieu aqueux, Chi-PNI-Eau montre en effet une nette augmentation de la turbidité à 50 °C ( $A = 0,41$ ), caractéristique d'une précipitation. Il



FIGURE 3.22 – A gauche, un gel greffé PNIPAM à température ambiante et, à droite, chauffé à 50 °C.

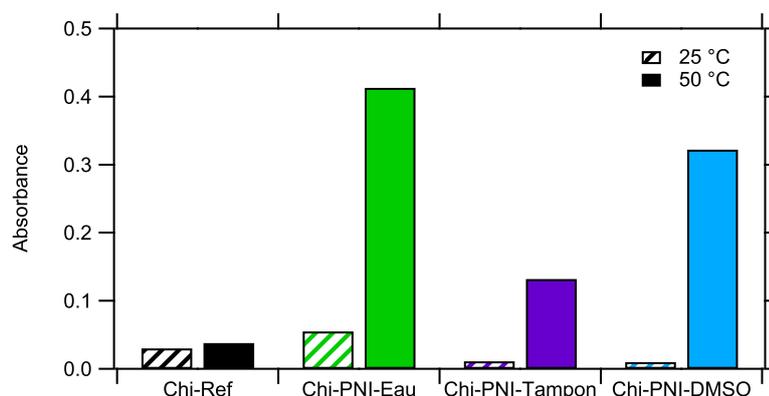


FIGURE 3.23 – Etude spectroscopique (470 nm) de l'absorbance des différents gels de chitosane (1 mg/mL) greffés, en dessous (rayures) et au-dessus (plein) de la LCST du PNIPAM. Hormis pour les références, les spectres sont normalisés sur la contribution du squelette COC du chitosane à  $1030\text{ cm}^{-1}$ .

est à noter que pour cet échantillon, le chitosane est solubilisé dans une solution légèrement acide. L'augmentation de l'absorbance est moins importante pour Chi-PNI-Tampon. L'ajout du PNIPAM activé, PNIPAM-NHS, sur le chitosane se fait à pH 7,4. A ce pH, le chitosane n'est pas soluble et reste sous forme de particules. Les fonctions amines sont alors moins accessibles et la quantité de PNIPAM sur le gel final s'en trouve considérablement réduite. L'absorbance à 50 °C est d'environ 0,32 pour Chi-PNI-DMSO. Le chitosane n'est pas non plus soluble dans le DMSO, mais il semble que l'efficacité du greffage soit tout de même plus propice dans ce solvant que dans le tampon.

La réaction d'amidification du PNIPAM-COOH sur le chitosane semble être efficace, quel que soit le milieu utilisé. L'utilisation d'une solution tampon diminue le rendement, du fait d'un pH trop élevé qui empêche la solubilisation du chitosane. Enfin, **la réaction dans le DMSO semble être possible**, ce qui faciliterait la modification de surface des PECs.

#### b) Modification des gels d'alginate :

De la même manière que pour le chitosane, le greffage de PNIPAM sur des gels d'alginate a été réalisé. La synthèse se fait ici en deux réactions, puisqu'il faut apporter des groupements amines sur la surface d'alginate afin de former Alg-NH<sub>2</sub> avant de pouvoir coupler le PNIPAM-COOH (figure 3.24). Pour ce faire, un couplage NHS/EDC mettant en jeu une diamine a été envisagé. Plus précisément, deux diamines ont été étudiées : l'éthylène diamine (EDA) et l'hexane diamine (HDA). Les conditions expérimentales pour

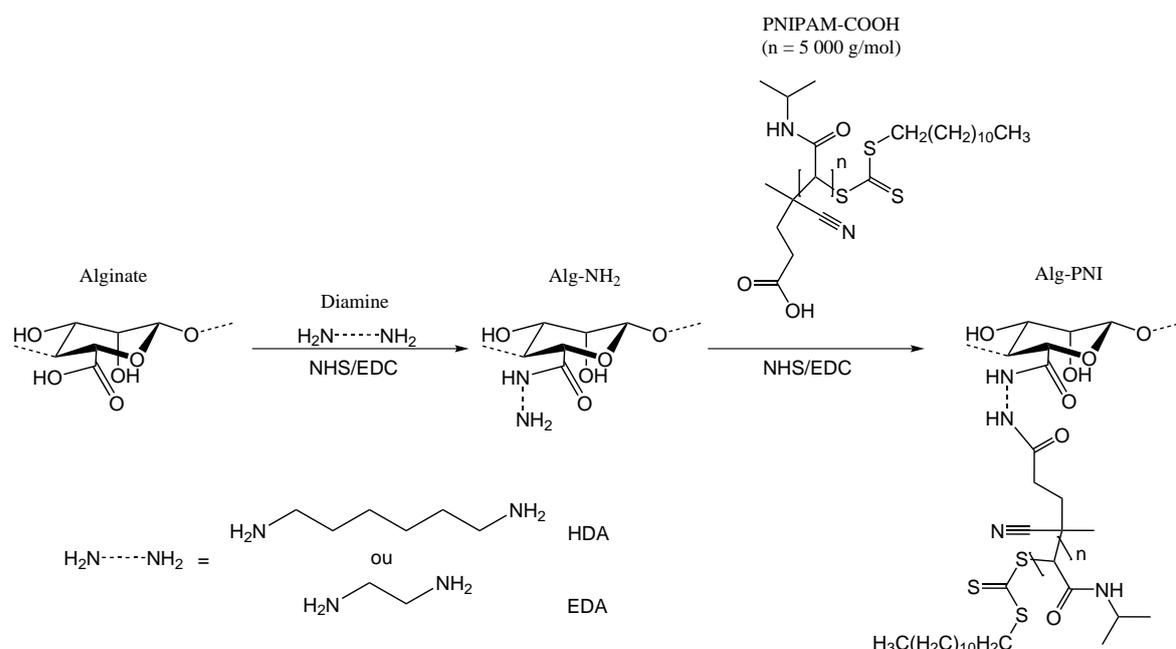


FIGURE 3.24 – Modification chimique des gels d'alginate : une première étape consiste à greffer une diamine (HDA ou EDA) afin de fournir des amines disponibles pour le greffage du PNIPAM-COOH (Mn = 5 000 g/mol) par amidification NHS/EDC.

le greffage de la diamine sont présentées tableau 3.11. Ces deux diamines sont de tailles différentes, et l'on peut supposer que l'HDA, plus long, permettrait une meilleure attaque des fonctions COOH de l'alginate. Il présenterait de plus une disponibilité de ses fonctions amines libres plus grande lors du greffage du PNIPAM-COOH. Avec une liberté conformationnelle plus importante, cette molécule serait cependant plus à même de ponter, c'est à dire à doublement réagir sur l'alginate, rendant inactives toutes ses fonctions amines pour la deuxième étape. Pour pallier cette éventualité, la diamine est utilisée en large excès afin de favoriser une monosubstitution et d'éviter ces phénomènes de pontage. Les conditions réactionnelles pour le greffage de PNIPAM-COOH sur Alg-NH<sub>2</sub> sont résumées tableau 3.12. Pour les deux étapes, les protocoles sont similaires à ceux utilisés pour le chitosane : l'activation de l'acide se fait pendant 3 H puis la réaction sur l'amine est maintenue 12 H.

Les étapes de synthèse ont d'abord été réalisées dans l'eau, sans tampon (figure 3.25).

TABLEAU 3.11 – Première étape : conditions expérimentales pour le greffage de la diamine sur des gels d'alginate pour former Alg-NH<sub>2</sub>, dans différents solvants. Dans le cas du tampon, le pH est fixé à 6 (MES) lors de l'activation de l'acide, puis à 7 (PBS) lors de l'ajout de la diamine. Dans tous les cas, l'activation de l'acide est maintenue pendant 3 H. Après ajout de la diamine, l'amidification est maintenue pendant 12 H.

Echantillon	Solvant	Diamine	n <sub>NH<sub>2</sub></sub> (mmol)	m <sub>Alg</sub> (mg)	n <sub>COOH</sub> <sup>1</sup> (μmol)	n <sub>EDC</sub> (μmol)	n <sub>NHS</sub> (μmol)
Alg-EDA0.5-Eau	Eau	EDA	40 (40 eq)	150	860 (1 eq)	1 600 (2 eq)	860 (1 eq)
Alg-EDA-Eau	Eau	EDA	166 (200 eq)	150	860 (1 eq)	1 600 (2 eq)	860 (1 eq)
Alg-HDA0.5-Eau	Eau	HDA	40 (40 eq)	150	860 (1 eq)	1 600 (2 eq)	860 (1 eq)
Alg-EDA-Tampon	Tampon <sup>2</sup>	EDA	166 (200 eq)	150	860 (1 eq)	1 600 (2 eq)	860 (1 eq)
Alg-EDA-DMSO	DMSO	EDA	166 (200 eq)	150	860 (1 eq)	1 600 (2 eq)	860 (1 eq)

<sup>1</sup> portés par l'alginate; <sup>2</sup> eau tamponnée MES, pH 6 puis PBS, pH 7,4

TABLEAU 3.12 – Deuxième étape : conditions expérimentales pour le greffage du PNIPAM-COOH sur des gels Alg-NH<sub>2</sub>, dans différents solvants pour former Alg-PNI. Dans le cas du tampon, le pH est fixé à 6 lors de l'activation de l'acide, puis à 7 lors de l'ajout de Alg-NH<sub>2</sub>. Dans tous les cas, l'activation de l'acide est maintenue pendant 3 H. Après ajout de Alg-NH<sub>2</sub>, l'amidification est maintenue pendant 12 H.

Echantillon	Solvant	Diamine	m <sub>PNI</sub> (mg)	n <sub>COOH</sub> <sup>1</sup> (μmol)	n <sub>EDC</sub> (μmol)	n <sub>NHS</sub> (μmol)
Alg-EDA0.5-PNI-Eau	Eau	EDA	150	30 (1 eq)	130 (4 eq)	90 (3 eq)
Alg-EDA-PNI-Eau	Eau	EDA	150	30 (1 eq)	130 (4 eq)	90 (3 eq)
Alg-HDA0.5-PNI-Eau	Eau	HDA	150	30 (1 eq)	130 (4 eq)	90 (3 eq)
Alg-EDA-PNI-Tampon	Tampon <sup>2</sup>	EDA	150	30 (1 eq)	130 (4 eq)	90 (3 eq)
Alg-EDA-PNI-DMSO	DMSO	EDA	150	30 (1 eq)	130 (4 eq)	90 (3 eq)

<sup>1</sup> en considérant une fonction COOH par chaîne de PNIPAM;

<sup>2</sup> eau tamponnée MES, pH 6 puis PBS, pH 7,4

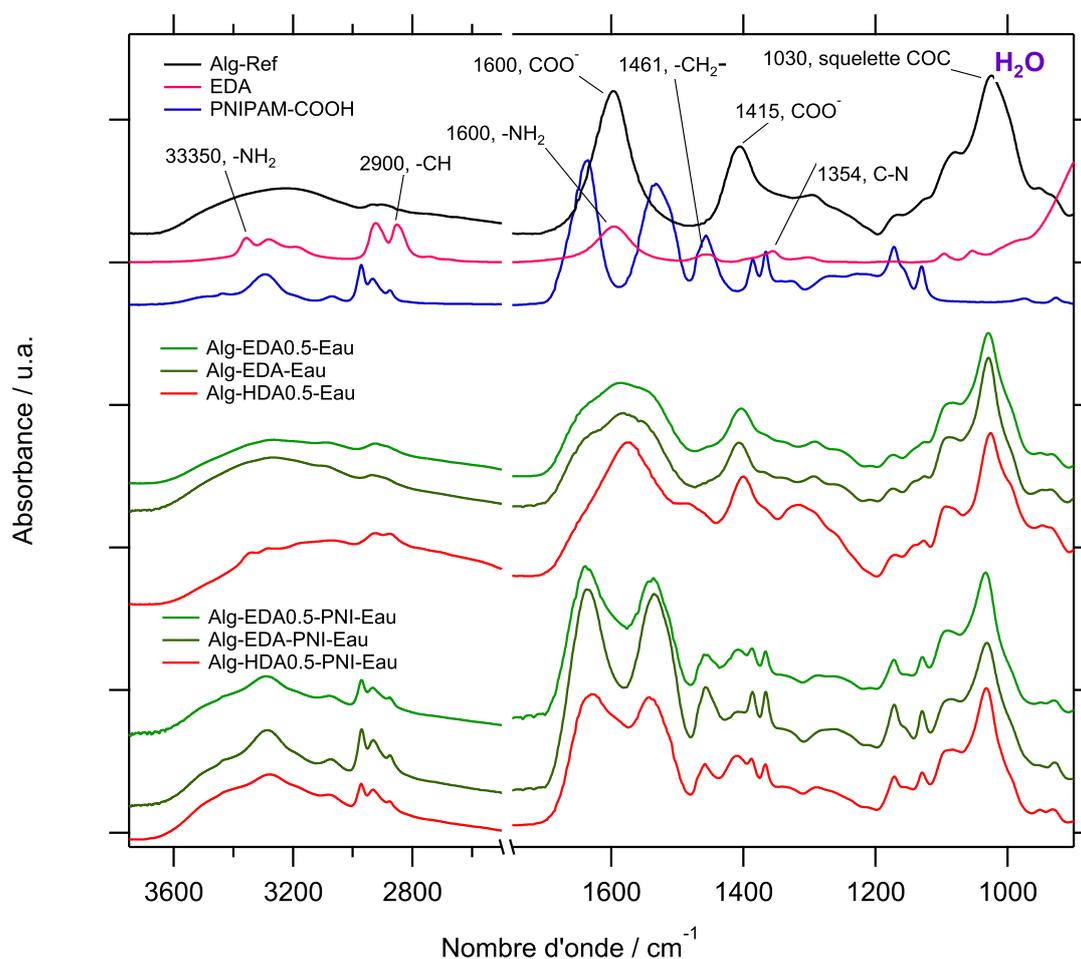


FIGURE 3.25 – Spectres FTIR des gels d'alginate modifiés dans l'eau.

L'EDA se caractérise par la présence de plusieurs bandes d'élongation  $\text{-NH}_2$  ( $3350 \text{ cm}^{-1}$ ), deux bandes  $\text{-CH}$  ( $2900 \text{ cm}^{-1}$ ) et de la déformation des  $\text{-NH}_2$  ( $1600 \text{ cm}^{-1}$ ) [64–66]. Le spectre infrarouge de l'HDA, non présenté, présente des signaux caractéristiques équivalents à l'EDA. La bande à  $1600 \text{ cm}^{-1}$  est aussi présente sur le spectre de l'alginate et est attribuée aux élongations  $\text{COO}^-$  [61]. Les bandes de l'EDA (et de l'HDA) à  $3350 \text{ cm}^{-1}$  sont plus fines et définies que celles de l'alginate et peuvent être un indice de la présence d'EDA (ou HDA) sur le polysaccharide. On remarque alors que ce motif est présent sur les spectres Alg-HDA0.5-Eau, Alg-EDA0.5-Eau, et Alg-EDA-Eau. En outre, on remarque un élargissement de la bande à  $1600 \text{ cm}^{-1}$ . Cet élargissement est probablement dû à l'apparition des signaux des amides I ( $1660 \text{ cm}^{-1}$ ) et amides II ( $1560 \text{ cm}^{-1}$ ) du fait de la réaction d'amidification. Ces signaux pourraient cependant être dus à la présence d'eau ou d'amines protonées. Ces modifications de signaux semblent tout de même indiquer la présence de la diamine sur le gel. De plus, on remarque qu'une quantité d'EDA plus importante (Alg-EDA-Eau) ne semble pas augmenter la quantité d'EDA greffé sur le chitosane si l'on regarde l'intensité des épaulements amides I ( $1660 \text{ cm}^{-1}$ ) et amides II ( $1560$

$\text{cm}^{-1}$ ). La quantité de diamine utilisée pour Alg-HDA0.5-Eau et Alg-EDA0.5-Eau, déjà en large excès, permet donc à priori de saturer les fonctions carboxyliques de l'alginate. La deuxième étape consiste à greffer le PNIPAM-COOH sur l'alginate- $\text{NH}_2$ . On remarque dans tous les cas la présence caractéristique des amides I et II ( $1624 \text{ cm}^{-1}$  et  $1535 \text{ cm}^{-1}$ , respectivement). Le triplet associé au -CH ( $2950 \text{ cm}^{-1}$ ) se reporte aussi sur les spectres, ce qui démontre la présence du PNIPAM-COOH. En outre, la quantité de polymère greffée semble être légèrement influencée par la quantité d'EDA utilisée (Alg-EDA0.5-PNI-Eau et Alg-EDA-PNI-Eau) au vu de l'intensité des bandes amides légèrement plus importante pour Alg-EDA-PNI. Les fonctions carboxyliques de l'alginate ne sont donc peut-être pas saturées dans le cas de Alg-EDA0.5-Eau, ce qui conduit à un greffage de PNIPAM-COOH légèrement inférieur.

Afin de voir si l'utilisation d'un tampon améliorerait sensiblement le rendement de synthèse, de l'alginate a été modifié selon la même méthode en prenant l'EDA comme di-

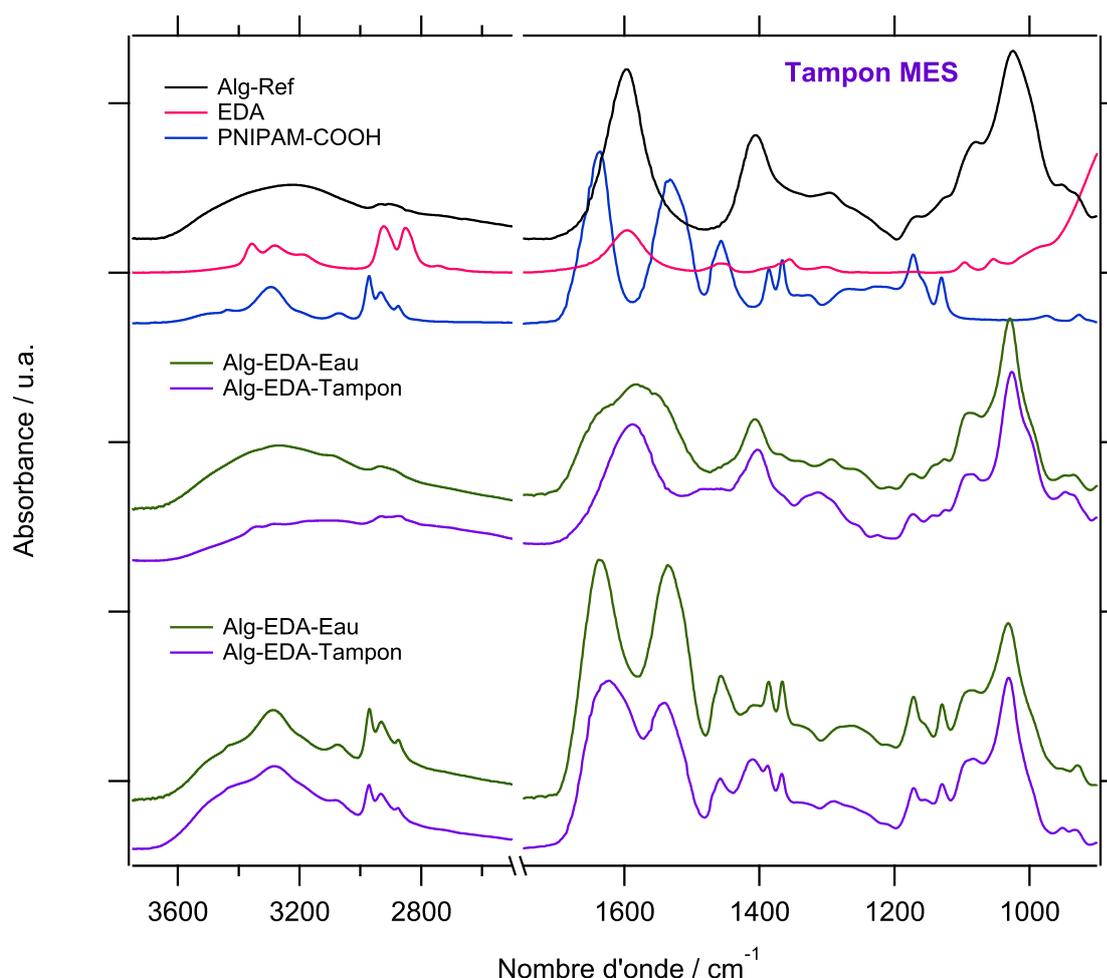


FIGURE 3.26 – Spectres FTIR des gels d'alginate modifiés dans un tampon (Alg-EDA-Tampon et Alg-EDA-PNI-Tampon), comparé à la réaction faite dans l'eau (Alg-EDA-Eau et Alg-EDA-PNI-Eau). L'activation de l'acide se fait à pH 6 (MES), tandis que le greffage sur l'amine se fait à pH 7,4 (PBS). Hormis pour les références, les spectres sont normalisés sur la contribution du squelette COC de l'alginate à  $1030 \text{ cm}^{-1}$ .

amine (figure 3.26). Sur le spectre de Alg-EDA-Tampon, on retrouve les bandes de l'EDA à  $3350\text{ cm}^{-1}$  (élongation  $\text{NH}_2$ ). Un épaulement ( $1360\text{ cm}^{-1}$ ), présent sur le spectre de l'EDA, apparait aussi et est associé à l'élongation C-N. Ces éléments indiquent la présence de l'EDA sur l'alginate. La bande à  $1600\text{ cm}^{-1}$  (amines et carboxylates) n'est cependant que peu affectée par le greffage, ce qui peut être signe d'un meilleur contrôle de la protonation des fonctions amines grâce au tampon. On retrouve tout de même un léger épaulement à  $1640\text{ cm}^{-1}$ , amide I. Après la deuxième étape, on retrouve bien les signaux caractéristiques du PNIPAM, et la quantité de PNIPAM-COOH greffée semble équivalente à celle obtenue sans tampon (Alg-EDA-PNI-Eau). **Le tamponnage de la solution n'est donc, dans ces conditions, pas nécessaire.**

Les mêmes expériences ont été menées dans le DMSO. Le DMSO est en effet un non-solvant pour les matrices PECs à base d'alginate/chitosane. Cela permettrait ainsi de s'affranchir des éventuels problèmes de gonflement et de fragilité du matériau sous forme de films lors de la réaction dans un milieu aqueux. Les résultats FTIR sont présentés fi-

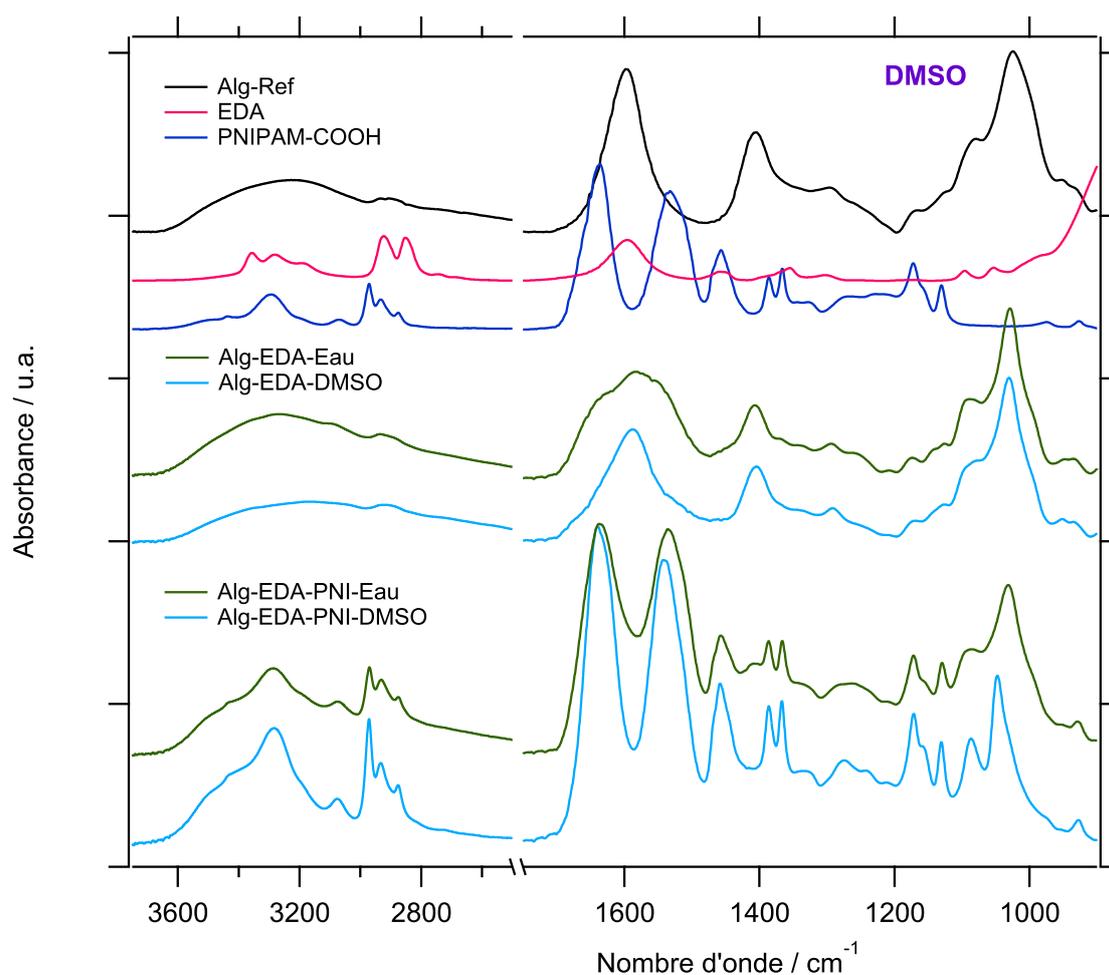


FIGURE 3.27 – Spectres FTIR des gels d'alginate modifiés dans du DMSO (Alg-EDA-DMSO et Alg-EDA-PNI-DMSO), comparé à la réaction faite dans l'eau (Alg-EDA-Eau et Alg-EDA-PNI-Eau). Hormis pour les références, les spectres sont normalisés sur la contribution du squelette COC de l'alginate à  $1030\text{ cm}^{-1}$ .

gure 3.27. Pour le greffage de l'EDA, on observe alors une augmentation des signaux -CH ( $2900\text{ cm}^{-1}$ ), des épaulements autour de  $1600\text{ cm}^{-1}$  pouvant être associés à la présence d'amines et amides (Alg-EDA-DMSO). Enfin, on peut noter l'apparition des bandes de déformation -CH<sub>2</sub> ( $1460\text{ cm}^{-1}$ ) et d'élongation C-N ( $1350\text{ cm}^{-1}$ ). Lors de la deuxième étape, l'ajout du PNIPAM-COOH augmente les signaux des amides ( $1660\text{ cm}^{-1}$  et  $1560\text{ cm}^{-1}$ ) et du triplet au -CH ( $2900\text{ cm}^{-1}$ ) (Alg-EDA-PNI-DMSO). Enfin, au vu des intensités des amides similaires pour la réaction réalisée dans l'eau (Alg-EDA-PNI-Eau) et le DMSO (Alg-EDA-PNI-DMSO), il ne semble pas y avoir de nette différence entre les deux solvants.

Afin de tenter de quantifier le de PNIPAM-COOH greffé sur les gels, des mesures d'absorbance au-dessous ( $25\text{ °C}$ ) et au-dessus ( $50\text{ °C}$ ) de la LCST ( $25\text{ °C}$ ) ont été réalisées sur les différents gels 3.28. L'alginate non modifié (Alg-Ref) ne présente pas d'absorbance importante, quelle que soit la température. En greffant du PNIPAM-COOH, on observe que la transition thermique implique une augmentation importante de l'absorbance à  $50\text{ °C}$ . Dans l'eau, la quantité d'EDA n'influe que très légèrement sur l'absorbance à  $50\text{ °C}$  avec 0,98 pour Alg-EDA0.5-PNI-Eau et 1,07 pour Alg-EDA-PNI-Eau, ce qui montre que les conditions utilisées pour Alg-EDA0.5-PNI-Eau semblent suffisantes pour arriver à un alginate proche de la saturation en diamine, pouvant accueillir le maximum de PNIPAM-COOH lors de la seconde étape. L'utilisation d'HDA semble en outre permettre d'augmenter légèrement la présence de PNIPAM ( $A = 1,26$ ). L'HDA est cependant une diamine plus toxique que l'EDA, avec une dose létale médiane ( $DL_{50}$ ) de  $750\text{ mg/kg}$  contre  $1,2\text{ g/kg}$ , respectivement [67]. La légère supériorité de l'absorbance mesurée pour les échantillons préparés avec HDA ne justifie donc pas, pour le moment, son utilisation.

L'utilisation d'un tampon (figure 3.28, Alg-EDA-PNI-Tampon) augmente légèrement la quantité de PNIPAM-COOH, comme le montre l'absorbance plus importante à  $50\text{ °C}$ , autour de 1,44, comparé au même échantillon réalisé dans l'eau (Alg-EDA-PNI-Eau). Contrairement au chitosane, l'alginate est soluble dans les conditions de réaction en milieu tamponné à des pH allant de 6 à 7. La fixation du pH permet donc d'optimiser la réaction, en maintenant les acides carboxyliques sous forme d'anions, plus réactifs, et en déprotonant l'amine, cette dernière substituant l'ester NHS via l'attaque d'un doublet non liant [50].

Enfin, la réaction dans le DMSO (Alg-EDA-PNI-DMSO), bien que milieu insoluble pour l'alginate, donne lieu à des absorbances similaires au tampon ( $A = 1,44$ ). Les expériences menées dans la section 2.5.2.4 ont montré que l'alginate, si protoné, se déprotone dans le DMSO. La présence de l'anion carboxylate permet donc d'optimiser les conditions réactionnelles.

**Le DMSO est donc un solvant adapté à l'amidification de l'alginate pour greffer du PNIPAM-COOH en passant par un intermédiaire Alg-NH<sub>2</sub> via l'utilisation de l'EDA.** Les agents de couplage NHS et EDC ne sont cependant pas les seuls agents utilisables. Le CDI est une alternative intéressante moins onéreuse. Le travail sur des surfaces d'alginate est une première étape pour comprendre les problématiques liées à la modification chimique de surface tout en s'intéressant au CDI en comparaison au couplage NHS/EDC.

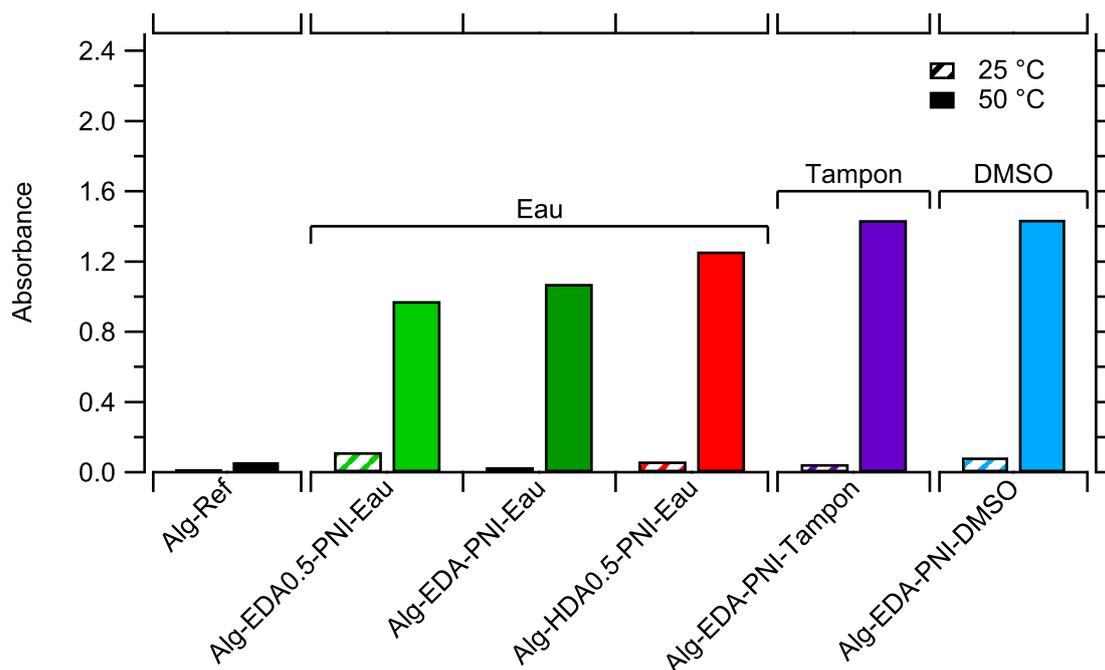


FIGURE 3.28 – Etude spectroscopique (470 nm) de l'absorbance des différents gels d'alginate modifiés (1 mg/mL), en dessous (rayures) et au-dessus (plein) de la LCST du PNIPAM.

### 3.3.2.2 Modification de films d'alginate : NHS/EDC versus CDI

Nous avons vu que le greffage via le couplage NHS/EDC s'avérait efficace sur les gels. Toutefois, le CDI est une alternative du fait de son plus faible coût. Cet agent est déjà utilisé sur de nombreux polysaccharides (voir section 3.3.1.2). De plus, le CDI est un composé de petite taille comparé à EDC, ce qui peut faciliter son accès aux fonctions carboxyliques de l'alginate (figure 3.29).

L'**XPS** est un outil utile pour caractériser les surfaces avec un signal obtenu localisé sur les quelques premiers nanomètres de la surface du matériau [68]. Il s'agit d'une analyse élémentaire qui renvoie la composition atomique en surface. Le principe consiste à irradier une surface par des rayons X. L'irradiation va entraîner l'émission des électrons de

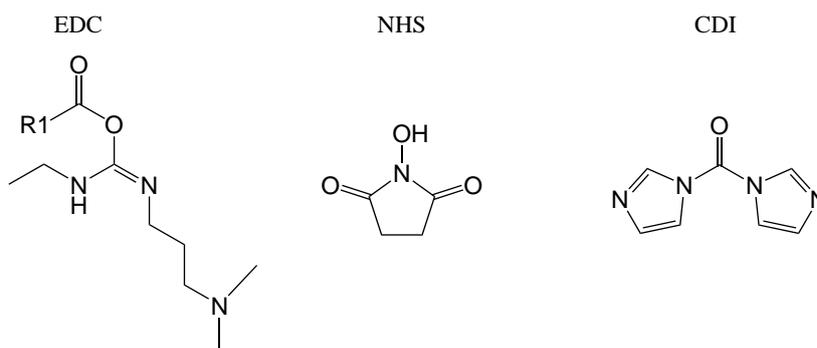


FIGURE 3.29 – Structures chimiques de EDC, NHS et CDI.

cœurs des différents atomes en surface. L'énergie cinétique de l'électron ( $E_{cinétique}$  émis est mesurée et, par différence avec l'énergie reçue via la radiation  $h\nu$ , l'énergie de liaison  $E_{liaison}$  de l'électron peut être calculée, en tenant compte du travail associé au phénomène d'émission  $\phi$ , selon la formule :

$$E_{liaison} = h\nu - (E_{cinétique} + \phi) \quad (3.2)$$

L'énergie de liaison de l'électron dépend de l'atome considéré, il est donc possible de quantifier la composition atomique en surface (quelques nanomètres de profondeur) [68]. Pour détecter la présence d'un composé en surface, il s'agit donc de s'intéresser aux signaux caractéristiques des atomes de l'espèce à identifier, par comparaison aux signaux du substrat. La difficulté réside ici dans le fait que l'espèce à greffer en surface, le PNIPAM, est composée de carbone, d'hydrogène, d'azote et d'oxygène, tout comme les surfaces PECs du fait de la présence du chitosane. L'alginate quant à lui ne contient pas d'atomes d'azote. Sur ce type de substrat, l'augmentation du signal des azotes peut donc être indicatif de la présence de PNIPAM en surface. On se propose donc, pour une première approche du greffage en surface, de travailler sur des films d'alginate. L'alginate portant des fonctions COOH, il est possible de greffer du PNIPAM-NH<sub>2</sub> en une seule étape afin de garder un système simple. La stratégie de greffage est présentée figure 3.30a.

Le PNIPAM-NH<sub>2</sub> a donc été mis en contact avec de l'alginate dans différentes conditions (figure 3.30, b). Pour certains échantillons, l'acide carboxylique a été préalablement activé soit par NHS/EDC (20 min, Alg-NHS-PNI-RT), soit par CDI (1h30, Alg-CDI-PNI-

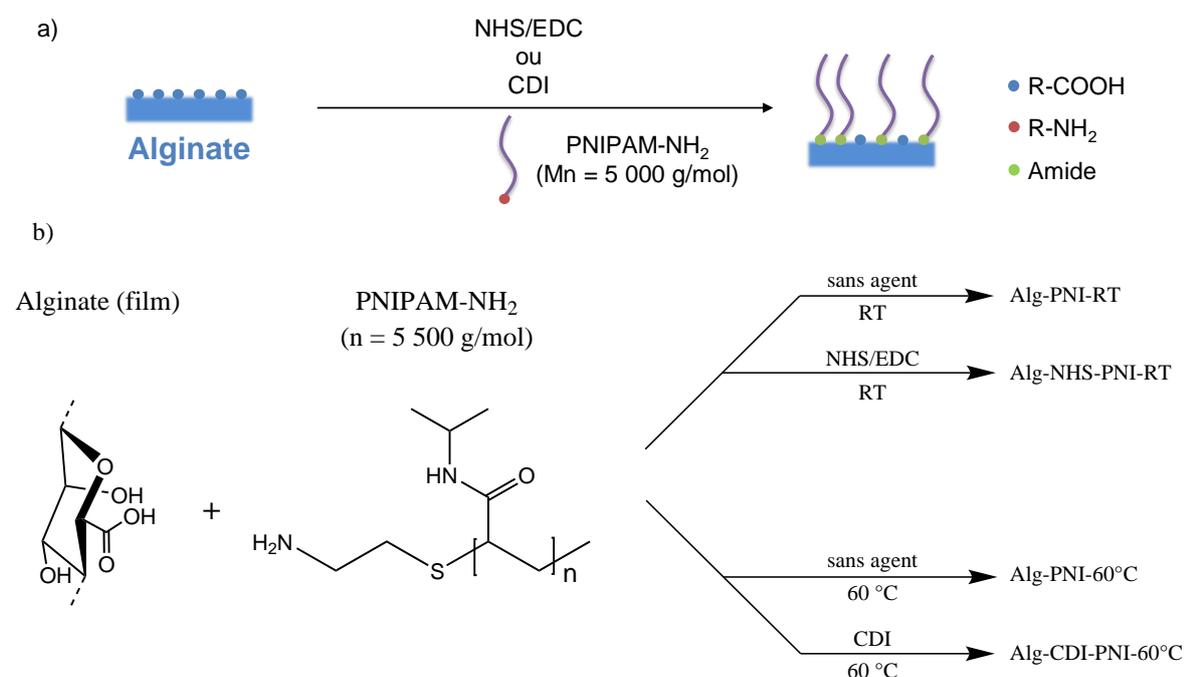


FIGURE 3.30 – (a) Stratégie de greffage de PNIPAM-NH<sub>2</sub> sur des films d'alginate, porteur de fonctions carboxyliques, via la formation d'amides et (b) les différentes conditions utilisées. «RT» correspond à la température ambiante, considéré à 25 °C.

60°C) avant l'ajout du PNIPAM-NH<sub>2</sub>. Dans le cas de l'activation par CDI, les surfaces sont lavées et transférées dans une solution ne contenant pas de CDI avant l'ajout de l'amine, afin d'éviter la présence d'agent n'ayant pas réagi qui conduirait au couplage du PNIPAM-NH<sub>2</sub> sur lui-même via la formation d'une liaison urée [48]. Dans un même temps, des échantillons ont été préparés dans les mêmes conditions, sans utiliser d'agents de couplage (Alg-PNI-RT et Alg-PNI-60°C), afin de se rendre compte de la contribution de l'adsorption (via la formation d'un sel COO<sup>-</sup>,NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, voir section 3.3.1) lors du greffage et de tenter de déterminer si, lors de l'utilisation des agents, le greffage est bien covalent et non physique. La réaction se faisant sur des films, les espèces en jeu sont en large excès par rapport aux fonctions réactives de l'alginate, limitées à la surface. Les conditions exactes utilisées sont résumées tableau 3.13.

Après réaction, les surfaces sont lavées abondamment puis analysées par XPS (tableau 3.14). Comme le montre la composition de Alg-Ref, ce dernier ne présente qu'une propor-

TABLEAU 3.13 – Conditions expérimentales pour le greffage du PNIPAM-NH<sub>2</sub> sur des films d'alginate. V = 40 mL, m<sub>Alg</sub> = 300 mg et m<sub>PNI-NH<sub>2</sub></sub> = 440 mg. «RT» correspond à la température ambiante, considéré à 25 °C. Le temps d'activation des acides carboxyliques de l'alginate est de 20 min pour NHS/EDC et de 1h30 pour CDI, avant ajout de l'amine.

Echantillon	Solvant	T (°C)	n <sub>COOH</sub> <sup>1</sup> (mmol)	C <sub>NH<sub>2</sub></sub> <sup>2</sup> (μmol/L)	C <sub>EDC</sub> (mmol/L)	C <sub>NHS</sub> (mmol/L)	C <sub>CDI</sub> (mmol/L)
Alg-PNI-RT	DMSO	RT	1,7	2	-	-	-
Alg-PNI-NHS-RT	DMSO	RT	1,7	2	15	15	-
Alg-PNI-60°C	DMSO <sup>3</sup>	60	1,7	2	-	-	-
Alg-CDI-PNI-60°C	DMSO <sup>3</sup>	60	1,7	2	-	-	15

<sup>1</sup> portés par l'alginate; <sup>2</sup> en considérant une fonction NH<sub>2</sub> par chaîne de PNIPAM; <sup>3</sup> séché sur tamis moléculaire, réaction sous atmosphère contrôlée (Ar)

TABLEAU 3.14 – Compositions atomiques, en pourcentages, mesurées par XPS.

Echantillon (eV)	Agent	T	C 285,0	N 400,0	O 532,6
Alg-Ref <sup>1</sup>	-	-	59,3 ± 0,3	2,5 ± 0,3	38,3 ± 0,4
EDC <sup>2</sup>	-	-	72,8	27,3	-
NHS <sup>2</sup>	-	-	50,0	12,5	37,5
CDI <sup>2</sup>	-	-	58,3	33,3	8,3
PNIPAM-NH <sub>2</sub> <sup>2</sup>	-	-	75,0	12,5	12,5
Alg-PNI-RT	-	RT	64,4 ± 0,7	4,6 ± 0,2	31,0 ± 0,9
Alg-NHS-PNI-RT	NHS/EDC	RT	60,3 ± 0,3	6,3 ± 0,6	33,4 ± 0,4
Alg-PNI-60°C	-	60 °C	61,6 ± 1,1	3,5 ± 0,5	34,9 ± 1,5
Alg-CDI-PNI-60°C	CDI	60 °C	57,0 ± 0,5	2,1 ± 1,0	41,0 ± 1,4

<sup>1</sup> mesuré sur un film d'alginate non traité; <sup>2</sup> pourcentages théoriques

tion limitée d'azote (2,5 %). En théorie, nous avons déjà vu que l'alginate ne contient pas d'azote, mais, en tant que polymère biosourcé, les quelques pourcents mesurés correspondent probablement à une pollution protéique. Le PNIPAM-NH<sub>2</sub> contient quant à lui 12,5 % d'azotes. L'augmentation du signal de l'azote sur la surface peut donc être un indice de la présence de PNIPAM en surface. Il ne faut cependant pas négliger la présence d'azote sur les différents agents de couplage qui peut contribuer aux signaux mesurés (EDC, NHS et CDI).

La modification de l'alginate via le couplage NHS/EDC montre une augmentation du pourcentage d'azote (6,3 %, Alg-NHS-PNI-RT). Cette augmentation s'avère plus importante que dans le cas où aucun agent de couplage n'est utilisé (4,6 %, Alg-PNI-RT). Les agents de couplage peuvent alors soit permettre d'augmenter l'efficacité du greffage en formant des amides, soit être adsorbés en surface et augmenter artificiellement le signal de l'azote du fait de leurs compositions intrinsèques. À l'inverse, il apparaît que l'utilisation du CDI n'induit pas de variation notable de la composition chimique des surfaces (Alg-CDI-PNI-60°C). La quantité d'azote semble même plus élevée dans le cas de Alg-PNI-60°C (3,5 %). L'efficacité du CDI paraît alors moindre. On notera par ailleurs que dans les cas où aucun agent de couplage n'est utilisé (Alg-PNI-RT et Alg-PNI-60°C) l'augmentation du taux d'azote est plus importante lorsque le mélange est effectué à température ambiante (RT) qu'à 60 °C. L'augmentation des azotes provient probablement du PNIPAM-NH<sub>2</sub> puisqu'aucun autre composé n'est ajouté et il semble donc que l'augmentation de la température défavorise l'adsorption. Quoi qu'il en soit, bien que le couplage NHS/EDC semble montrer des signes favorables, l'observation des compositions atomiques ne permet pas de conclure sur le greffage éventuel du PNIPAM, puisque les augmentations d'azotes peuvent être dues aux agents utilisés. L'étude plus en détails des spectres XPS hautes résolutions peut cependant apporter des informations complémentaires.

La figure 3.31 présente les spectres hautes résolutions de l'alginate non modifié (Alg-Ref), mis en présence de PNIPAM-N<sub>2</sub> sans agents de couplage (Alg-PNI-RT) et avec NHS/EDC (Alg-NHS-PNI-RT). L'étude des spectres hautes résolutions permet de quantifier les environnements chimiques des différents atomes. Pour l'azote, il s'agit ici de déconvoluer les différentes contributions du signal dues aux azotes neutres (amines/amides) et ceux protonés (figure 3.31, Alg-Ref). Un décalage s'observe en effet entre les énergies de liaison des électrons 1s de l'azote du fait de leur environnement : un environnement appauvri en électron, tel que la présence d'un proton supplémentaire (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) qui implique le port d'une charge positive par l'azote, rend plus difficile l'émission du photoélectron et le signal associé est décalé vers les hautes énergies. Ainsi, sur le spectre N1s de l'alginate de référence Alg-Ref, deux pics sont visibles et assignés aux amines (NH<sub>2</sub>) et amides (CONH) à 399,9 eV et aux amines protonées NH<sub>3</sub><sup>+</sup> à 401,9 eV [61]. L'alginate n'étant pas supposé contenir de l'azote, ce signal est attribué à des impuretés (e.g. protéines) ou à de la contamination de surface. L'augmentation importante à 401,9 eV pour Alg-PNI-RT

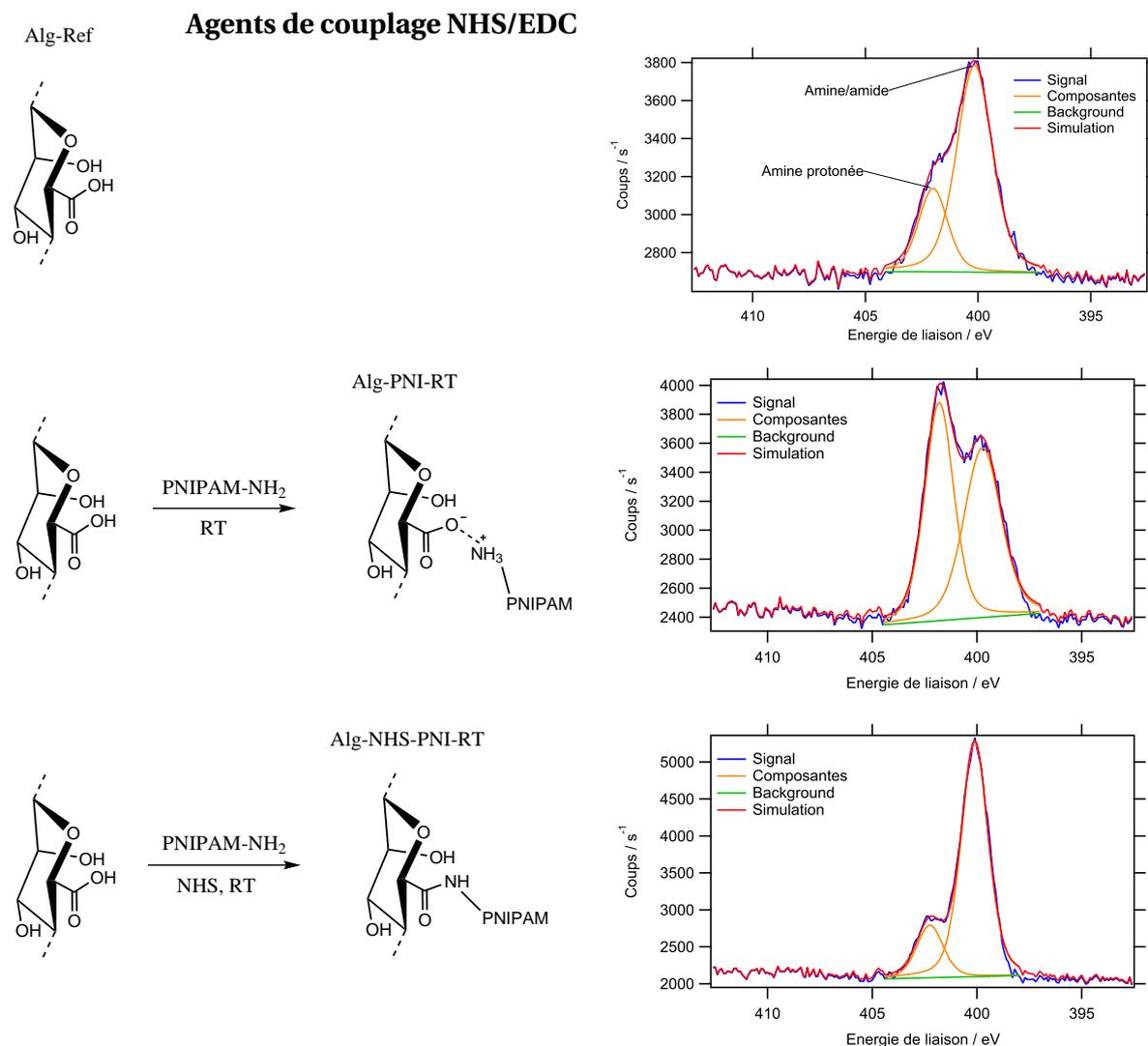


FIGURE 3.31 – A droite, les conditions de réaction ainsi que les hypothèses de résultat avec, à gauche, les spectres XPS hautes résolutions de l'azote (N1s) associés de l'alginate non modifié (Alg-Ref) et modifié par le PNIPAM-NH<sub>2</sub>, en présence (Alg-NHS-PNI-RT) ou non (Alg-PNI-RT) d'agents de couplage NHS/EDC.

semble indiquer, comme attendu, la formation d'un sel COO<sup>-</sup>, NH<sub>3</sub><sup>+</sup> (figure 3.31, gauche). Au contraire, la diminution importante du signal des amines protonées pour Alg-NHS-PNI-RT peut indiquer la formation d'un amide, par l'action de NHS/EDC. Combiné à l'augmentation du taux d'amines/amides, on peut supposer le greffage du PNIPAM ou la présence de l'ester NHS (alginate-NHS), plus stable que l'ester EDC [51].

La figure 3.32 présente les spectres N1s de Alg-PNI-60°C et Alg-CDI-PNI-60°C. On observe une fois de plus une importante augmentation de la protonation des amines lorsque le PNIPAM-NH<sub>2</sub> est utilisé sans CDI (Alg-PNI-60°C), lié à la formation d'un sel plutôt qu'à la formation d'un amide. L'utilisation du CDI conduit à la suppression du signal des amines protonées (Alg-CDI-PNI-60°C). Cette disparition peut être liée à la forma-

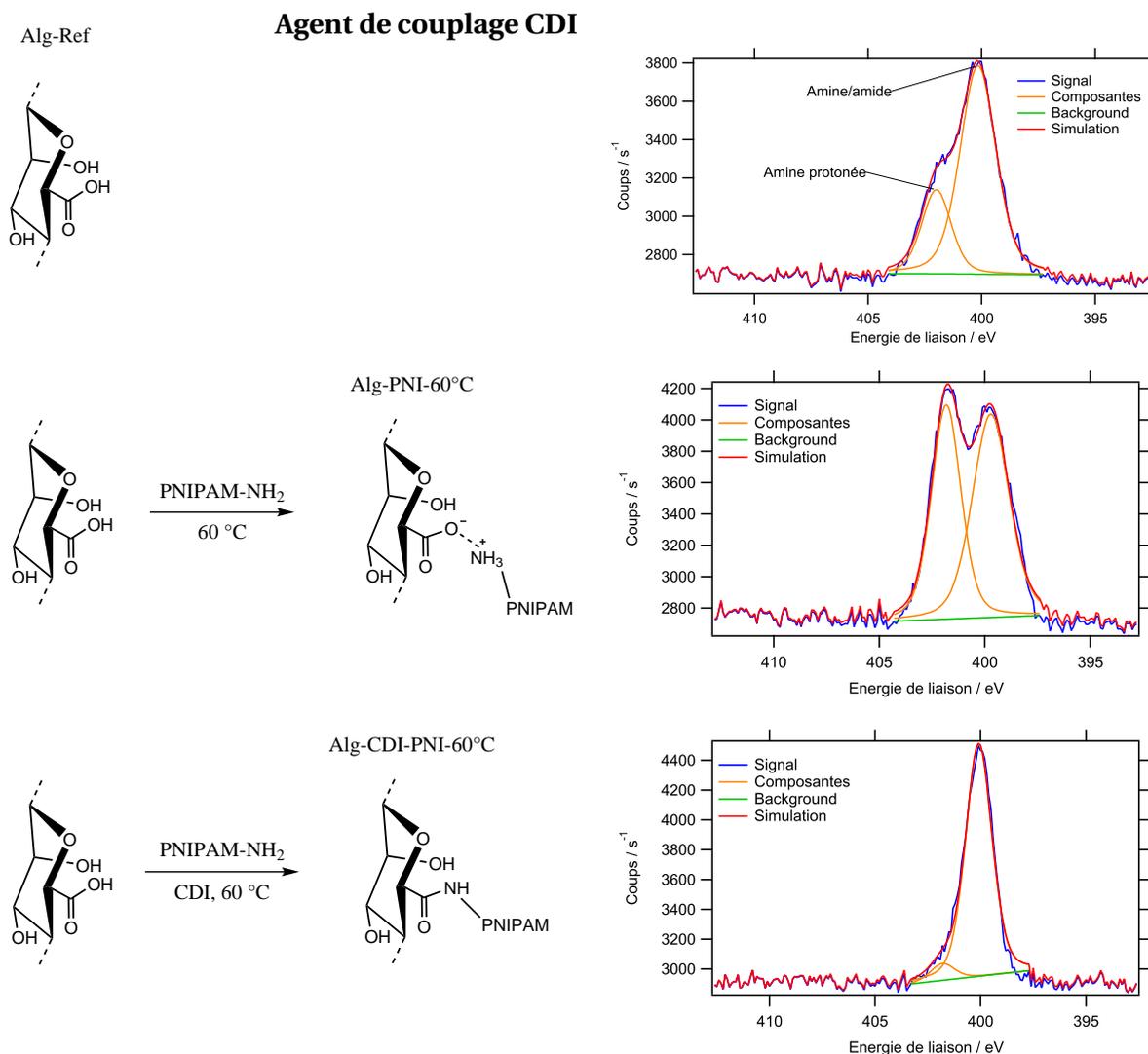


FIGURE 3.32 – A droite, les conditions de réaction ainsi que les hypothèses de résultat avec, à gauche, les spectres XPS hautes résolutions de l'azote (N1s) associés de l'alginate non modifié (Alg-Ref) et modifié par le PNIPAM-NH<sub>2</sub>, en présence (Alg-CDI-PNI-60°C) ou non (Alg-PNI-60°C) de CDI.

tion d'amides. Toutefois, les compositions atomiques similaires observées avec Alg-Ref (tableau 3.14) laissent supposer, s'il a lieu, un taux de greffage faible.

De la même manière que pour la détermination de l'environnement chimique de l'azote, le tableau 3.15 résume les résultats de déconvolution des spectres XPS du carbone C1s. Si l'on considère les compositions théoriques de Alg-Ref et PNIPAM-N<sub>2</sub>, il apparaît alors qu'une augmentation de la proportion de carbones aliphatiques (CC, CH, 285 eV) serait une indication de la présence de PNIPAM sur les surfaces d'alginate. Une fois de plus, l'assignation d'un signal important des carbones aliphatiques est relativisée par la composition en CC et CH de NHS (50 %). Cependant, la présence de NHS en surface devrait s'accompagner d'une augmentation des hautes énergies de liaison du fait de la

TABLEAU 3.15 – Environnements chimiques du carbone (C1s) des films d'alginate. La somme des pourcentages est normalisée à 100 %.

Echantillon (eV)	Agent	T	CC, CH 285,0	CO, CN 286,6	COO, CON 288,2
Alg-Ref <sup>1</sup>	-	-	20,7 ± 0,7	57,7 ± 0,5	21,6 ± 0,3
EDC <sup>2</sup>	-	-	25,0	62,5	12,5
NHS <sup>2</sup>	-	-	50,0	-	50,0
CDI <sup>2</sup>	-	-	-	57,1	42,9
PNIPAM-NH <sub>2</sub> <sup>2</sup>	-	-	66,7	16,7	16,7
Alg-PNI-RT	-	RT	31,7 ± 1,5	49,5 ± 0,5	18,9 ± 1,1
Alg-NHS-PNI-RT	NHS/EDC	RT	19,4 ± 1,2	56,4 ± 2,4	24,2 ± 1,5
Alg-PNI-60°C	-	60 °C	26,1 ± 2,3	53,7 ± 2,8	20,2 ± 1,1
Alg-CDI-PNI-60°C	CDI	60 °C	18,3 ± 1,7	56,2 ± 1,5	25,6 ± 0,7

<sup>1</sup> mesuré sur un film d'alginate non traité; <sup>2</sup> pourcentages théoriques

présence de groupements CON.

L'augmentation de la contribution des carbones aliphatiques pour Alg-PNI-RT et Alg-PNI-60°C est cohérente avec la composition globale déterminée tableau 3.14 et la présence de PNIPAM en surface semble sans ambiguïté [69]. Néanmoins, lors de l'ajout des agents de couplage NHS/EDC ou CDI (tableau 3.15, Alg-NHS-PNI-RT et Alg-CDI-PNI-60°C), les signaux sont similaires à ceux de l'alginate initial Alg-Ref. L'utilisation du couplage NHS/EDC ne semble donc pas avoir permis le greffage du PNIPAM-NH<sub>2</sub>. **En outre, ce résultat confirme l'absence d'efficacité du CDI.**

Il est difficile de conclure à partir de ces résultats, il apparaît cependant que l'utilisation d'un agent de couplage est nécessaire afin d'éviter la formation du sel -COO<sup>-</sup>, NH<sub>3</sub><sup>+</sup> qui résulterait en une liaison faible entre le PNIPAM et le matériau. Le couplage NHS/EDC se montre plus efficace que CDI, ce dernier ne donnant lieu à aucune variation significative des compositions globales en surface. La déconvolution des spectres N1s indique de plus que NHS/EDC semble être apte à la formation d'amides en surface. **Toutefois, si l'amidification à lieu, la présence de PNIPAM en surface n'a pu être démontrée.** L'allongement du temps d'activation de l'acide carboxylique par NHS/EDC avant l'ajout de l'amine, ici de 20 min, peut éventuellement améliorer le taux de greffage. Il se peut en effet qu'une compétition entre l'activation de l'acide, la formation du sel et l'amidification limite l'efficacité du procédé. Il est dans tous les cas nécessaire d'optimiser les conditions de réaction afin d'obtenir un greffage de PNIPAM sur les surfaces PECs efficace.

### 3.3.3 Fonctionnalisation de surface des PECs

Les matrices PECs d'alginate/chitosane présentent des groupements carboxyliques (de l'alginate) et amines (du chitosane) en surface. Afin d'obtenir un recouvrement de la surface optimal, on se propose de greffer une diamine sur les acides carboxyliques de l'al-

ginate. La stratégie de synthèse est rappelée figure 3.33. L'impact des traitements acides présentés dans le chapitre précédent (section 2.5.2) a été évalué sur le greffage d'un PNIPAM commercial, avant de greffer différentes tailles de polymères.

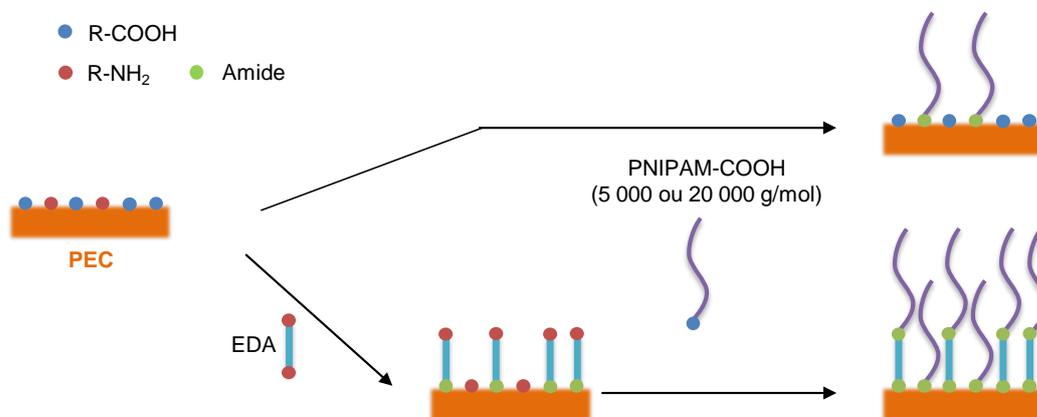


FIGURE 3.33 – Stratégie générale du greffage du PNIPAM-COOH sur les matrices PECs composées d'alginate/chitosane par amidification.

### 3.3.3.1 Greffage du PNIPAM : influence d'un traitement acide sur l'efficacité de greffage

Dans un premier temps, le PNIPAM greffé présente une masse  $M_n = 5\,000$  g/mol (commercial). Nous avons vu précédemment que la réaction dans le DMSO est efficace. De plus, un tamponnage de la solution à un pH proche du neutre ne semble pas indispensable pour effectuer la modification. L'utilisation de NHS/EDC semble permettre de former des amides, sans qu'il ait pu être démontré le greffage du PNIPAM sur les surfaces d'alginate. De plus, contrairement aux gels, l'alginate et le chitosane sont ici liés de manière ionique ( $\text{COO}^-$ ,  $\text{NH}_3^+$ ). Dans les matrices PECs, l'alginate est en excès (ratio massique de 63/37 alginate/chitosane, voir section 2.1). Les traitements acides réalisés section 2.5.2.4 ont montré que i) la réticulation par  $\text{CaCl}_2$  favorise les liaisons alginate- $\text{Ca}^{2+}$  au détriment des interactions alginate/chitosane et ii) qu'il était possible de protoner une partie des carboxylates de l'alginate et des amines du chitosane ce qui entraîne une perte des interactions entre l'alginate et  $\text{Ca}^{2+}$  et/ou le chitosane. Ce deuxième point peut permettre d'augmenter la disponibilité des groupes fonctionnels. Replacées dans un milieu DMSO, les fonctions retrouvent leur équilibre acido-basique au cours du temps pour reformer des carboxylates  $\text{COO}^-$  et amines  $\text{NH}_2$ , réactives et plus disponibles pour l'amidification (section 2.5.2.4, figure 2.33 page 120). Ainsi, avant réaction, certains PECs ont été traités dans un bain acide ( $\text{H}_2\text{O}$ , pH 2,5, 1 H) avant d'être mis en contact avec NHS/EDC (figure 3.34). On se propose alors d'observer l'effet de ce traitement sur l'efficacité du greffage.

Comme dans le cas des gels, les acides carboxyliques sont activés 3 H en présence de

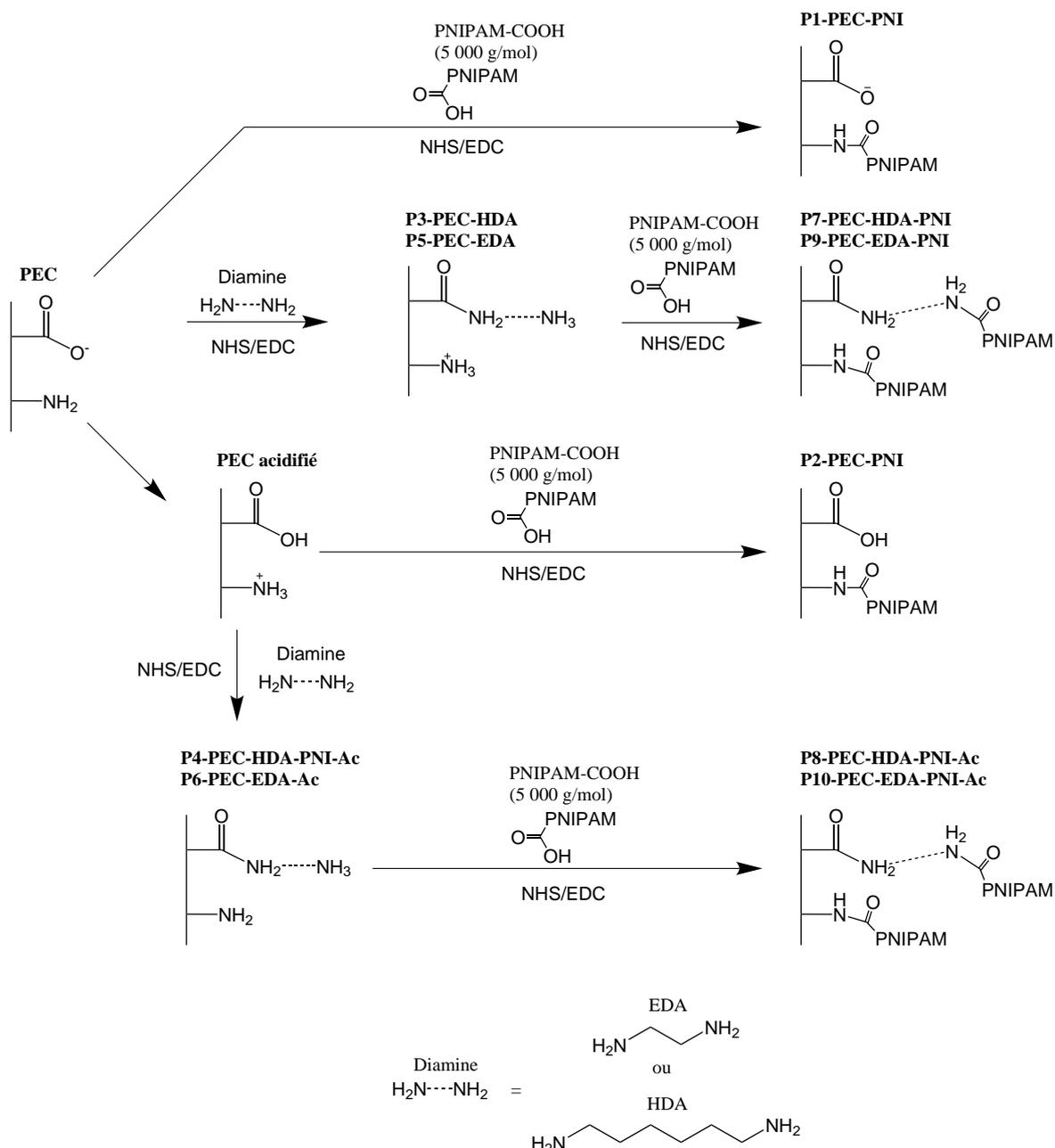


FIGURE 3.34 – Schéma réactionnel de la première série de modifications de surface, avec les différents paramètres étudiés.

NHS/EDC avant l'ajout de l'amine. Pour la création d'amines en surface de l'alginate, en excès par rapport au chitosane, deux diamines de tailles différentes ont été comparées, à savoir l'EDA et l'HDA. Les conditions réactionnelles sont résumées tableaux 3.16 et 3.17. Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent (section 2.5.1), les deux faces PEC ne comportent pas exactement la même composition, avec une légère proportion supposée plus importante d'alginate sur la face inférieure, qui est modifiée ici.

PEC-Ref correspond à une surface de PEC non modifiée. Les échantillons notés «-Ac» ont été, avant la première étape, acidifiés pendant 1 h ( $\text{H}_2\text{O}$ , pH 2,5) puis sont séchés à l'étuve. Les échantillons ne portant pas cette mention ne subissent pas le traitement

TABLEAU 3.16 – Première étape : conditions expérimentales pour le greffage de la diamine sur les surfaces PECs. L'acidification se fait dans une solution à pH 2,5 dans l'eau, pendant 1 H. V = 20 mL DMSO. Les acides carboxyliques des PECs sont activés 3 H par NHS/EDC avant ajout de la diamine.

Echantillon	Diamine	Acidification	m <sub>PEC</sub> (mg)	C <sub>Diamine</sub> (mmol/L)	C <sub>EDC</sub> (mmol/L)	C <sub>NHS</sub> (mmol/L)
<b>P3-PEC-HDA</b>	HDA	Non	100	850 (50 eq)	35,0 (2 eq)	17,5 (1 eq)
<b>P4-PEC-HDA-Ac</b>	HDA	Oui	100	850 (50 eq)	35,0 (2 eq)	17,5 (1 eq)
<b>P5-PEC-EDA</b>	EDA	Non	100	850 (50 eq)	35,0 (2 eq)	17,5 (1 eq)
<b>P6-PEC-EDA-Ac</b>	EDA	Oui	100	850 (50 eq)	35,0 (2 eq)	17,5 (1 eq)

TABLEAU 3.17 – Deuxième étape : conditions expérimentales pour le greffage du PNIPAM-COOH (Mn = 5 000 g/mol) sur les surfaces PECs. L'acidification se fait dans une solution à pH 2,5 dans l'eau, pendant 1 H. V = 20 mL DMSO, m<sub>PNIPAM-COOH</sub> = 160 mg. L'acide carboxylique du PNIPAM-COOH est activé 3 H par NHS/EDC avant ajout sur les PECs.

Echantillon	Diamine	Acidification	m <sub>PEC</sub> (mg)	C <sub>PNIPAM</sub> <sup>1</sup> (mmol/L)	C <sub>EDC</sub> (mmol/L)	C <sub>NHS</sub> (mmol/L)
<b>P1-PEC-PNI</b>	Sans	Non	100	1,6 (1 eq)	35,0 (22 eq)	17,5 (11 eq)
<b>P2-PEC-PNI-Ac</b>	Sans	Oui	100	1,6 (1 eq)	35,0 (22 eq)	17,5 (11 eq)
<b>P3-PEC-HDA</b>	HDA	Non	100	1,6 (1 eq)	35,0 (22 eq)	17,5 (11 eq)
<b>P4-PEC-HDA-Ac</b>	HDA	Oui	100	1,6 (1 eq)	35,0 (22 eq)	17,5 (11 eq)
<b>P5-PEC-EDA</b>	EDA	Non	100	1,6 (1 eq)	35,0 (22 eq)	17,5 (11 eq)
<b>P6-PEC-EDA-Ac</b>	EDA	Oui	100	1,6 (1 eq)	35,0 (22 eq)	17,5 (11 eq)
<b>P7-PEC-HDA-PNI</b>	HDA	Non	100	1,6 (1 eq)	35,0 (22 eq)	17,5 (11 eq)
<b>P8-PEC-HDA-PNI-Ac</b>	HDA	Oui	100	1,6 (1 eq)	35,0 (22 eq)	17,5 (11 eq)
<b>P9-PEC-EDA-PNI</b>	EDA	Non	100	1,6 (1 eq)	35,0 (22 eq)	17,5 (11 eq)
<b>P10-PEC-EDA-Ac-PNI</b>	EDA	Oui	100	1,6 (1 eq)	35,0 (22 eq)	17,5 (11 eq)

<sup>1</sup> fonctionnalisé R-COOH

acide. Lors des deux étapes, la réaction se fait dans du DMSO.

Après réaction, les matériaux ont été analysés par XPS (tableau 3.18). L'analyse d'un PEC de référence (PEC-Ref) montre une très faible quantité d'azote à 1,6 % (N1s, 400,0 eV) ainsi qu'une quantité environ équivalente de carbones aliphatiques (CC,CH, 285,0 eV) et de CO,CN (286,6 eV) qui représentent chacun environ 40 % de la totalité des carbones. Une référence de PNIPAM a été analysée (PNIPAM-COOH). On retrouve des valeurs proches des compositions théoriques, avec une majorité de carbones (78,2 %), notamment aliphatiques CC,CH (73,5 %). En outre, le taux d'azote de l'ordre de 10 % du PNIPAM devrait impliquer une augmentation du pourcentage de cet atome dans la composition des surfaces modifiées. Néanmoins, la composition de NHS reste proche de celle du PNIPAM, à ceci près que ce dernier présente un taux de carbones COO,CON plus im-

portant (50,0 %).

TABLEAU 3.18 – Compositions atomiques, en pourcentages, mesurées par XPS.

Echantillon (eV)	Diamine	PNIPAM-COOH	Acidification	CC,CH <sup>1</sup>		CO,CN <sup>1</sup>		COO, CON <sup>1</sup>	Cl s	NH/NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	N1s	C=O/C-O	O1s
				285,0	286,6	286,6	288,2						
PEC-Ref <sup>2</sup>	-	-	-	37,6	42,1	20,3	62,4	7,0	1,6	2,4	35,9		
EDC <sup>3</sup>	-	-	-	25,0	62,5	12,5	72,7	100,0 <sup>4</sup>	27,3	-	-		
NHS <sup>3</sup>	-	-	-	50,0	-	50,0	50,0	100,0 <sup>4</sup>	12,5	nd <sup>5</sup>	37,5		
HDA <sup>3</sup>	-	-	-	66,7	33,3	-	75,0	nd <sup>5</sup>	25,0	-	-		
EDA <sup>3</sup>	-	-	-	-	100,0	-	50,0	nd <sup>5</sup>	50,0	-	-		
PNIPAM-COOH <sup>2</sup>	-	-	-	73,5	12,4	14,1	78,2	100,0 <sup>4</sup>	10,4	100,0 <sup>4</sup>	11,3		
P1-PEC-PNI	Sans	Oui	Non	34,6	41,3	24,1	59,7	14,3	1,8	1,3	38,4		
P2-PEC-PNI-Ac			Oui	57,8	33,0	9,2	73,9	3,8	4,7	0,1	21,5		
P3-PEC-HDA	HDA	Non	Non	29,3	50,6	20,1	60,6	1,0	3,0	2,7	36,3		
P4-PEC-HDA-Ac			Oui	27,0	57,3	15,6	61,5	2,6	5,7	7,1	32,8		
P5-PEC-EDA	EDA	Non	Non	15,6	59,7	24,7	55,6	1,0	3,5	2,6	40,9		
P6-PEC-EDA-Ac			Oui	31,8	51,4	16,8	60,4	1,8	6,8	2,2	32,8		
P7-PEC-HDA-PNI	HDA	Oui	Non	14,6	60,5	24,9	56,9	1,2	4,3	3,4	38,8		
P8-PEC-HDA-PNI-Ac			Oui	30,2	51,6	18,2	63,8	3,7	6,6	3,7	29,5		
P9-PEC-EDA-PNI	EDA	Non	Non	13,0	69,2	17,8	58,4	1,0	4,2	3,3	37,3		
P10-PEC-EDA-PNI-Ac			Oui	36,7	49,3	14,0	63,0	7,1	6,8	2,3	30,2		

<sup>1</sup> normalisé aux carbones;<sup>2</sup> pourcentages expérimentaux;<sup>3</sup> pourcentages théoriques;<sup>4</sup> le ratio tend vers l'infini;<sup>5</sup> non-défini, dépend du pH

Deux greffages sans diamine ont été réalisés, avec et sans acidification préalable (P1-PEC-PNI et P2-PEC-PNI-Ac). Pour ces échantillons, le couplage doit s'opérer uniquement entre le PNIPAM-COOH et les amines du chitosane. Dans le cas de P1-PEC-PNI, le rapport CO,CN/CC,CH reste constant avec respectivement 34,6 % et 41,3 %, conjointement à une augmentation du taux de COO,CON (24,1 %). Une très légère augmentation du taux d'azote (1,8 %) peut aussi supposer la présence d'une petite quantité de PNIPAM ou de NHS en surface. Les fonctions amines du chitosane étant cependant minoritaires, un taux de greffage faible peut en effet être attendu.

L'acidification du PEC (P2-PEC-PNI-Ac) permet d'augmenter le taux d'azote en surface, qui grimpe jusqu'à 4,7 %. En outre, une nette augmentation du taux de CC,CH (57,8 %) se produit en combinaison d'une baisse des COO,CON (9,2 %), ce qui laisse penser à une quantité de PNIPAM-COOH greffé plus importante.

Le greffage de la diamine peut être mis en évidence par une augmentation des CO,CN. De plus, le taux d'azote N1S, respectivement autour de 25 % et de 50 % pour l'HDA et l'EDA (valeurs théoriques), doit faire augmenter celui de la surface des PECs lors du greffage. On observe en effet une augmentation du taux de carbones liés à un oxygène ou un azote (CO,CN) accompagné par une augmentation du pourcentage d'azote pour P3-PEC-HDA, P4-PEC-HDA-Ac, P5-PEC-EDA et P6-PEC-EDA-Ac. La quantité d'azote est cependant plus importante lorsque les échantillons ont été traités dans un milieu acide. On peut supposer que la protonation des fonctions acides de l'alginate améliore leurs disponibilités et que cet effet contrebalance la moins bonne réactivité du couplage NHS/EDC sur la forme acide (voir section b)). Il faut aussi noter que le rapport entre azotes neutres et protonés,  $NH/NH_3^+$ , est de l'ordre de 1 pour les échantillons non acidifiés, alors que ce rapport devient supérieur à 1 et donc majoritairement du côté des azotes neutres dans le cas des échantillons traités dans l'acide (P4-PEC-HDA-Ac et P6-PEC-EDA-Ac). Pourtant, le traitement acide devrait entraîner une protonation des amines du chitosane ( $pK_a = 6,5$  [70]) et donc diminuer ce rapport. Deux phénomènes peuvent expliquer cette observation : (i) sans acidification, on peut supposer la formation d'un sel ( $NH_3^+, COO^-$ ) au détriment d'un greffage covalent et (ii) la diamine, greffée via une de ses fonctions amines, présente une amine «libre» potentiellement protonée. Ce dernier point pourrait supposer que, dans le cas des échantillons acidifiés, la diamine, qui se greffe de manière plus efficace, ponterait. Ce pontage rendrait la diamine inactive pour la deuxième étape qui consiste à greffer le PNIPAM-COOH (figure 3.35).

Si l'on s'intéresse cette deuxième étape, on remarque une légère augmentation du taux d'azote pour les échantillons n'ayant pas subi le traitement acide P7-PEC-HDA-PNI et P9-PEC-EDA-PNI, avec des pourcentages respectifs de l'ordre de 4,3% et 4,2 %, comparé à leurs homologues P3-PEC-HDA et P6-PEC-EDA. Dans un même temps, les échantillons non acidifiés (P8-PEC-HDA-PNI-Ac et P10-PEC-EDA-PNI-Ac) présentent des taux d'amines stables autour de 6,6-6,8 %. Néanmoins, une proportion non négligeable des azotes sous forme protonée ( $NH_3^+$ ) est détectée avec une diminution du rapport  $NH/NH_3^+$ ,

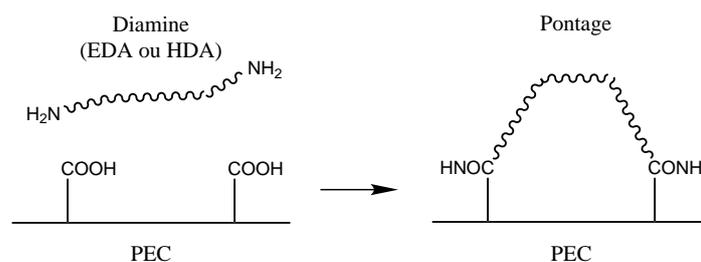


FIGURE 3.35 – Pontage de la diamine entre deux fonctions carboxyliques de l'alginate.

ce qui peut indiquer la présence d'un sel ( $\text{NH}_3^+$ ,  $\text{COO}^-$ ) plutôt que d'un système covalent. Le taux de carbones aliphatiques augmente légèrement dans le cas de P10-PEC-EDA-Ac-PNI (CC,CH, 36,7 %), mais cette variation est relativisée par la stagnation des azotes autour de 6,8 %. On peut alors supposer que, si lors de la première étape un sel est formé, ce dernier peut être évacué lors de la deuxième étape (rupture des liaisons ioniques). Enfin, le PNIPAM présente une composition en oxygène de 11,3 %, bien plus faible que les PECs. Ces oxygènes impliquent une contribution exclusive de C=O et sa présence doit donc augmenter le ratio C=O/C-O, ce qui n'est significativement visible sur aucun échantillon, avec en outre une baisse pour P9-PEC-EDA-PNI-Ac (3,3 %). De manière générale, les échantillons acidifiés (P8-PEC-HDA-PNI-Ac et P10-PEC-EDA-Ac-PNI) ne voient pas leurs compositions atomiques significativement évoluer lors de cette étape hormis une baisse du pourcentage d'oxygène, ce qui soutient la thèse du pontage de la diamine lors de la première étape, menant à une passivation de la surface et un taux de PNIPAM en surface probablement faible.

En conclusion, **l'acidification des PECs semble permettre un greffage plus efficace, peut-être du fait de la décomplexation des fonctions carboxyliques et amines** les rendant plus accessibles. Sans diamine, il semble en effet que du PNIPAM se retrouve en surface lorsque la surface est préalablement acidifiée (P2-PEC-PNI-Ac). Le greffage d'une diamine lors d'une première étape semble aussi être optimisé lorsque les surfaces sont acidifiées. La deuxième étape qui consiste à greffer le PNIPAM-COOH semble toutefois difficile, notamment à cause du pontage supposé des diamines. Aucune différence n'est observée selon l'utilisation de l'HDA ou de l'EDA, les deux semblant opérer de la même manière. L'EDA étant moins toxique, ce dernier sera utilisé pour la suite. L'augmentation de la concentration en diamine pourrait permettre d'éviter le pontage en favorisant la monosubstitution et ainsi augmenter le taux de greffage lors de la deuxième étape.

### 3.3.3.2 Greffage du PNIPAM : variation de la taille et de la densité de greffage

Afin d'optimiser le greffage, une deuxième série d'expériences a été réalisée (figure 3.36). En plus du PNIPAM commercial de masse molaire 5 000 g/mol jusqu'ici employé, un PNIPAM-COOH synthétisé en RAFT a aussi été utilisé (PNI3,  $M_n = 24\,000$  g/mol, élaboré section 3.2.2). Globalement, des concentrations en réactifs plus importantes sont

utilisées et les conditions mises en œuvre pour le greffage de l'EDA sont répertoriées tableau 3.19 (PEC-EDA). Il s'agit, en saturant la solution, de favoriser le greffage d'une seule des deux amines de l'EDA. La deuxième amine pourrait alors accueillir le PNIPAM-COOH. Si un phénomène de pontage est présent pour les expériences précédentes, le taux de greffage de PNIPAM devrait augmenter dans les conditions utilisées ici.

Dans une deuxième étape, le PNIPAM-COOH est greffé sur les surfaces, soit directement sur les PECs (PEC-5K et PEC-20K), soit sur PEC-EDA (PEC-EDA-5K et PEC-EDA-20K). Les conditions utilisées pour cette étape de greffage sont présentées tableau 3.20.

Afin de pouvoir caractériser les surfaces via des études *in vitro* (chapitre 4), il est nécessaire d'élaborer les échantillons directement sur des supports de verres qui serviront à assurer un bon recouvrement des puits de culture. La face modifiée ici est donc la face supérieure. Supposément, cette face est légèrement moins riche en alginate. Le greffage

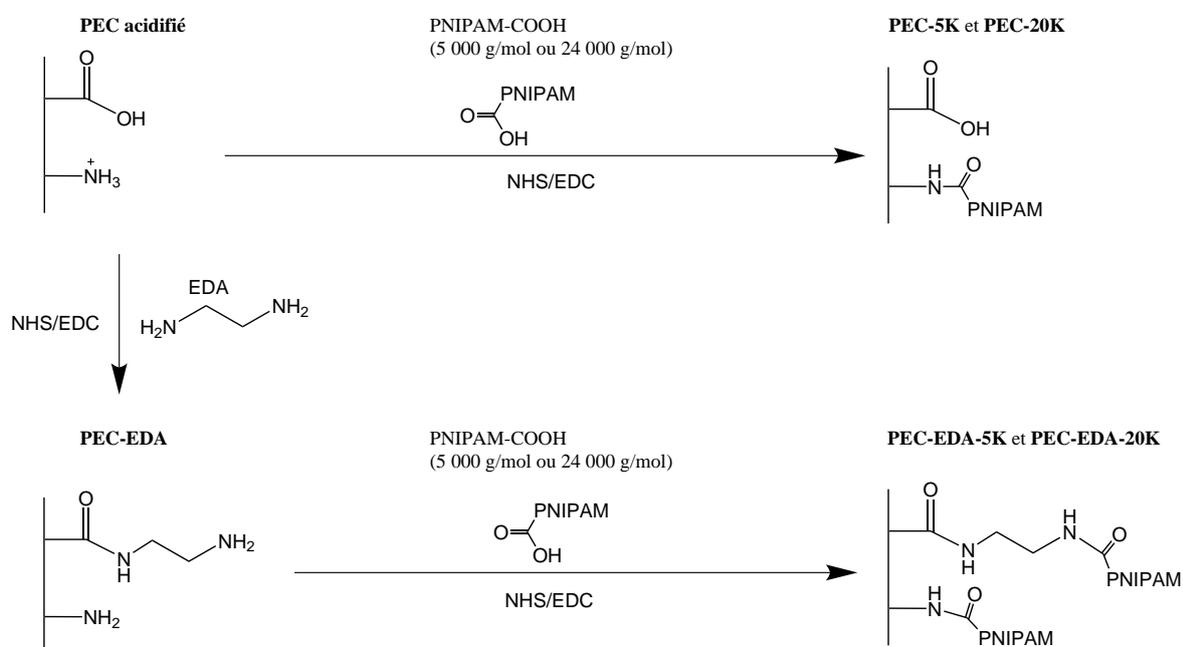


FIGURE 3.36 – Greffage du PNIPAM-COOH sur les matrices PECs composées d'alginate/chitosane par amidification. L'EDA est utilisé en tant que diamine pour augmenter la quantité de PNIPAM-COOH greffé. Deux tailles de PNIPAM sont employées : 5 000 g/mol (commercial) et 24 000 g/mol (synthétisé par RAFT, PNI-3).

TABEAU 3.19 – Conditions expérimentales pour le greffage de l'EDA sur les surfaces PECs. L'acidification se fait dans une solution à pH 2,5 dans l'eau, pendant 1 h.  $V = 0,6$  mL DMSO,  $V_{\text{EDA}} = 0,6$  mL. Les acides carboxyliques des PECs sont activés 3 h par NHS/EDC avant ajout de l'EDA.

Echantillon	Diamine	Acidification	$m_{\text{PEC}}$ (mg)	$C_{\text{EDA}}$ (mol/L)	$C_{\text{EDC}}^1$ (mmol/L)	$C_{\text{NHS}}^1$ (mmol/L)
PEC-EDA	EDA	Oui	30	7,2 (excès)	200 (2 eq)	100 (1 eq)

<sup>1</sup> avant ajout de l'EDA

TABLEAU 3.20 – Conditions expérimentales pour le greffage du PNIPAM-COOH sur les surfaces PECs aminées (PEC-EDA) ou non. L'acidification se fait dans une solution à pH 2,5 dans l'eau, pendant 1 h. V = 1 mL DMSO. L'acide carboxylique du PNIPAM-COOH est activé 3 h par NHS/EDC avant ajout sur les PECs.

Echantillon	Diamine	Acidification	m <sub>PEC</sub> (mg)	M <sub>n</sub> <sub>PNIPAM</sub> (g/mol)	C <sub>PNIPAM</sub> (mmol/L)	C <sub>EDC</sub> (mmol/L)	C <sub>NHS</sub> (mmol/L)
PEC-5K	Sans	Oui	30	5 000 <sup>1</sup>	2,0 (1 eq)	50 (25 eq)	25 (12,5 eq)
PEC-EDA-5K	EDA	Oui	30	5 000 <sup>1</sup>	2,0 (1 eq)	50 (25 eq)	25 (12,5 eq)
PEC-20K	Sans	Oui	30	24 000 <sup>2</sup>	2,0 (1 eq)	50 (25 eq)	25 (12,5 eq)
PEC-EDA-20K	EDA	Oui	30	24 000 <sup>2</sup>	2,0 (1 eq)	50 (25 eq)	25 (12,5 eq)

<sup>1</sup> commercial; <sup>2</sup> synthétique, RAFT PNI-3

du PNIPAM en une étape (sans diamine) devrait être facilité, tandis que le greffage de la diamine (étape intermédiaire) pourrait être rendu plus difficile.

Les analyses XPS réalisées sur les différents échantillons sont présentées figure 3.37. La représentation en histogramme montre les compositions atomiques décomposées en sous-contributions. Comme vu précédemment, l'indice de la présence de l'EDA se caractérise par l'augmentation du taux d'azote N1s (figure 3.37, vert) accompagné de l'augmentation des signaux CO,CN, en bleu intermédiaire sur la figure. Si l'on compare PEC-Ref et PEC-EDA, on remarque en effet l'augmentation de ces deux contributions. Le pourcentage d'azote initialement autour de 4,4 % monte en effet jusqu'à 7,4 %, avec une très faible proportion d'amines protonées NH<sub>3</sub><sup>+</sup> (< 1 %, vert foncé). Les amides ne peuvent, dans ces conditions, pas être protonés (pKa = 17). L'absence de protonation des azotes peut indiquer la formation d'amides au détriment d'amines. Le taux de CO,CN passe quant à lui de 27,7 % pour PEC-Ref à 36,7 %. Ces différents signes sont cohérents avec la présence d'EDA en surface. Il reste à s'assurer l'absence de pontage préjudiciable au greffage du PNIPAM.

La figure 3.37 présente aussi le greffage du PNIPAM-COOH. Rappelons que le PNIPAM se caractérise en XPS par une forte contribution des carbones aliphatiques (CC,CH, bleu clair) ainsi qu'à un taux d'azote supérieur aux PECs, de l'ordre de 10 %. De plus, ce polymère est exempt d'amines et les azotes qui le composent sont sous forme d'amides, ce qui la présence d'amines protonée. Une proportion importante d'azotes neutres (Amide/amide, vert clair) peut donc aussi être un signe de sa présence. Les amides du PNIPAM impliquent d'autre part une majorité de signaux C=O pour l'oxygène (rouge clair). Enfin, le taux en oxygène du PNIPAM n'est que de l'ordre de 11,3 % quand PEC-Ref est à 34,0 %, une diminution devrait donc s'observer.

Sans EDA, PEC-5K présente en effet une augmentation légère de la proportion de carbones aliphatiques (CC,CH, 31,8 %) quand PEC-Ref plafonne à 23,2 %. Le taux d'azote se situe autour de 8,6 % contre 4,4 % avant traitement. Cet azote se montre majoritairement non protoné, ce qui est cohérent avec des azotes sous forme d'amides. Enfin la baisse

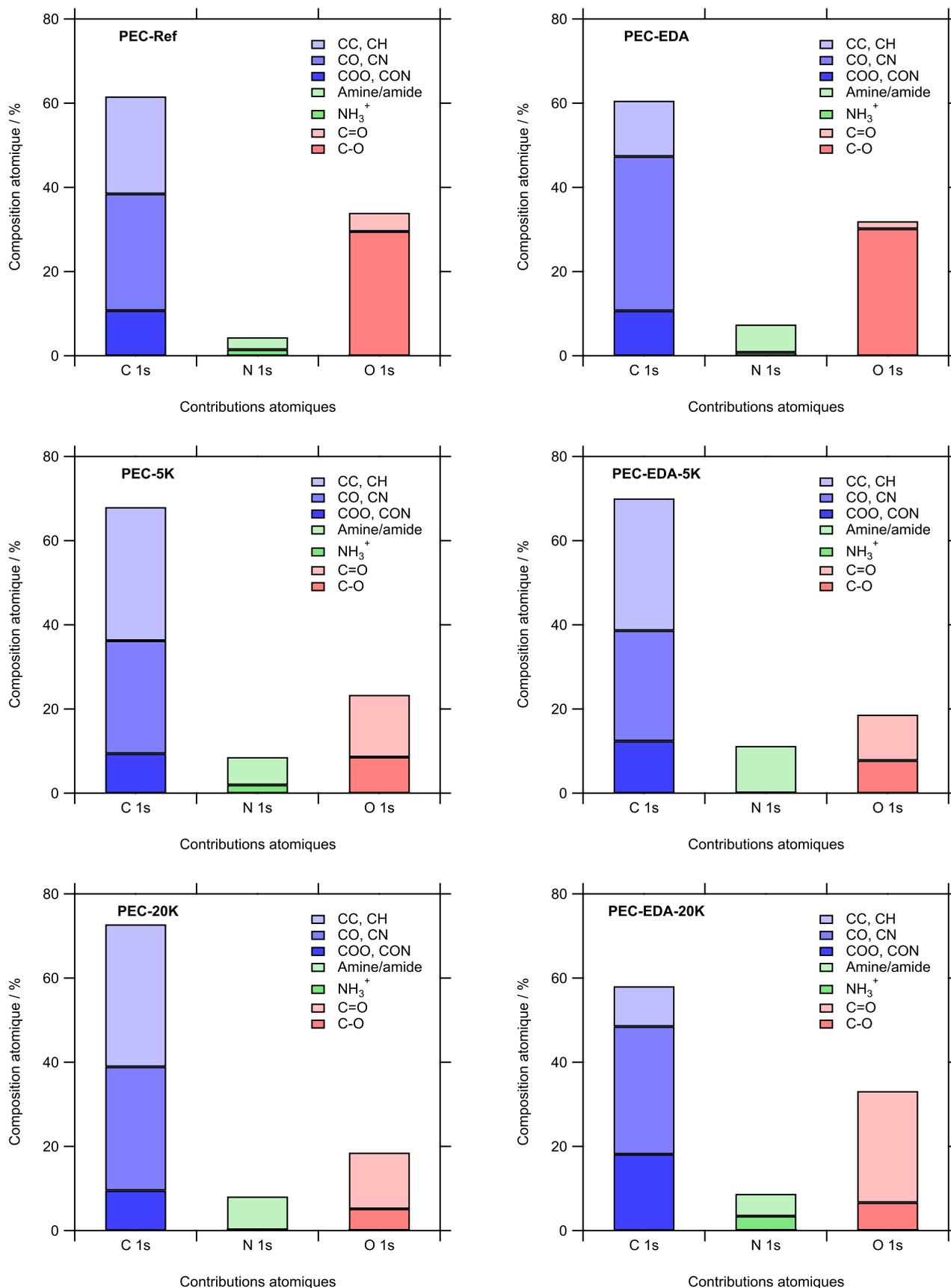


FIGURE 3.37 – Spectroscopies XPS des échantillons avant (PEC-Ref et PEC-EDA) et après greffage de PNIPAM-COOH, avec (PEC-EDA-5K et PEC-EDA-20K) ou sans (PEC-5K et PEC-20K) diamine. «Protonée» se réfère aux amines NH<sub>3</sub><sup>+</sup>.

du taux d'oxygène (23,4 %) combinée à l'augmentation parallèle de la proportion de ces oxygènes sous forme de C=O est attribuée aux amides du PNIPAM et confirme la présence du polymère en surface. Les mêmes observations peuvent être faites sur l'analyse de PEC-20K : augmentation des CC,CH (33,8 %), du pourcentage d'azote (8,1 %) dont la large majorité est neutre ainsi qu'une forte diminution de la composition en oxygène (18,6 %), majoritairement sous forme C=O. La nature des signaux entre PEC-5K et PEC-20K montre que l'augmentation de la masse du PNIPAM-COOH n'empêche pas le greffage de ce dernier. La proportion légèrement supérieure des carbones sous forme aliphatique (CC,CH, bleu clair) ainsi que l'absence d'azote sous forme  $\text{NH}_3^+$  pour PEC-20K est cohérent avec une épaisseur de PNIPAM en surface plus importante du fait de la taille du polymère plus élevée ( $M_n = 24\ 000\ \text{g/mol}$ , contre  $5\ 000\ \text{g/mol}$  pour PEC-5K). Néanmoins, l'analyse XPS sur plusieurs points d'un même échantillon peut montrer des variations légères qui ne permettent pas de conclure avec certitude sur une épaisseur de PNIPAM plus importante pour PEC-20K.

Le greffage de PNIPAM sur des surfaces de PEC préalablement greffées avec de l'EDA (figure 3.37, PEC-EDA) doit donner lieu aux mêmes variations de signaux que cité précédemment. On retrouve en effet une augmentation de la proportion de carbones sous forme aliphatique ainsi qu'une augmentation du taux d'azote qui atteint 11,3 % pour PEC-EDA-5K. La proportion d'azote est en outre majoritairement sous forme neutre, cohérente avec les amides du PNIPAM. Les oxygènes ne représentent que 18,7 % de la composition quand PEC-EDA exhibe pas moins de 32 %. Le ratio entre oxygènes sous formes C-O et C=O, majoritaire pour PEC-EDA, se retrouve de plus inversé dans le cas de PEC-EDA-5K. Tous les signaux concordent et la présence du PNIPAM en surface semble donc sans ambiguïté. **Il semble que la limitation du greffage préalablement observée lors de l'utilisation d'une diamine soit bien due à des phénomènes de pontage, et que l'augmentation de la concentration en EDA permette d'outrepasser ce phénomène.** En comparant PEC-5K et PEC-EDA-5K, il est difficile d'affirmer avec certitude que la densité de greffage, c'est-à-dire la quantité de PNIPAM-COOH greffée, est plus importante dans le cas de l'utilisation de l'EDA. Toutefois, la proportion plus importante d'amines neutres ainsi que la plus forte diminution d'oxygène pourrait indiquer une densité de greffage plus importante pour PEC-EDA-5K du fait de l'augmentation de la quantité d'amines en surface apportées par l'EDA.

La spectroscopie XPS de PEC-EDA-20K révèle des signaux plus ambigus. La proportion des carbones aliphatiques diminue nettement au détriment des CO,CN et COO,CON. En outre, bien que la composition en azote augmente (8,8 % contre 7,4 % pour PEC-EDA), le pourcentage des amines/amides neutres diminue (5,3 % contre 6,62 %). L'apport d'azote provient majoritairement d'amines protonées  $\text{NH}_3^+$  et ne peut donc pas être attribuée aux amides du PNIPAM. L'oxygène en surface représente environ 30 % de la composition et reste ainsi constant comparé à PEC-EDA. La nature des oxygènes varie cependant fortement avec un rapport largement majoritaire pour les C=O (26,5 %) au détriment des

C-O (6,7 %). L'ensemble de ces éléments ne permet pas de conclure à la présence de PNIPAM en surface. A l'inverse, il n'est pas non plus possible de l'exclure. La modification des signaux de l'oxygène tend à supposer la présence du PNIPAM. Le signal du carbone montre une proportion de COO,CON plus importante que pour les autres échantillons. La baisse du signal des aliphatiques rend peu probable la présence de NHS en surface. L'XPS étant une mesure d'extrême surface, il se peut que la conformation du polymère, de taille plus importante que pour PEC-EDA-5K, entraîne une modification des signaux mesurés en exhibant ses fonctions amides plutôt que ses fonctions aliphatiques. Cette hypothèse reste délicate dans la mesure où une exposition prononcée de ces fonctions augmenterait le signal des azotes neutre, ce qui n'est pas le cas ici. Les signaux mesurés en surface pourraient tout aussi bien correspondre à un mélange des différents réactifs. Dans ce cas, la combinaison EDA et PNIPAM-COOH de masse molaire élevée limiterait le taux de greffage, probablement du fait de contraintes stériques plus importantes liées à l'encombrement des fonctions réactives des PECs par les chaînes d'EDA et à des longueurs de chaînes grandes pour le PNIPAM. L'état de surface de PEC-EDA-20K reste quoi qu'il en soit plus incertain que pour les autres échantillons.

Le greffage pour PEC-5K, PEC-EDA-5K et PEC-20K semble avoir été efficace. Bien que les analyses effectuées sur PEC-EDA-20K soient plus ambiguës, tous ces matériaux seront évalués *in vitro*. La taille du polymère greffé ainsi que la densité de greffage supposée liée à l'utilisation d'une diamine pourront ainsi être évaluées en termes de bioadhésion thermorégulée. Avant cela, il convient toutefois de considérer que la présence de PNIPAM en surface peut modifier les propriétés du matériau au détriment de l'application visée qui, nous le rappelons, consiste à élaborer un pansement chirurgical thermosensible. Nous avons en effet déjà vu que la structure du matériau pouvait légèrement influencer la cinétique de libération de l'éosine (voir section 2.4.2.4). Le relargage de cette molécule active hydrophile pourrait être ralenti par une surface de PECs devenant hydrophobe au-delà de 32 °C. La cinétique de relargage pendant 48 h est présentée figure 3.38. Il apparaît alors que la modification de surface n'influence pas la diffusion de l'éosine au cours du temps. Cet aspect est important puisqu'il est souhaitable que la modification de surface apporte des propriétés avancées de bioadhésion thermorégulée sans altérer les propriétés intrinsèques de la matrice.

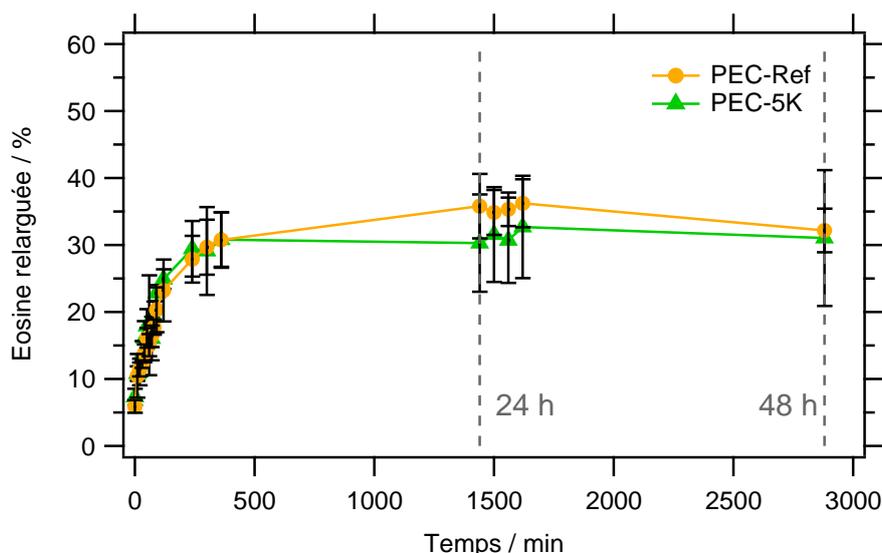


FIGURE 3.38 – Libération d'éosine, en pourcentage d'éosine incorporée, en fonction du temps, à 37 °C, avant (PEC-Ref) et après (PEC-5K) modification de surface.

### 3.4 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons vu la polymérisation RAFT du NIPAM dans différentes conditions. Entre autres, le solvant s'est montré important et un solvant non adapté empêche la polymérisation ou limite son contrôle. La compatibilité du solvant dépend des réactifs employés (monomère, initiateur, CTA). Le THF s'est montré adéquat pour la polymérisation contrôlée du PNIPAM. Si de petites quantités sont relativement aisées à polymériser, l'augmentation des quantités produites complique le contrôle de la taille du polymère obtenu. La diminution de la diffusion thermique est un des facteurs réduisant le contrôle qui conduit à l'augmentation des IP<sub>s</sub> obtenus. L'abaissement de la température permet d'outrepasser ce phénomène. Les différentes conditions utilisées ont finalement permis de synthétiser plusieurs tailles de PNIPAM fonctionnalisés R-COOH, oscillant entre 20 000 et 30 000 g/mol. La polymérisation en milieu aqueux, à température ambiante, pourrait permettre d'outrepasser la limitation à 30 000 g/mol des PNIPAM obtenues, en évitant les phénomènes de transfert au solvant (coefficient de transfert de l'eau nul).

Avant de s'intéresser à la modification de surface des films de PEC, le travail sur des gels puis sur des surfaces simples a permis de comprendre un peu mieux les mécanismes en jeu et les paramètres impactants. Le DMSO est un solvant intéressant puisque, contrairement à l'eau, il n'engendre pas le gonflement des matrices PECs. Il s'est avéré être un solvant adapté à la réaction d'amidification par couplage NHS/EDC. Le couplage NHS/EDC s'est montré quant à lui plus apte à réagir sur des surfaces d'alginate que le CDI. Enfin, la modification des surfaces PECs a nécessité d'être optimisée avant de parvenir au greffage efficace du PNIPAM. La densité de greffage semble pouvoir être modulée par l'utilisation d'une diamine servant à augmenter le nombre d'amines en surface. Son utilisation requiert cependant des concentrations élevées pour éviter un éventuel pontage et une pas-

sivation des surfaces. Les polymères synthétisés par polymérisation RAFT se sont montrés fonctionnels et l'un d'entre eux (PNI-3,  $M_n = 24\,000$  g/mol) a pu être greffé à la surface des PECs, en plus d'un polymère commercial de plus petite taille ( $M_n = 5\,000$  g/mol).

Des surfaces présentant des densités de greffage ainsi que des tailles de polymère greffé diverses ont ainsi pu être élaborées. Bien que cela ait été pris en compte dans le choix des différents réactifs, il reste cependant à vérifier que les matériaux développés ne soient pas cytotoxiques. Les propriétés de ces surfaces doivent aussi être étudiées afin de vérifier si elles permettent une bioadhésion thermorégulée. Ces points ont été évalués dans le chapitre à suivre.

## Références

- [1] V. Mars. Charte Des Blocs Operatoires De L ' Assistance Publique – Hôpitaux De Marseille. 2013. [130](#)
- [2] G. Conzatti, S. Cavalie, C. Combes, J. Torrisani, N. Carrere, et A. Tourrette. PNIPAM grafted surfaces through ATRP and RAFT polymerization : Chemistry and bioadhesion. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, 151 :143–155, 2017. [130](#), [131](#), [133](#)
- [3] D. Kessler et P. Théato. Temperature-Responsive Surface Coatings Based on Poly(methylsilsesquioxane)-hybrid Polymers. *Macromolecular Symposia*, 249-250 (1) :424–430, 2007. [130](#)
- [4] M. A. Cooperstein et H. E. Canavan. Assessment of cytotoxicity of (N-isopropyl acrylamide) and Poly(N-isopropyl acrylamide)-coated surfaces. *Biointerphases*, 8(1) :19, 2013. [130](#), [144](#)
- [5] P. Shivapooja, L. K. Ista, H. E. Canavan, et G. P. Lopez. ARGET–ATRP Synthesis and Characterization of PNIPAAm Brushes for Quantitative Cell Detachment Studies. *Biointerphases*, 7(1-4) :1–9, 2012. [133](#), [144](#)
- [6] Y. Yang, X. Song, L. Yuan, M. Li, J. Liu, R. Ji, et H. Zhao. Synthesis of PNIPAM polymer brushes on reduced graphene oxide based on click chemistry and RAFT polymerization. *Journal of Polymer Science Part A : Polymer Chemistry*, 50(2) :329–337, 2012. [133](#), [155](#)
- [7] C. Barner-Kowollik, T. P. Davis, J. P. a. Heuts, M. H. Stenzel, P. Vana, et M. Whittaker. RAFTing down under : Tales of missing radicals, fancy architectures, and mysterious holes. *Journal of Polymer Science, Part A : Polymer Chemistry*, 41(3) :365–375, 2003.
- [8] A. Veloso, W. Garcia, A. Agirre, N. Ballard, F. Ruiperez, J. C. de la Cal, et J. M. Asua. Determining the effect of side reactions on product distributions in RAFT polymeri-

- zation by MALDI-TOF MS. *Polymer Chemistry*, 6(30) :5437–5450, 2015. [133](#), [134](#), [136](#), [138](#), [140](#), [143](#)
- [9] H. Takahashi, M. Nakayama, M. Yamato, et T. Okano. Controlled chain length and graft density of thermoresponsive polymer brushes for optimizing cell sheet harvest. *Biomacromolecules*, 11 :1991–1999, 2010. [133](#)
- [10] X. Hao, M. H. Stenzel, C. Barner-Kowollik, T. P. Davis, et E. Evans. Molecular composite materials formed from block copolymers containing a side-chain liquid crystalline segment and an amorphous styrene/maleic anhydride segment. *Polymer*, 45 (22) :7401–7415, 2004. [134](#), [138](#)
- [11] P. Vana, L. Albertin, L. Barner, T. P. Davis, et C. Barner-Kowollik. Reversible addition-fragmentation chain-transfer polymerization : Unambiguous end-group assignment via electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Polymer Science, Part A : Polymer Chemistry*, 40(22) :4032–4037, 2002. [134](#), [138](#)
- [12] F. Audouin et A. Heise. Surface-initiated RAFT polymerization of NIPAM from monolithic macroporous polyHIPE. *European Polymer Journal*, 49(5) :1073–1079, 2013. [134](#), [135](#), [152](#)
- [13] J. Bigot, D. Fournier, J. Lyskawa, T. Marmin, F. Cazaux, G. Cooke, et P. Woisel. Synthesis of thermoresponsive phenyl- and naphthyl-terminated poly(NIPAM) derivatives using RAFT and their complexation with cyclobis(paraquat-p-phenylene) derivatives in water. *Polymer Chemistry*, 1(7) :1024–1029, 2010. [134](#), [135](#), [142](#)
- [14] Y. Sugihara, P. O'Connor, P. B. Zetterlund, et F. Aldabbagh. Chain transfer to solvent in the radical polymerization of N-isopropylacrylamide. *Journal of Polymer Science, Part A : Polymer Chemistry*, 49(8) :1856–1864, 2011. [134](#), [138](#)
- [15] M. Benaglia, E. Rizzardo, A. Alberti, et M. Guerra. Searching for more effective agents and conditions for the RAFT polymerization of MMA : Influence of dithioester substituents, solvent, and temperature. *Macromolecules*, 38(8) :3129–3140, 2005. [134](#)
- [16] F. P. Byrne, S. Jin, G. Paggiola, T. H. M. Petchey, J. H. Clark, T. J. Farmer, A. J. Hunt, C. Robert McElroy, et J. Sherwood. Tools and techniques for solvent selection : green solvent selection guides. *Sustainable Chemical Processes*, 4(1) :7, 2016. [134](#)
- [17] C. Barner-Kowollik, editor. *Handbook of RAFT Polymerization*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2008. [136](#), [138](#)
- [18] S. R. S. Ting, T. P. Davis, et P. B. Zetterlund. Retardation in RAFT polymerization : Does cross-termination occur with short radicals only? *Macromolecules*, 44(11) : 4187–4193, 2011. [136](#)

- [19] M. Zhang et W. H. Ray. Modeling of “Living” Free-Radical Polymerization with RAFT Chemistry. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 40(20) :4336–4352, 2001. [136](#)
- [20] J. Xu, J. He, D. Fan, W. Tang, et Y. Yang. Thermal decomposition of dithioesters and its effect on RAFT polymerization. *Macromolecules*, 39(11) :3753–3759, 2006. [136](#), [140](#)
- [21] X. Zhang, O. Giani, S. Monge, et J. J. Robin. RAFT polymerization of N,N-diethylacrylamide : Influence of chain transfer agent and solvent on kinetics and induction period. *Polymer*, 51(14) :2947–2953, 2010. [138](#)
- [22] E. Grau, J. P. Broyer, C. Boisson, R. Spitz, et V. Monteil. Free ethylene radical polymerization under mild conditions : The impact of the solvent. *Macromolecules*, 42(19) : 7279–7281, 2009. [138](#)
- [23] S. I. Cauët et K. L. Wooley. Kinetic investigation of the RAFT polymerization of p-acetoxystyrene. *Journal of Polymer Science Part A : Polymer Chemistry*, 48(12) :2517–2524, 2010. [142](#)
- [24] C.-J. Huang et F.-C. Chang. Polypeptide Diblock Copolymers : Syntheses and Properties of Poly( N-isopropylacrylamide)- b-Polylysine. *Macromolecules*, 41(19) :7041–7052, 2008. [143](#)
- [25] B. Wang, Z. Cai, N. Zhang, B. Zhang, D. Qi, C. Zhao, et H. Na. Fully aromatic naphthalene-based sulfonated poly(arylene ether ketone)s with flexible sulfoalkyl groups as polymer electrolyte membranes. *RSC Adv.*, 5(1) :536–544, 2015. [144](#)
- [26] Y. Akiyama, A. Kikuchi, M. Yamato, et T. Okano. Ultrathin Poly( N - isopropylacrylamide) Grafted Layer on Polystyrene Surfaces for Cell Adhesion/Detachment Control. *Langmuir*, 20(13) :5506–5511, 2004. [144](#)
- [27] C. a. G. N. Montalbetti et V. Falque. Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron*, 61(46) :10827–10852, 2005. [146](#), [148](#), [149](#)
- [28] T. M. Schmeing et V. Ramakrishnan. What recent ribosome structures have revealed about the mechanism of translation. *Nature*, 461(7268) :1234–1242, 2009. [146](#)
- [29] S. Zuffanti. Preparation of Acyl Chlorides with Thionyl Chloride. *J. Chem. Educ.*, 25 (9) :481, 1948. [148](#)
- [30] J. Clayden, N. Greeves, et S. G. Warren. *Organic chemistry*. Oxford University Press, 2e edition edition, 2012. [148](#)
- [31] J. R. G. Navarro, G. Conzatti, Y. Yu, B. Fall, R. Mathew, M. Eden, et L. Bergström. Multi-color fluorescent labelling of cellulose nanofibrils by click-chemistry Multi-color fluorescent labelling of cellulose nanofibrils by click-chemistry. 2015. [148](#)

- [32] Z. Wang. *Schotten-Baumann Reaction*. John Wiley & Sons, Inc., 2010. [148](#)
- [33] M. R. Kasaai, J. Arul, et G. Charlet. Fragmentation of chitosan by acids. *The Scientific World Journal*, 2013, 2013. [149](#)
- [34] S. Holtan, Q. Zhang, W. I. Strand, et G. Skjåk-Bræk. Characterization of the hydrolysis mechanism of polyalternating alginate in weak acid and assignment of the resulting MG-oligosaccharides by NMR spectroscopy and ESI - Mass spectrometry. *Biomacromolecules*, 7(7) :2108–2121, 2006. [149](#)
- [35] Z. Ahmad, J. H. Shepherd, D. V. Shepherd, S. Ghose, S. J. Kew, R. E. Cameron, S. M. Best, R. A. Brooks, J. Wardale, et N. Rushton. Effect of 1-ethyl-3- ( 3-dimethylaminopropyl ) carbodiimide and N -hydroxysuccinimide concentrations on the mechanical and biological characteristics of cross-linked collagen fibres for tendon repair. (May) :77–85, 2015. [149](#), [150](#)
- [36] T. Heinze, T. Liebert, et A. Koschella. *Esterification of polysaccharides*. Springer, 2006. [149](#)
- [37] J.-P. Chen et T.-H. Cheng. Thermo-responsive chitosan-graft-poly(N-isopropylacrylamide) injectable hydrogel for cultivation of chondrocytes and meniscus cells. *Macromolecular bioscience*, 6(12) :1026–39, 2006. [149](#), [152](#), [154](#), [155](#)
- [38] L. Zhao, Y. Wu, S. Chen, et T. Xing. Preparation and characterization of cross-linked carboxymethyl chitin porous membrane scaffold for biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*, 126 :150–155, 2015.
- [39] J.-P. Chen, C.-Y. Kuo, et W.-L. Lee. Thermo-responsive wound dressings by grafting chitosan and poly(N-isopropylacrylamide) to plasma-induced graft polymerization modified non-woven fabrics. *Applied Surface Science*, 262 :95–101, 2012.
- [40] S. Sakai, I. Hashimoto, et K. Kawakami. Synthesis of an agarose-gelatin conjugate for use as a tissue engineering scaffold. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 103 (1) :22–26, 2007. [150](#)
- [41] N. Taheri et Q. Sahar. Synthesis and characterization of gelatin nanoparticles using CDI / NHS as a non-toxic cross-linking system. pages 63–69, 2011. [150](#)
- [42] H. Chen, S. Cui, Y. Zhao, C. Zhang, S. Zhang, et X. Peng. Grafting Chitosan with Polyethylenimine in an Ionic Liquid for Efficient Gene Delivery. *Plos One*, 10(4) : e0121817, 2015. [149](#), [150](#)
- [43] S. Boufi et S. Alila. Modified Cellulose Fibres as a Biosorbent for the Organic Pollutants. *Biopolymers : Biomedical and Environmental Applications*, (i) :483–524, 2011. [149](#)

- [44] T. Heinze, T. Liebert, et A. Koschella. *Esterification of Polysaccharides*. Springer Laboratory. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, 2006. 150
- [45] N. Z. Burns, P. S. Baran, et R. W. Hoffmann. Redox economy in organic synthesis. *Angewandte Chemie - International Edition*, 48(16) :2854–2867, 2009.
- [46] V. R. Pattabiraman et J. W. Bode. Rethinking amide bond synthesis. *Nature*, 480 (7378) :471–479, 2011. 149
- [47] S. K. Verma, R. Ghorpade, A. Pratap, et M. P. Kaushik. CDI-mediated monoacylation of symmetrical diamines and selective acylation of primary amines of unsymmetrical diamines. *Green Chem.*, 14(2) :326–329, 2012. 149
- [48] S. Alila, A. M. Ferraria, A. M. Botelho do Rego, et S. Boufi. Controlled surface modification of cellulose fibers by amino derivatives using N,N-carbonyldiimidazole as activator. *Carbohydrate Polymers*, 77(3) :553–562, 2009. 149, 150, 165
- [49] S. K. Verma, R. Ghorpade, A. Pratap, et M. Kaushik. Solvent free, N,N-carbonyldiimidazole (CDI) mediated amidation. *Tetrahedron Letters*, 53(19) :2373–2376, 2012. 150
- [50] N. Nakajima, Y. Ikada, B. Engineering, R. June, I. Carbodiimides, et D. Zadeh. Mechanism of Amide Formation by Carbodiimide for Bioconjugation in Aqueous Media. *Bioconjugate Chemistry*, pages 123–130, 1995. 150, 153, 154, 162
- [51] K. Nam, T. Kimura, et A. Kishida. Controlling Coupling Reaction of EDC and NHS for Preparation of Collagen Gels Using Ethanol / Water Co-Solvents. pages 32–37, 2008. 150, 152, 167
- [52] I. Filpponen, H. Sadeghifar, et D. S. Argyropoulos. Photoresponsive Cellulose Nanocrystals. *Regular Paper*, 1(1) :34–43, 2011. 152
- [53] S. V. Sambasivarao. NIH Public Access. 18(9) :1199–1216, 2013. 152
- [54] S. Indulekha, P. Arunkumar, D. Bahadur, et R. Srivastava. Thermoresponsive polymeric gel as an on-demand transdermal drug delivery system for pain management. *Materials Science and Engineering : C*, 62 :113–122, 2016. 152, 155
- [55] K. Nam, T. Kimura, et A. K. Ā. Preparation and characterization of cross-linked collagen – phospholipid polymer hybrid gels. 28 :1–8, 2007. 152, 153
- [56] J. Lahiri, L. Isaacs, J. Tien, et G. M. Whitesides. A strategy for the generation of surfaces presenting ligands for studies of binding based on an active ester as a common reactive intermediate : A surface plasmon resonance study. *Analytical Chemistry*, 71 (4) :777–790, 1999. 152

- 
- [57] J. Credou, H. Volland, J. Dano, et T. Berthelot. A one-step and biocompatible cellulose functionalization for covalent antibody immobilization on immunoassay membranes. *Journal of Materials Chemistry B*, 1(26) :3277, 2013. [152](#)
- [58] T. Qu, A. Wang, J. Yuan, J. Shi, et Q. Gao. Preparation and characterization of thermo-responsive amphiphilic triblock copolymer and its self-assembled micelle for controlled drug release. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, 72(1) :94–100, 2009. [154](#)
- [59] M. Klein Gunnewiek, A. Di Luca, X. Sui, C. A. van Blitterswijk, L. Moroni, et G. J. Vancso. Controlled Surface Initiated Polymerization of N-Isopropylacrylamide from Polycaprolactone Substrates for Regulating Cell Attachment and Detachment. *Israel Journal of Chemistry*, 52(3-4) :339–346, 2012.
- [60] R. Umapathi, P. M. Reddy, A. Kumar, P. Venkatesu, et C.-J. Chang. The biological stimuli for governing the phase transition temperature of the "smart" polymer PNIPAM in water. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 135 :588–595, 2015. [154](#)
- [61] G. Lawrie, I. Keen, B. Drew, A. Chandler-Temple, L. Rintoul, P. Fredericks, et L. Grøndahl. Interactions between alginate and chitosan biopolymers characterized using FTIR and XPS. *Biomacromolecules*, 8(8) :2533–2541, 2007. [155](#), [159](#), [166](#)
- [62] M. R. Kasaai. A review of several reported procedures to determine the degree of N-acetylation for chitin and chitosan using infrared spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, 71(4) :497–508, 2008. [155](#)
- [63] A. C. Kumar, H. B. Bohidar, et A. K. Mishra. The effect of sodium cholate aggregates on thermoreversible gelation of PNIPAM. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, 70 (1) :60–67, 2009. [155](#)
- [64] M. W. Frey, L. Li, M. Xiao, et T. Gould. Dissolution of cellulose in ethylene diamine/salt solvent systems. *Cellulose*, 13(2) :147–155, 2006. [159](#)
- [65] Y. Li et H. Ishida. Concentration-dependent conformation of alkyl tail in the nanoconfined space : Hexadecylamine in the silicate galleries. *Langmuir*, 19(6) :2479–2484, 2003.
- [66] R. Heacock et L. Marion. The infrared spectra of secondary amines et leurs sels. *Canadian Journal of Chemistry*, 1956. [159](#)
- [67] R. S. H. Yangt, R. R. Maronpott, J. A. Mckelvey, C. S. Well, et M. D. Woodside. Acute and Subchronic Toxicity of Ethylenediamine in Laboratory Animals. *Fundamental and applied toxicology*, 3 :512–520, 1983. [162](#)

- [68] Z. Ma, Z. Mao, et C. Gao. Surface modification and property analysis of biomedical polymers used for tissue engineering. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, 60(2) : 137–157, 2007. [163](#), [164](#)
- [69] P. Heinz, F. Brétagne, I. Mannelli, L. Sirghi, a. Valsesia, G. Ceccone, D. Gilliland, K. Landfester, H. Rauscher, et F. Rossi. Poly(N-isopropylacrylamide) grafted on plasma-activated poly (ethylene oxide) : Thermal response and interaction with proteins. *Langmuir*, 24(12) :6166–6175, 2008. [169](#)
- [70] I. Younes et M. Rinaudo. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Marine Drugs*, 13(3) :1133–1174, 2015. [174](#)

---

## Chapitre 4

# Propriétés de surface : influence du greffage de PNIPAM

### Sommaire

---

<b>4.1 Introduction</b> . . . . .	<b>189</b>
<b>4.2 Etudes <i>in vitro</i></b> . . . . .	<b>191</b>
4.2.1 Cytotoxicité . . . . .	191
4.2.2 Bioadhésion . . . . .	192
<b>4.3 Vers l'adhésion de surface</b> . . . . .	<b>196</b>
4.3.1 Adhésion physique . . . . .	196
4.3.2 Adhésion à l'organe : études <i>ex vivo</i> . . . . .	201
<b>4.4 Conclusion</b> . . . . .	<b>203</b>
<b>Références</b> . . . . .	<b>204</b>

---

## 4.1 Introduction

Nous avons vu, dans le chapitre précédent, le greffage de **PNIPAM** sur des films de **PECs** par différents protocoles. Quatre types d'échantillons ont été réalisés, en variant deux paramètres : la taille des «peignes» (chaînes de **PNIPAM**) et la densité de greffage. Plus en détail, les polymères de masses moléculaires d'environ 5 000 g/mol et 24 000 g/mol ont été greffés dans le but d'obtenir des tailles de «peignes» d'environ 5 nm et 20 nm, respectivement [1]. On sait que la taille du **PNIPAM** en surface est cruciale : une taille trop petite ne permet pas d'obtenir un effet thermosensible sur la bioadhésion, tandis qu'une taille trop importante tend à la supprimer, quelle que soit la température [2, 3]. Le passage par une étape intermédiaire consistant à greffer une diamine, l'EDA, à la surface des **PECs**, doit, supposément, augmenter la densité de greffage du **PNIPAM** grâce à l'augmentation de la quantité de fonctions amines en surfaces (figure 4.1). De même pour la taille, la densité peut avoir un impact conséquent sur les propriétés bioadhésives : une

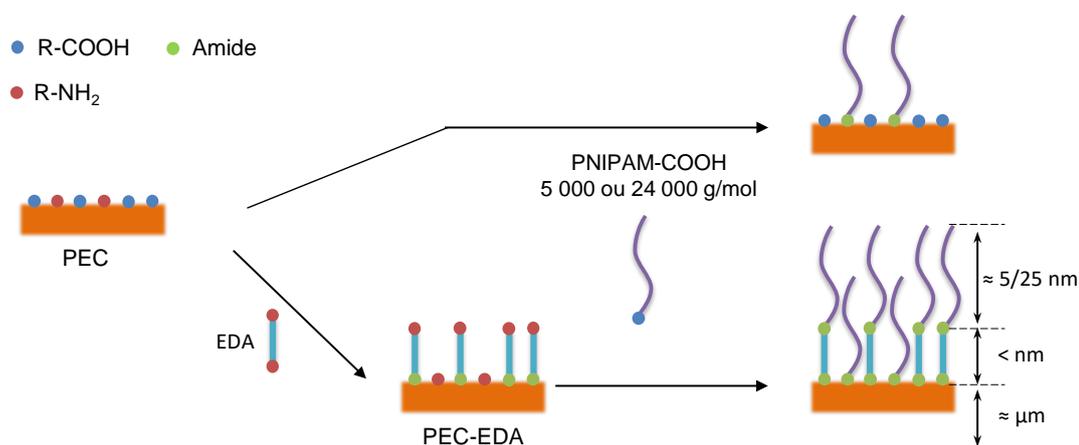


FIGURE 4.1 – Stratégies de greffage du PNIPAM sur les surfaces PECS. Deux paramètres sont variés : la taille du polymère greffé (5 000 g/mol ou 24 000 g/mol) et le greffage préalable d'EDA, censé augmenter la densité de greffage. Les différents éléments ne sont pas dessinés à l'échelle et les ordres de grandeur mentionnés ne sont que des approximations.

quantité suffisante de chaînes de **PNIPAM** est nécessaire pour obtenir une surface thermosensible, tandis qu'une quantité trop importante tend à réduire le nombre de cellules adhérentes [4].

Dans cette partie, 4 biomatériaux présentant des longueurs de chaînes et des densités de greffage différentes seront caractérisés (tableau 4.1). En premier lieu, il s'agira de s'assurer de la non-cytotoxicité des biomatériaux par des études *in vitro*. Les propriétés bioadhésives seront ensuite évaluées par tests cellulaires. Enfin, les interactions entre les surfaces développées et différentes surfaces modèles seront caractérisées en termes d'adhérence, avant, dans une dernière partie, de s'intéresser à leur bioadhésion par des expériences *ex vivo* sur des tissus biologiques.

TABLEAU 4.1 – Dénomination des échantillons.

Echantillon	Alginate/Chitosane <sup>1</sup>	CaCl <sub>2</sub>	PNIPAM (g/mol)	EDA
<b>PEC-Ref</b>	63/37	1 h 30	-	-
<b>PEC-5K</b>	63/37	1 h 30	5 000 <sup>2</sup>	-
<b>PEC-EDA-5K</b>	63/37	1 h 30	5 000 <sup>2</sup>	oui
<b>PEC-20K</b>	63/37	1 h 30	20 000 <sup>3</sup>	-
<b>PEC-EDA-20K</b>	63/37	1 h 30	20 000 <sup>3</sup>	oui

<sup>1</sup> m/m; <sup>2</sup> commercial; <sup>3</sup> PNI-3

## 4.2 Etudes *in vitro*

### 4.2.1 Cytotoxicité

Avant tout essai de bioadhésion, il convient d'évaluer la cytotoxicité potentielle des différents biomatériaux élaborés. En effet, plusieurs étapes peuvent s'avérer critiques quant à la toxicité résultante des biomatériaux finaux. En premier lieu, le **PNIPAM** polymérisé par **RAFT** doit être exempt de monomère et de THF, cytotoxiques, bien que cela ai été vérifié section 3.2.2 [5]. Ensuite, la synthèse utilisée pour le greffage du **PNIPAM**, commercial ou synthétique, implique pour certains des biomatériaux l'utilisation d'EDA, un composé toxique ayant des effets néfastes pouvant apparaître par exemple lors de l'ingestion de doses inférieures à 1 g/kg/jours [6]. L'étude de la prolifération et de la survie cellulaire est donc indispensable avant toute autre considération biologique.

Des cellules hPNE (cellules immortalisées, issues du canal pancréatique HUMAIN, 10 000 cellules par puits de culture) ont été mises en culture en présence d'un échantillon de biomatériau (environ 5 mm de côté) et laissées incuber pendant 4 jours. Le but de l'étude est alors d'évaluer un éventuel effet négatif des substances potentiellement relarguées par les biomatériaux dans le milieu de culture. Après 4 jours, le nombre de cellules vivantes est comparé à une expérience contrôle, réalisée sans biomatériau (figure 4.2). Arbitrairement, le contrôle est fixé à 100 %. Les échantillons présentent alors tous des taux de

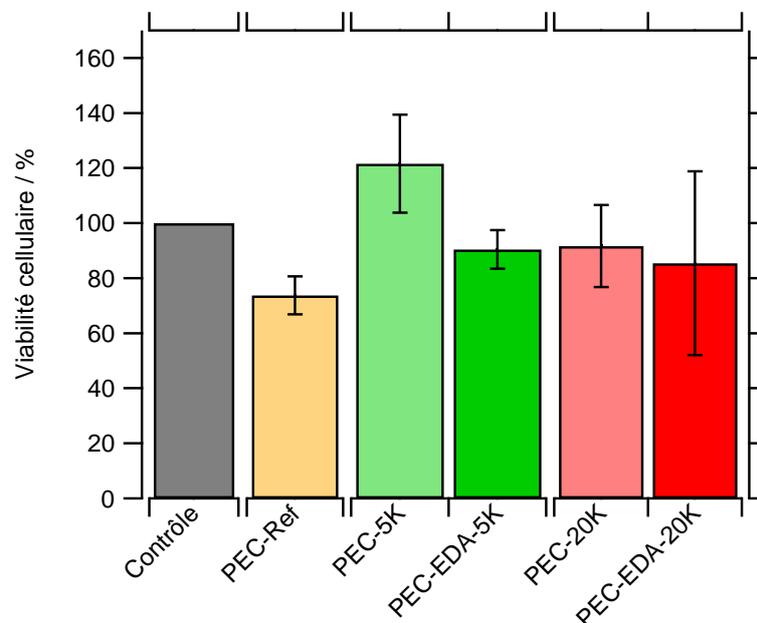


FIGURE 4.2 – Quantification, en pourcentage, du nombre de cellules hPNE après 4 jours de culture en présence d'un biomatériau comparé à un contrôle, sans biomatériau. Le nombre de cellules vivantes comptées prend en compte la survie cellulaire ainsi que la prolifération pendant le temps d'incubation.

viabilité cellulaire et de prolifération supérieurs à 70 %. L'ISO 10993-5 recommande un taux qui ne doit pas descendre en dessous de 70 %, auquel cas une cytotoxicité peut être suspectée [7]. Il ne semble donc pas qu'il y ait de problèmes cytotoxiques, quel que soit l'échantillon. La combinaison entre l'utilisation d'un polymère commercial (5K) et l'absence d'EDA conduit aux taux de viabilités cellulaires les plus élevés (PEC-5K). En comparaison, l'utilisation d'un PNIPAM synthétique (PEC-20K et PEC-EDA-20K) ou de l'EDA (PEC-EDA-5K et PEC-EDA-20K) diminue légèrement la viabilité tout en restant proche des contrôles.

### 4.2.2 Bioadhésion

Comme vu précédemment (section 1.4.3), le greffage de PNIPAM est connu dans la littérature pour conférer un effet thermosensible de la bioadhésion cellulaire. Cette bioadhésion dépend cependant de plusieurs facteurs tels que la longueur des chaînes du PNIPAM greffé ainsi que la densité de greffage [3]. Les différents échantillons ont donc été comparés. Pour ce faire, des cellules hPNE sont déposées sur les biomatériaux (50 000 cellules par puits). La bioadhésion est un processus qui se déroule dès les toutes premières heures après l'ensemencement des cellules [8]. Afin de s'affranchir des phénomènes de prolifération et de ne mesurer que la bioadhésion, la culture n'est maintenue que pendant 8 H. Au bout de ce temps, le milieu est aspiré et les cellules non adhérentes aux matériaux sont éliminées par 2 rinçages au PBS. L'expérience est réalisée à deux températures, au-dessous (27 °C) et au-dessus (37 °C) de la LCST du PNIPAM. Les surfaces sont alors observées au microscope à fluorescence (figure 4.3). Il semble alors que les surfaces PEC-Ref (sans greffage de PNIPAM) soient plus bioadhésives à 27 °C qu'à 37 °C. En plus du nombre de cellules plus faible à 37 °C, ces dernières tendent à se regrouper sous forme de cluster, ce qui souligne le manque d'affinité de ces cellules envers leur substrat (figure 4.3, a et b). Ce résultat est surprenant si l'on considère que le milieu à 37 °C est plus favorable au bien-être cellulaire. Il est d'ailleurs à noter que des cultures à 27 °C, sur des temps plus longs (plusieurs jours), ont donné lieu à une mortalité très élevée des cellules : cette température n'est ainsi pas propice à la survie cellulaire. Dans tous les cas, le greffage de PNIPAM, quelle que soit la stratégie employée, tend à limiter l'adhésion cellulaire à basse température (figure 4.3, c-j). Dans un même temps, il semble que dans certains cas, notamment pour PEC-5K et PEC-20K, le nombre de cellules à 37 °C est plus important qu'à 27 °C, avec un étalement cellulaire qui tend à soutenir la bonne affinité des cellules envers les biomatériaux (figure 4.3, d et h). L'observation morphologique des cellules reste cependant limitée du fait de la diffusion lumineuse au travers des échantillons polymériques qui limite la netteté d'image, la source d'excitation se situant sous les échantillons. De plus, les échantillons présentent des inhomogénéités importantes de la répartition des cellules sur leurs surfaces. Il s'agit alors de quantifier, sur plusieurs champs, le nombre de cellules moyen par unité de surface afin de vérifier les premières observations.

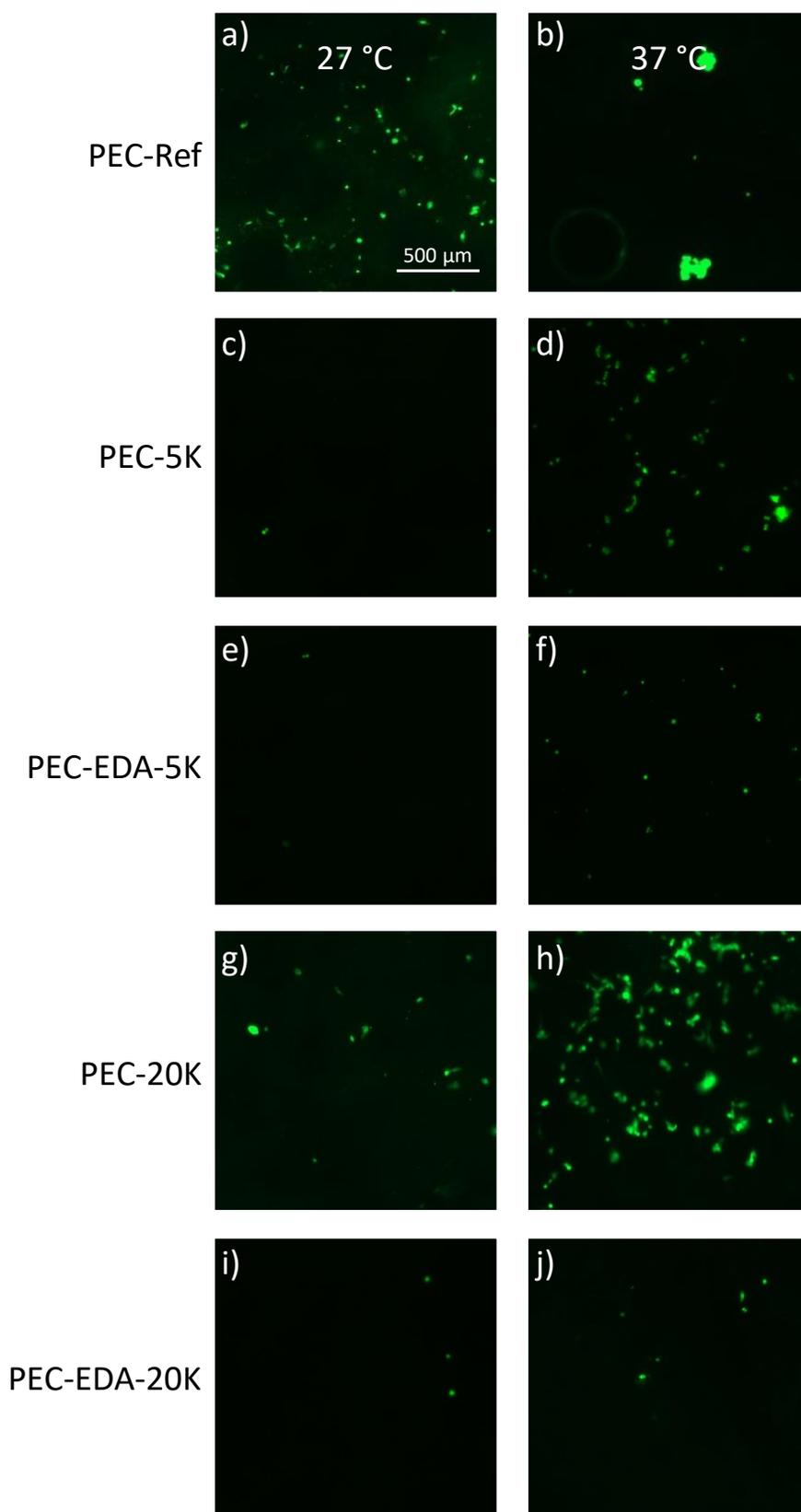


FIGURE 4.3 – Microscopie à fluorescence des surfaces, à 27 °C et 37°C, de (a et b, contrôle) PEC-Ref, (c et d) PEC-5K, (e et f) PEC-EDA-5K, (g et h) PEC-20K et (i et j) PEC-EDA-20K, après culture pendant 8 H et rinçage. Les images sont représentatives mais ne rendent pas compte de l'inhomogénéité de la répartition des cellules en surface.

La figure 4.4 présente le résultat de la quantification, à partir de micrographies à fluorescence (6 par échantillon et par expérience), du nombre de cellules présentes sur les surfaces lors de trois expériences distinctes. Tout d'abord, les observations directes d'images semblent se confirmer, avec un plus grand nombre de cellules adhérentes sur PEC-Ref à 27 °C qu'à 37 °C, et ce lors des trois expériences (figure 4.4, a-c). Le nombre de cellules présentes après rinçage à 27 °C diminue aussi drastiquement lorsque du PNIPAM est greffé sur la surface, notamment pour les expériences 1 et 2. Toujours pour les expériences 1 et 2, le nombre de cellules adhérentes à 37 °C sur les PECs modifiés (PEC-5K, PEC-EDA-5K et PEC-20K) reste inférieur ou proche du nombre de cellules présentes sur les surfaces PEC-Ref à 27 °C. Cette dernière observation n'est cependant pas reproductible sur toutes

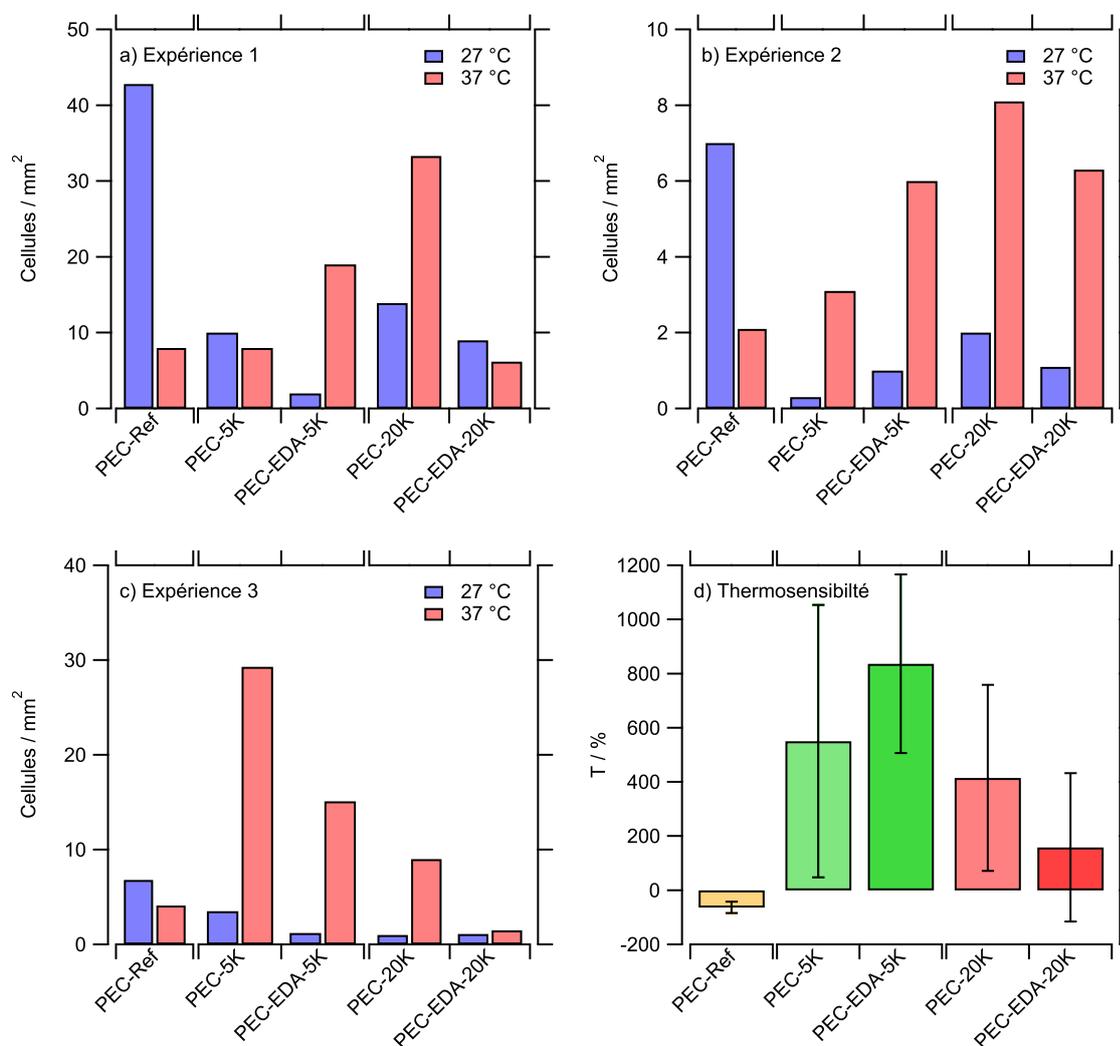


FIGURE 4.4 – (a, b et c) Quantification en nombre de cellules par unité de surface à deux températures : l'expérience est répétée 3 fois. (d) Thermosensibilité moyenne des trois expériences, entre 27 °C et 37 °C, du nombre de cellules hPNE après 8 H de culture, calculée via la formule 4.1. PEC-Ref est utilisé comme contrôle.

les expériences puisque l'expérience 3 révèle l'inverse. La thermosensibilité, c'est à dire le gain, en pourcentage, entre le nombre de cellules,  $Q$ , à 27 °C et 37 °C a alors été calculée selon l'équation :

$$\text{Thermosensibilité } T (\%) = \frac{Q(37) - Q(27)}{Q(27)} \times 100 \quad (4.1)$$

La thermosensibilité négative pour PEC-Ref se situe autour de -64 % et traduit une perte de près de deux tiers des cellules présentes sur la surface entre 37 °C et 27 °C. Il est délicat d'apporter une hypothèse à ce phénomène, mais il est possible qu'une température basse ralentisse les cinétiques de formation de clusters (amas cellulaires), plus aptes à être éjectés de la surface lors des phases de lavage. Pour 3 des 4 PECs modifiés (PEC-5K, PEC-EDA-5K et PEC-20K), l'effet thermosensible s'inverse et devient positif, atteignant pas loin de 840 % pour PEC-EDA-5K, soit une multiplication par environ 9,5 du nombre de cellules à 37 °C, comparé à 27 °C. PEC-EDA-20K présente un gain thermosensible d'environ 160 %, mais l'écart-type statistique important rend difficile sa quantification. Il faut d'ailleurs prendre en compte la variabilité de l'expérience. En premier lieu, l'élaboration des biomatériaux, multi étape, implique une variabilité probablement importante entre les différents biomatériaux. Ensuite, la culture d'organismes vivants peut entraîner des problèmes de reproductibilité. Enfin, la méthode de quantification reste un point qui inclut une part d'erreur à la fois liée aux champs considérés, bien qu'aléatoires, mais aussi au comptage à partir des images. En effet, le comptage est réalisé par traitement d'image. Le traitement automatisé des images permet de systématiser la procédure et de s'affranchir d'écarts éventuels entre le traitement de deux images mais il s'avère que, en l'état, la discrimination entre deux cellules accolées est délicate et le nombre de cellules comptées, dans le cas de surfaces chargées, peut parfois être ainsi sous-estimé. Il n'en demeure pas moins que la répétabilité de l'effet thermosensible ainsi que le contrôle des résultats de comptages obtenus en tenant en compte de l'observation microscope confirment un effet thermosensible favorable pour les échantillons PEC-5K, PEC-EDA-5K et PEC-20K. Enfin, il semble que si l'on compare PEC-5K et PEC-EDA-5K, l'augmentation supposée de la quantité de PNIPAM greffé via l'utilisation de l'EDA tend à augmenter l'effet thermosensible, bien que la différence statistique ne soit pas nette. En revanche, l'augmentation de la taille (PEC-20K) peut limiter cet effet, comme attendu au vu de la littérature [2, 3]. Pour PEC-EDA-20K, la combinaison d'une taille plus élevée et d'une densité de greffage plus importante diminue encore la thermosensibilité observée, voire la supprime. Dans un premier temps, il faut prendre en considération le greffage peut-être moins efficace du PNIPAM pour PEC-EDA-20K, observé par XPS lors du chapitre précédent qui peut donner lieu à des états de surfaces plus variables. Dans le cas où du PNIPAM serait bien présent en surface, la taille importante ainsi que le taux de greffage élevé pourraient toutefois conduire à une gêne stérique de la pénétration protéique nécessaire à l'adhésion cellulaire dans la couche de PNIPAM greffée. Afin d'aller plus loin, l'interaction des

échantillons présentant un comportement thermosensible, à savoir PEC-5K, PEC-EDA-5K et PEC-20K, avec des surfaces modèles a été étudiée avant de s'intéresser à l'adhésion tissulaire.

## 4.3 Vers l'adhésion de surface

### 4.3.1 Adhésion physique

Avant d'étudier les comportements d'interaction avec des tissus biologiques, il est intéressant d'étudier les interactions avec des surfaces modèles dont la nature et les caractéristiques sont connues, telles que le polyméthacrylate de méthyle (PMMA), le titane et le polytétrafluoroéthylène (Téflon).

Avant tout, l'hydrophilicité des biomatériaux préparés a été étudiée. La figure 4.5 représente l'angle de contact d'une goutte d'eau statique mesurée, à 25 °C, sur les PECs ayant subi différents traitements de surface en comparaison avec le PEC non modifié (PEC-Ref). 3 échantillons ont été analysés pour chaque type de biomatériau, avec 3 mesures par échantillon. Les matériaux étant absorbants, les mesures sont effectuées après le même laps de temps (500 ms) à partir de la dépose de la goutte. Pour rappel, la limite entre caractère hydrophile et hydrophobe se situe à 90 °C.

Le PEC-Ref présente un angle de contact de  $51,2^\circ \pm 6,1$  et est donc relativement hydrophile. La modification de surface diminue cependant l'hydrophilie de surface, avec des angles mesurés oscillants entre  $65,3^\circ \pm 8,1$  (PEC-20K) et  $74,7^\circ \pm 10,1$  (PEC-EDA-20K), sans qu'il y ait de différence statistique significative entre les différents échantillons. La nature même des PECs en fait des biomatériaux riches en charges électriques, avec un al-

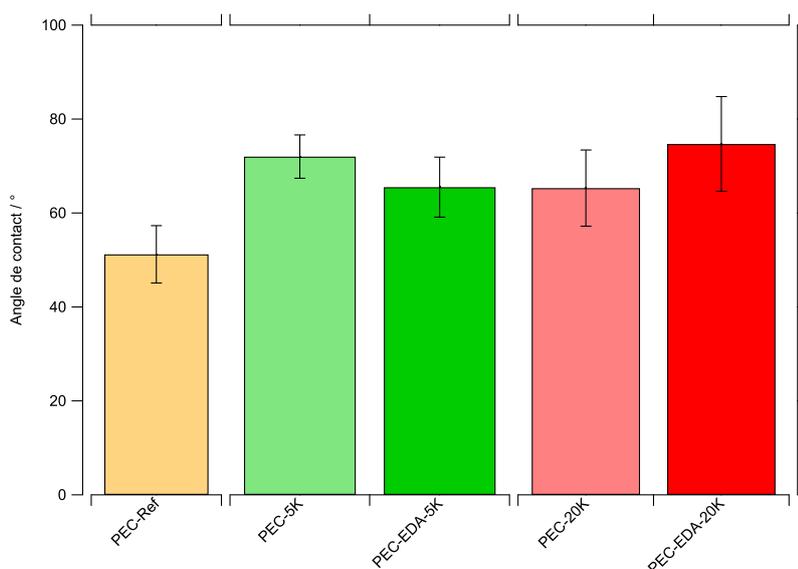


FIGURE 4.5 – Angle de contact, à 25 °C, d'une goutte d'eau sur les PECs avant (PEC-Ref) et après modification (PEC-5K, PEC-EDA-5, PEC-20K et PEC-EDA-20K).

ginate anionique et un chitosane cationique. Le recouvrement de ces polysaccharides par une couche de **PNIPAM** greffée diminue la densité de charge et peut expliquer la diminution de l'hydrophilie. L'angle mesuré pour PEC-EDA-20K est similaire aux autres échantillons greffés, ce qui relativise les résultats d'**XPS** présentés dans le chapitre précédent, qui laissaient sous-entendre que le greffage de cet échantillon était peut-être inefficace. L'**XPS** est en effet une mesure d'extrême surface très sensible aux pollutions de surface et un doute peut subsister quant à l'état réel de la surface des matériaux analysés.

Dans la littérature, les angles de contact mesurés sur les surfaces greffées de **PNIPAM** varient fortement en fonction du substrat, mais l'ordre de grandeur des angles mesurés ici semble cohérent [9, 10]. La longueur des chaînes de **PNIPAM** ainsi que la densité de greffage peuvent aussi avoir un impact sur les mesures d'angles, ce qui ne semble pas être le cas ici. Les variations généralement observées restent cependant faibles pour ces gammes de poids moléculaires du **PNIPAM**, avec des variations de quelques degrés seulement [2]. La rugosité importante ainsi que le caractère absorbant de la surface des biomatériaux ici développés ne permet pas de s'affranchir d'une amplitude de mesure de l'ordre d'une dizaine à une vingtaine de degrés, ce qui rend difficile l'observation de variations subtiles. De plus, l'effet thermosensible n'a pas pu être observé, du fait de la difficulté de réaliser la mesure à température contrôlée. En effet, les gouttes utilisées pour ce type de mesure possèdent une inertie thermique proche de zéro du fait de leurs faibles volumes (1  $\mu\text{L}$ ). L'utilisation de la technique de la bulle captive, qui peut permettre de pallier ce problème, est quant à elle rendue difficile sur des biomatériaux polymères (gonflement, maintien en place) et cette technique n'a pour le moment pas pu être utilisée de manière fiable sur les **PECs** ici présentés. Au-delà de la possibilité de réaliser des mesures fiables, la variation de l'angle de contact attendue, au vu de la littérature, ne serait que de quelques degrés et la différenciation entre les deux températures serait certainement délicate, au vu des erreurs de mesures liées aux problèmes mentionnés ci-avant [2, 9, 10]. L'augmentation de l'hydrophobicité de surface au-delà de la **LCST** du **PNIPAM** n'a donc pas pu être observée et, bien qu'information importante, ne pourra donc que rester à l'état d'hypothèse pour les analyses suivantes.

Des études d'adhérence entre les différentes surfaces développées et des surfaces modèles ont été réalisées. L'hydrophilie de trois matériaux, à savoir du polyméthacrylate de méthyle (PMMA), du titane (Ti) et du polytétrafluoroéthylène (Téflon, aussi appelé PTFE) a tout d'abord été estimée par mesure d'angle de contact (figure 4.6, a). Avec un angle de goutte d'eau autour de  $70,5^\circ$ , la surface du PMMA est la plus hydrophile. Les gouttes déposées sur la surface de titane (Ti) montrent des angles autour de  $85,9^\circ$ , la surface est donc intermédiaire, tandis que le Téflon est hydrophobe avec des angles autour de  $105,1^\circ$ . Il apparaît alors que ces trois types de matériaux offrent des surfaces modèles variées en termes d'hydrophilicité, avec un gradient hydrophile décroissant  $\text{PMMA} > \text{Ti} > \text{Téflon}$ . L'observation au **MEB** des surfaces montre quant à elle des rugosités différentes pour les trois matériaux qui suivent l'ordre croissant  $\text{PMMA} < \text{Téflon} < \text{Ti}$  (figure 4.6, b). La rugosité

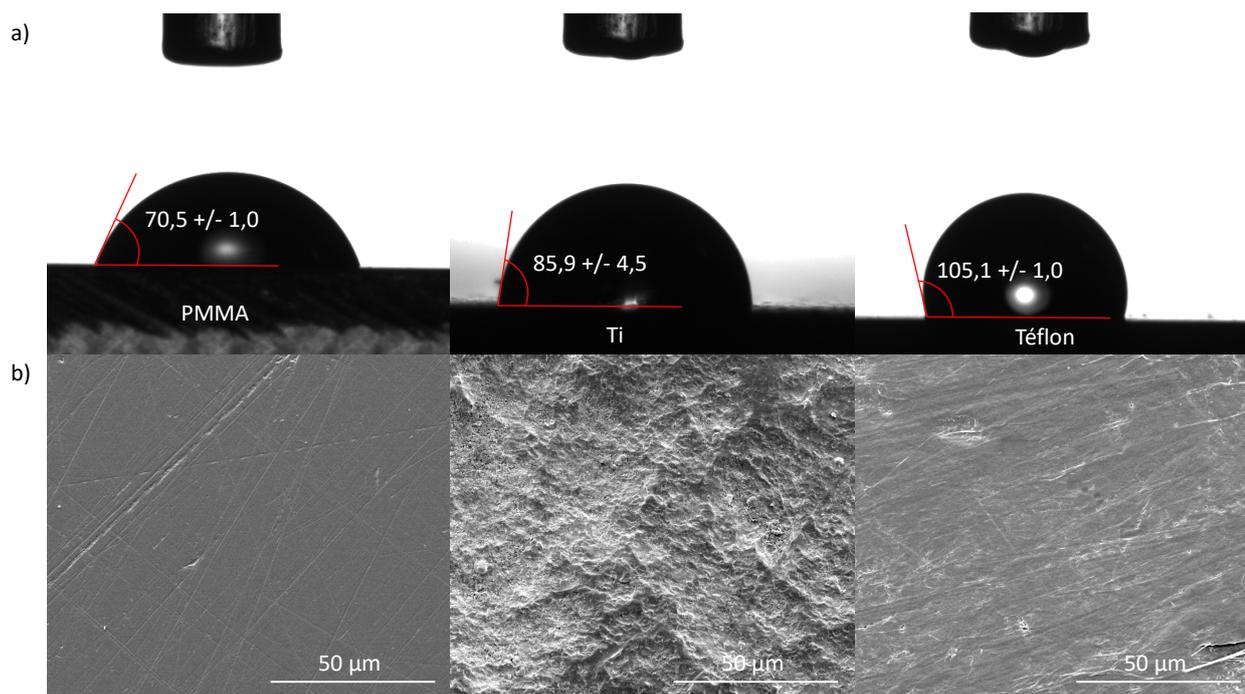


FIGURE 4.6 – Caractérisation des surfaces modèles avec (a) l’angle de goutte d’eau sur les différentes surfaces modèles, à 25 °C, et (b) les micrographies MEB des surfaces associées.

doit être prise en compte puisqu’une rugosité importante risque d’augmenter l’interface entre les biomatériaux et les surfaces modèles.

L’adhérence entre les surfaces modèles et les PECs a alors été mesurée en milieu aqueux, à 25 °C et 40 °C (figure 4.7). Rappelons que la LCST du PNIPAM se situe aux alentours de 32 °C [11]. Afin de mesurer l’adhérence, les PECs et les surfaces modèles sont mis en contact pendant 5 minutes, avec une force d’application de 500 g, dans un milieu aqueux thermostaté. Les biomatériaux sont ensuite séparés et la force nécessaire à cette séparation, c’est-à-dire l’adhérence, est mesurée. Notons que l’adhérence entre les surfaces modèles et les échantillons PEC-EDA-20K, dont l’analyse XPS et les résultats de bioadhésion cellulaire sont plus ambigus quant à la présence du PNIPAM en surface, n’a pas été étudiée.

Dans le cas du PMMA, modérément hydrophile (figure 4.7, a), on remarque que si PEC non modifié (PEC-Ref) ne présente pas de différence d’adhérence entre 25 °C et 40 °C, la modification de surface par le biais de PNIPAM à 5 000 g/mol semble induire une thermosensibilité avec une plus grande affinité à la température élevée (PEC-5K et PEC-EDA-5K). L’utilisation de l’EDA tend cependant à diminuer grandement la force d’adhérence, quelle que soit la température, comparée aux biomatériaux préparés sans EDA. Les PECs greffés avec du PNIPAM à 20 000 g/mol (PEC-20K) présentent quant à eux des énergies d’adhérence bien plus faibles, sans effet de la température.

Dans le cas du titane (figure 4.7, b), on observe une inversion des tendances, avec une plus grande adhérence à froid pour PEC-Ref. Cet effet est d’autant plus marqué pour PEC-5K tandis que les autres échantillons ne présentent que de très faibles énergies d’adhé-

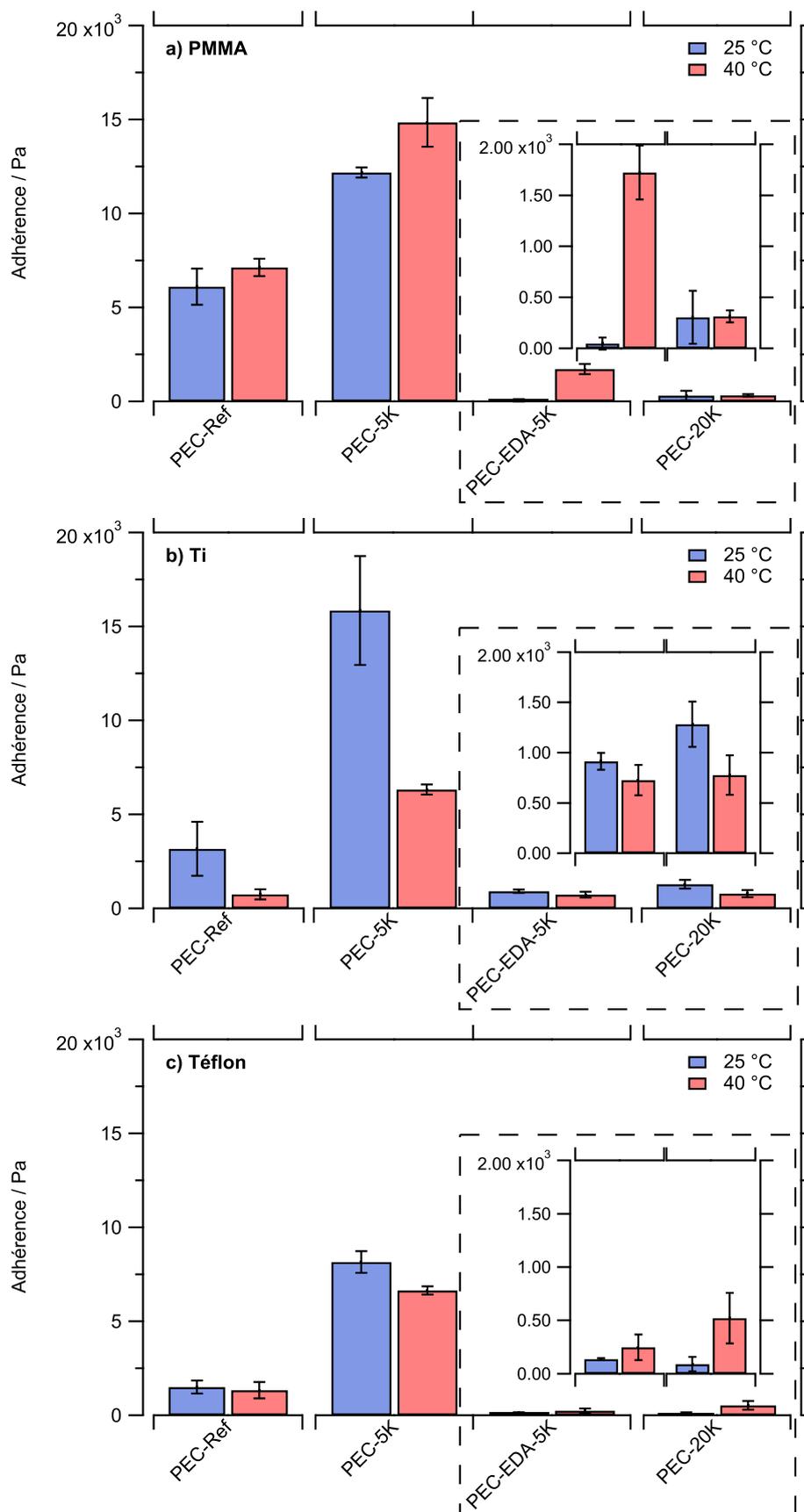


FIGURE 4.7 – Mesure de l'adhérence entre des surfaces modèles et les PECs, à 25 °C et 40 °C, sans et avec modifications de surface.

rence, inférieures à 2 000 Pa, avec un très léger effet thermosensible pour PEC-20K. Il en est de même pour les surfaces de Téflon (figure 4.7, c), avec des adhérences plus fortes à 25 °C pour PEC-5K. L'adhérence semble cependant plus importante à 40 °C pour PEC-20K, bien que les valeurs mesurées soient faibles ce qui rend la différence observée plus discutable. Enfin, la plus grande thermosensibilité d'adhérence observée entre PEC-5K et Ti, comparé aux autres surfaces modèles, pourrait être attribuée à la plus grande rugosité, et donc interface de contact, des surfaces de titane.

Il est difficile d'établir des tendances tant les résultats paraissent disparates. Il apparaît tout de même que l'augmentation de l'hydrophobicité de la surface modèle (PMMA < Ti < Téflon) semble corrélée avec la diminution de l'adhérence, quelle que soit la température et indépendamment des rugosités observées au MEB, des PEC-Ref. Considérant le caractère hydrophile de ces derniers, il semble donc que, de manière logique, les interactions type hydrophiles/hydrophiles sont plus favorables que les interactions hydrophiles/hydrophobes. De plus, pour les PECs modifiés, les surfaces plus hydrophiles (PMMA) tendent à favoriser l'adhésion à 40 °C tandis que les surfaces plus hydrophobes (Ti, Téflon) favorisent les interactions à froid. Le PNIPAM étant censé devenir hydrophobe au-delà de 32 °C, cette dernière observation semble contredire le caractère favorable des interactions hydrophiles/hydrophiles (dipôles/dipôles, liaisons hydrogène) ou hydrophobes/hydrophobes (Van der Waals) et il semble donc que l'augmentation supposée de l'hydrophobie de la surface des PECs rendent plus favorable l'interaction avec les surfaces hydrophiles (PMMA). Ne disposant pas de données concernant l'angle de contact des surfaces de PECs à 40 °C, il est difficile d'affirmer ou d'infirmer l'augmentation de l'hydrophobicité de surface liée au passage de la LCST du PNIPAM. Les phénomènes d'interactions peuvent cependant être plus complexes, avec des phénomènes d'hydratation de la couche superficielle externe du PNIPAM greffé.

On sait en effet que la transition du PNIPAM est un phénomène complexe, impliquant des interactions polymère/eau à basse température avec la formation de liaison polymère/polymère au passage de la LCST [12]. Ce phénomène est endothermique et nécessite de casser les liaisons hydrogène que le PNIPAM forme avec l'eau. On sait en outre que le PNIPAM est par exemple capable de former des liaisons hydrophobes avec de l'urée tétraméthylée [13]. Dans ce cas, on observe une diminution de l'enthalpie de transition. L'interaction avec l'urée tétraméthylée empêche donc en partie le PNIPAM d'interagir avec l'eau. De plus, les anions tendent à déstabiliser, par polarisation, les liaisons hydrogène polymère/eau. D'autres auteurs pensent que le PNIPAM, l'eau et les anions présents forment trois types de liaisons compétitives, PNIPAM/eau, anion/eau et PNIPAM/anion [14]. Enfin, on sait que l'utilisation du PNIPAM sous forme de copolymère peut modifier sa LCST en favorisant par exemple les interactions intramoléculaires [15].

On voit donc que les espèces présentes peuvent influencer sur le comportement de transition. On pourrait alors, par exemple, supposer qu'au-dessous de la LCST, le PNIPAM, via ses fonctions amides, se lie favorablement à son substrat PEC d'alginate/chitosane,

hydrophile et apte à former des liaisons hydrogène. Le substrat serait donc en compétition avec l'eau. La surface exhiberait alors une couche externe plus hydrophobe, comme observé précédemment par angle de contact (figure 4.5). Au passage de la LCST, le PNIPAM pourrait alors, comme c'est le cas classique, former des interactions intra et intermoléculaires avec lui même. Externalisant ses groupements hydrophobes, il serait alors en interaction défavorable à la fois avec le milieu aqueux mais aussi avec son substrat PEC. Des interactions hydrophiles, favorables avec le PMMA, hydrophobes, favorables avec le Ti et le Téflon pourraient alors apparaître. Dans la littérature, il a déjà été supposé que, pour des chaînes de polymère courtes, le PNIPAM greffé pouvait interagir avec son substrat [16]. Si ce n'est qu'une hypothèse loin de pouvoir être démontrée, l'augmentation de la taille des chaînes de PNIPAM (PEC-20K) ainsi que de la densité de greffage (PEC-EDA-5K) diminueraient l'interaction des chaînes avec leur substrat ainsi que leur liberté conformationnelle. On retrouverait ainsi pour ces deux échantillons, dans le cas de contact avec des surfaces plus marquées en termes d'hydrophilicité (PMMA) ou d'hydrophobicité (Téflon), un comportement plus classique du PNIPAM, ce qui n'est cependant observé que dans le cas du Téflon (figure 4.7, c). En contrepartie, au vu d'une plus faible liberté conformationnelle du PNIPAM à la surface de ces deux biomatériaux, ses interactions avec les surfaces modèles ainsi que l'effet de la transition sur ces forces d'interactions apparaissent globalement moins marqués.

### 4.3.2 Adhésion à l'organe : études *ex vivo*

Un des objectifs de ce projet, qui vise au développement d'un biomatériau aidant à la prévention des fistules pancréatiques, est d'obtenir, afin d'en faciliter la pose, une bioadhésion thermorégulée à l'organe. Plus précisément, il s'agit de montrer des propriétés bioadhésives plus importantes au-dessus de la LCST du PNIPAM. Des essais *in vivo* nécessiteraient l'obtention d'autorisations suivant des études *in vitro* poussées. Des études *ex vivo* peuvent néanmoins permettre d'obtenir une première idée du comportement des biomatériaux envers des tissus biologiques. Des organes porcins, à savoir un foie et un pancréas, fraîchement extraits, ont été utilisés pour mener des tests d'adhérence, de la même manière que lors des essais réalisés sur les surfaces modèles (figure 4.8).

La figure 4.9 présente les mesures d'adhérence entre les différents PECs et deux organes, à savoir le foie et le pancréas. Concernant le foie, on n'observe pas de différence entre les essais réalisés à 25 °C et 40 °C pour PEC-Ref avec une adhérence plafonnant autour de 4 000 Pa. PEC-5K, PEC-EDA-5K et PEC-20K montrent quant à eux une différence nette entre les énergies d'adhésion mesurées aux deux températures, avec des valeurs plus basses pour les températures élevées. Il semble donc qu'une température au-dessus de la LCST du PNIPAM défavorise les interactions entre le tissu et la surface du biomatériau.

Les données obtenues sur le pancréas sont plus ambiguës, ce qui démontre l'impor-

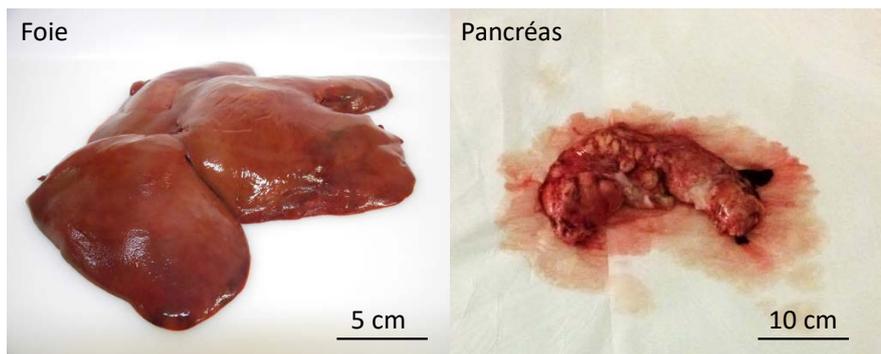


FIGURE 4.8 – A droite, un foie et, à gauche, un pancréas de porc.

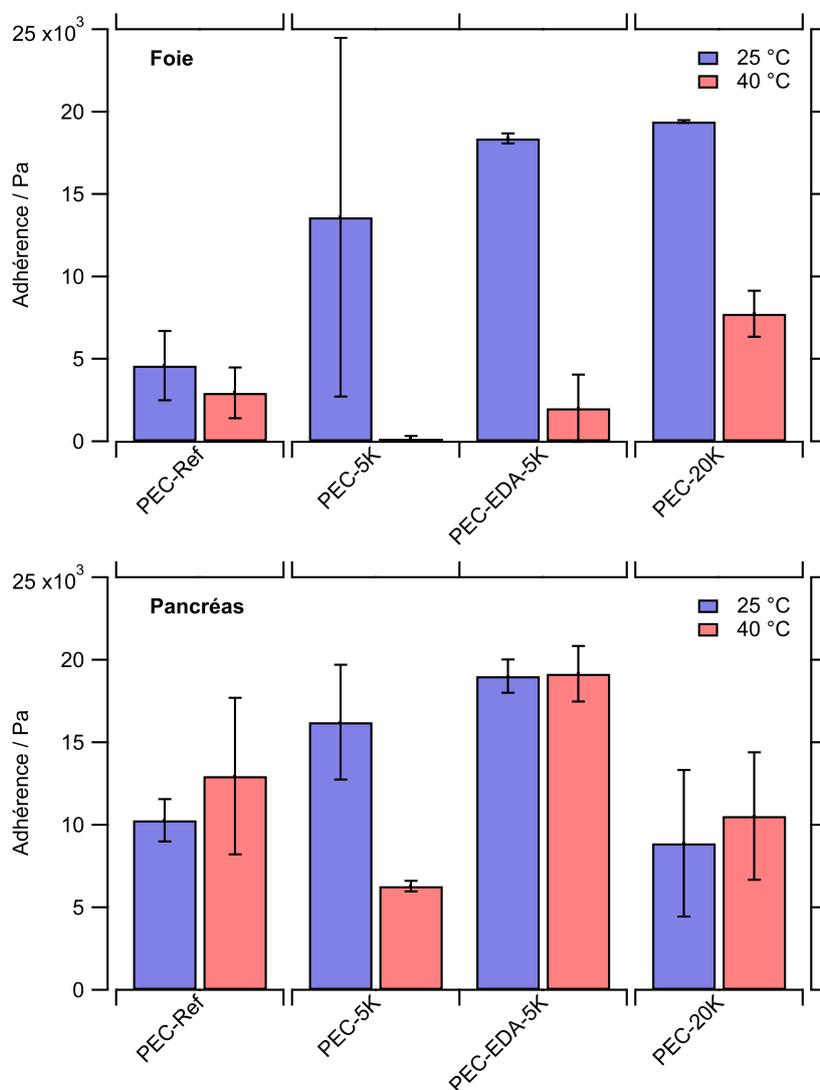


FIGURE 4.9 – Mesure de l'adhérence, *ex vivo*, entre des tissus et les PECs, à 25 °C et 40 °C, avant et après modification.

tance de la nature même de l'organe dans les phénomènes d'adhésions. Le seul échantillon qui semble montrer une thermosensibilité est PEC-5K, avec, une fois de plus, une forte diminution de la force d'adhérence, passant de 16 200 Pa à 25 °C à 6 200 Pa à 40 °C. Le temps de contact, de 5 min, est court, mais il a été démontré l'apparition d'une bioadhésion dès une minute à température au-dessus de la LCST pour des surfaces de PNIPAM [17]. Il est donc difficile de définir si l'effet observé est physique ou biologique.

Quoi qu'il en soit, bien que l'effet thermosensible semble favoriser les interactions d'adhésion à froid, l'adhérence obtenue peut paraître suffisante si l'on compare à des études cliniques qui considèrent des adhérences de l'ordre de 6 000 Pa comme suffisantes [18]. On peut aussi noter que des forces d'adhérence du même ordre de grandeur (25 000 Pa) ont été reportées pour des implants à base de PNIPAM mis au contact d'une rétine [17]. Finalement, d'un point de vue plus global, la comparaison entre l'adhérence à chaud et à froid observées ici semble indiquer que, pour les deux organes, l'augmentation de la quantité de PNIPAM en surface (PEC-5K < PEC-EDA-5K < PEC-20K) tend à évoluer vers une favorisation des interactions organes/biomatériau au-dessus de la LCST.

## 4.4 Conclusion

L'étude des propriétés de surface des PECs d'alginate/chitosane greffés PNIPAM a révélé des caractéristiques intéressantes.

Tout d'abord, aucun effet cytotoxique significatif n'a été observé. PEC-5K, PEC-EDA-5K et PEC-20K ont cependant montré des bioadhésions thermosensibles, avec une augmentation de l'adhésion cellulaire à 37 °C quand dans un même temps les PECs non modifiés (PEC-Ref) exhibent un comportement inverse.

L'étude de la mouillabilité (angle de contact) a démontré une diminution de l'hydrophilie des surfaces, à 25 °C, après le greffage du PNIPAM, ce qui s'explique par une diminution de la densité de charges en surface. Malheureusement, l'effet thermosensible sur l'hydrophilie de surface n'a pas pu être caractérisé.

Enfin, les études d'adhésion réalisées sur des surfaces modèles ainsi que sur des organes *ex vivo* ont révélé un comportement inattendu. L'augmentation de la température semble favoriser les interactions de surface des PECs greffés PNIPAM avec les surfaces hydrophiles, quand bien même l'augmentation supposée de l'hydrophobie de ces surfaces aux températures supérieures à la LCST suggérerait l'inverse. Il en va de même concernant la bioadhésion envers des tissus de foie et de pancréas, puisque cette dernière diminue au passage de la LCST. La bioadhésion dépend de nombreux facteurs, mais il est possible que l'hydrophilie de surface, qui n'a pas pu être mesurée au-dessus de 32 °C, soit plus favorable à la bioadhésion pour les températures inférieures à la LCST.

Il est de plus cohérent de s'interroger sur l'interaction entre les chaînes de PNIPAM greffée et leur substrat PEC. Il s'agit possiblement d'un phénomène clef qui, en influant sur les groupements externalisés en surface par le PNIPAM, joue un rôle important dans

la (bio)adhésion. D'un point de vue fondamental, la comparaison de différents substrats sur lesquels le même polymère serait greffé pourrait apporter des informations sur ces phénomènes d'interaction substrat/PNIPAM. Les PECs à base d'alginate et de chitosane donnent en effet lieu à des surfaces hautement polaires et des mesures de potentiel zêta informeraient sur les charges présentes en surface. Il serait alors intéressant de s'intéresser à des substrats polymères plus hydrophobes, ou inversement plus hydrophiles. En outre, ces interactions sont dépendantes de la taille des chaînes greffées. Des études plus poussées sur l'influence de la taille du PNIPAM pourraient apporter des informations complémentaires. Si ce type d'étude est relativement complexe à réaliser, la mesure de l'interaction entre l'extrême surface du matériau et, par exemple, des protéines, via des techniques d'AFM avancées pourrait permettre d'identifier quels groupements sont réellement externalisés, à l'état sec, par le PNIPAM. En milieu hydraté, les microbalances à quartz pourraient permettre d'observer l'adsorption protéique au-dessous et au-dessus de la LCST du PNIPAM, selon le substrat et la taille des chaînes greffées. Des molécules plus simples, hydrophiles ou hydrophobes pourraient aussi se substituer aux protéines pour les études d'interaction.

D'un point de vue plus applicatif, il semble que dans le cas des surfaces de PECs greffées, l'augmentation de la quantité de PNIPAM en surface tend à favoriser les interactions d'adhésion entre les organes étudiés et les biomatériaux au-dessus de la LCST. Il serait intéressant d'observer l'adhérence entre ces mêmes organes et des surfaces greffées avec des chaînes de PNIPAM de tailles plus importantes. De surcroît, les études de bioadhésion sur organes ont été réalisées *ex vivo*. Bien qu'une attention ait été portée au maintien de l'intégrité des organes utilisés, l'étude du comportement des biomatériaux dans des conditions *in vivo* pourrait donner lieu à des résultats bien différents.

## Références

- [1] P. Shivapooja, L. K. Ista, H. E. Canavan, et G. P. Lopez. ARGET-ATRP Synthesis and Characterization of PNIPAAm Brushes for Quantitative Cell Detachment Studies. *Biointerphases*, 7(1-4) :1-9, 2012. [189](#)
- [2] T. Zhao, H. Chen, J. Zheng, Q. Yu, Z. Wu, et L. Yuan. Inhibition of protein adsorption and cell adhesion on PNIPAAm-grafted polyurethane surface : Effect of graft molecular weight. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, 85(1) :26-31, 2011. [189](#), [195](#), [197](#)
- [3] G. Conzatti, S. Cavalie, C. Combes, J. Torrisani, N. Carrere, et A. Tourrette. PNIPAM grafted surfaces through ATRP and RAFT polymerization : Chemistry and bioadhesion. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, 151 :143-155, 2017. [189](#), [192](#), [195](#)
- [4] H. Takahashi, M. Nakayama, M. Yamato, et T. Okano. Controlled chain length and

- graft density of thermoresponsive polymer brushes for optimizing cell sheet harvest. *Biomacromolecules*, 11 :1991–1999, 2010. [190](#)
- [5] M. A. Cooperstein et H. E. Canavan. Assessment of cytotoxicity of (N-isopropyl acrylamide) and Poly(N-isopropyl acrylamide)-coated surfaces. *Biointerphases*, 8(1) :19, 2013. [191](#)
- [6] R. S. H. Yangt, R. R. Maronpott, J. A. Mckelvey, C. S. Well, et M. D. Woodside. Acute and Subchronic Toxicity of Ethylenediamine in Laboratory Animals. *Fundamental and applied toxicology*, 3 :512–520, 1983. [191](#)
- [7] ISO/EN10993-5. ISO/EN10993-5. *International Standard ISO 10993-5 Biological evaluation of medical devices - Part 5 : Tests for cytotoxicity : in vitro methods*, 3 Ed :42, 2009. [192](#)
- [8] K. Anselme, L. Ploux, et a. Ponche. Cell/Material Interfaces : Influence of Surface Chemistry and Surface Topography on Cell Adhesion. *Journal of Adhesion Science and Technology*, 24(5) :831–852, 2010. [192](#)
- [9] A. Mizutani, A. Kikuchi, M. Yamato, H. Kanazawa, et T. Okano. Preparation of thermoresponsive polymer brush surfaces and their interaction with cells. *Biomaterials*, 29(13) :2073–2081, 2008. [197](#)
- [10] L. Li, Y. Zhu, B. Li, et C. Gao. Fabrication of Thermoresponsive Polymer Gradients for Study of Cell Adhesion and Detachment. *Langmuir*, (24) :13632–13639, 2008. [197](#)
- [11] L. Moroni, M. Klein Gunnewiek, et E. M. Benetti. Polymer brush coatings regulating cell behavior : passive interfaces turn into active. *Acta biomaterialia*, 10(6) :2367–78, 2014. [198](#)
- [12] Y. Maeda, T. Nakamura, et I. Ikeda. Changes in the Hydration States of Poly( N - n - propylmethacrylamide) and Poly( N -isopropylmethacrylamide) during Their Phase Transitions in Water Observed by FTIR Spectroscopy. *Macromolecules*, 34(23) :8246–8251, 2001. [200](#)
- [13] L. Liu, Y. Shi, C. Liu, T. Wang, G. Liu, et G. Zhang. Insight into the amplification by methylated urea of the anion specificity of macromolecules. *Soft matter*, 10(16) : 2856–62, 2014. [200](#)
- [14] X.-j. Zhao et Z.-f. Gao. Role of hydrogen bonding in solubility of poly(N-isopropylacrylamide) brushes in sodium halide solutions. *Chinese Physics B*, 25(7) : 074703, 2016. [200](#)
- [15] M. Keerl, V. Smirnovas, R. Winter, et W. Richtering. Zuschriften Interplay between Hydrogen Bonding and Macromolecular Architecture Leading to Unusual Phase Behavior in Thermosensitive. *Angewandte Chemie*, (120) :344–347, 2008. [200](#)

- [16] Q. Yu, Y. Zhang, H. Chen, Z. Wu, H. Huang, et C. Cheng. Protein adsorption on poly(N-isopropylacrylamide)-modified silicon surfaces : Effects of grafted layer thickness and protein size. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, 76(2) :468–474, 2010. [201](#)
- [17] M. Tunc, X. Cheng, B. D. Ratner, E. Meng, et M. Humayun. Reversible thermosensitive glue for retinal implants. *Retina (Philadelphia, Pa.)*, 27 :938–942, 2007. [203](#)
- [18] M. Waring, S. Bielfeldt, et M. Brandt. Skin adhesion properties of three dressings used for acute wounds. *Wounds UK*, 5(3) :22–31, 2009. [203](#)

---

# Chapitre 5

## Matériel et méthodes

### Sommaire

---

<b>5.1 Introduction</b> . . . . .	<b>208</b>
<b>5.2 Chapitre 2</b> . . . . .	<b>208</b>
5.2.1 Matériel . . . . .	208
5.2.2 Gels et films d'alginate ou de chitosane . . . . .	208
5.2.3 Elaboration des PECs . . . . .	209
5.2.4 Séchage . . . . .	209
5.2.5 Caractérisations . . . . .	210
<b>5.3 Chapitre 3</b> . . . . .	<b>216</b>
5.3.1 Matériel . . . . .	216
5.3.2 Elaboration des films d'alginate . . . . .	216
5.3.3 Elaboration des films PECs . . . . .	217
5.3.4 Purification du NIPAM . . . . .	217
5.3.5 Polymérisation du PNIPAM : RAFT . . . . .	217
5.3.6 Modification des gels . . . . .	217
5.3.7 Gels de chitosane . . . . .	217
5.3.8 Gels d'alginate . . . . .	218
5.3.9 Modification de surface : alginate . . . . .	219
5.3.10 Modification de surface des PECs : influence d'un traitement acide sur l'efficacité de greffage . . . . .	219
5.3.11 Modification de surface des PECs : adaptation aux études de bio- adhésion . . . . .	220
5.3.12 Caractérisations . . . . .	220
<b>5.4 Chapitre 4</b> . . . . .	<b>223</b>
5.4.1 Matériel . . . . .	223
5.4.2 Elaboration des films PECs modifiés . . . . .	224
5.4.3 Evaluation <i>in-vitro</i> . . . . .	224
5.4.4 Propriétés de surface . . . . .	226

## 5.1 Introduction

Ce chapitre est structuré en matériel et méthode se référant aux différents chapitres précédents. Les élaborations sont séparées des caractérisations et suivent chacune l'ordre d'apparition des discussions des chapitres précédents auxquelles elles se réfèrent.

Chaque chapitre porte en effet sur des aspects différents, et les protocoles d'élaboration ont évolué tout au long de ces travaux. La séparation en chapitres devrait permettre une plus grande clarté quant aux protocoles utilisés.

## 5.2 Chapitre 2

### 5.2.1 Matériel

L'alginate de sodium (# 058K0126), le chitosane («medium molecular weight», # STBF3507V), le chlorure de calcium, le diméthylsulfoxyde (DMSO), le tampon phosphate (PBS) et l'acide acétique ont été fournis par Sigma-Aldrich et utilisés tels quels. L'éosine disodique a été fournie par DistriBS, le dihydrogenophosphate de sodium par Prolabo, l'hydrogénophosphate disodique, l'hydroxyde de soude (NaOH), la solution ammoniacale (NH<sub>4</sub>OH), le tris-(hydroxyméthyl)aminoéthane (TRIS) et le sel de tris(hydroxyméthyl)aminométhane hydrochlorique (TRIS,HCl) par Fischer, l'acide hydrochlorique (HCl) et la pancréatine porcine (PP) par Acros organics. Toutes les expériences ont été réalisées dans l'eau déminéralisée.

### 5.2.2 Gels et films d'alginate ou de chitosane

#### 5.2.2.1 Alginate

Une solution aqueuse à 1,5 % m/m d'alginate de sodium est agitée pendant une nuit à l'aide d'un agitateur mécanique à 500 tpm jusqu'à solubilisation du polysaccharide.

Pour l'obtention d'un film, 50 g de la solution d'alginate sont versés dans une boîte de Pétri en verre puis séchée à l'étuve (50 °C) pendant une nuit. Si mentionné, les films sont réticulés dans une solution de CaCl<sub>2</sub> (1 % m/v, 20 mL) pendant 1H30 avant d'être séchés une deuxième fois à l'étuve (50 °C). Enfin, les films obtenus sont décollés de leurs boîtes de Pétri.

#### 5.2.2.2 Chitosane

Une solution aqueuse contenant 0,34 % v/v d'acide acétique et 1,5 % de chitosane est agitée pendant une nuit à l'aide d'un agitateur mécanique à 500 tpm jusqu'à solubilisation du polysaccharide.

Pour l'obtention d'un film, 30 g de la solution d'alginate sont versés dans une boîte de Pétri en verre et séchée à l'étuve (50 °C) pendant une nuit. Les films obtenus sont alors décollés de leurs boîtes de Pétri.

### 5.2.3 Elaboration des PECs

Une solution contenant 0,34 % v/v d'acétique et 1,5 % de chitosane, et une solution de 1,5 % m/m d'alginate de sodium sont préparées comme décrit précédemment. Les deux solutions sont ensuite mélangées selon un ratio massique de 63/37 alginate/chitosane (respectivement 50 g et 30 g) puis homogénéisées à l'aide d'un agitateur Ultra-Turax (11 000 tpm) pendant 10 min afin de former un PEC. Le mélange est alors versé dans une boîte de Pétri en verre.

Pour l'obtention des films destinés à l'étude de l'impact du séchage, les PECs sont alors partiellement séchés à l'étuve (50 °C) pendant la nuit. Un traitement à base de CaCl<sub>2</sub> (1 % m/v, 20 mL) est ensuite réalisé pendant 3 heures afin de réticuler les PECs. Enfin, les PECs sont rincés abondamment avec de l'eau déminéralisée afin d'évacuer l'excès de CaCl<sub>2</sub>. Trois différents séchages ont ensuite été testés.

Pour les autres études, les PECs sont séchés totalement lors du premier séchage à l'étuve. Le traitement CaCl<sub>2</sub> est quant à lui réalisé pendant 1H30.

### 5.2.4 Séchage

#### 5.2.4.1 Séchage par évaporation - Xero

Les PECs réticulés sont placés dans une étuve à 50 °C toute la nuit, jusqu'à ce que la masse soit constante. Des films plats, semi-transparents, sont obtenus et notés Xero.

#### 5.2.4.2 Lyophilisation - Lyoph

Les PECs réticulés sont congelés dans de l'azote liquide puis laissés 2 jours sous pression réduite ( $4,10^{-4}$  mbar) dans un lyophilisateur Heto CT 60e. Une mousse blanche et expansée est obtenue et notée Lyoph.

#### 5.2.4.3 Séchage par CO<sub>2</sub> supercritique - SCC-Mat

Le CO<sub>2</sub> n'étant pas miscible avec l'eau, l'eau contenue dans l'hydrogel est remplacée par de l'éthanol via des bains successifs (10 min) de 10, 30, 50, 70 et 100 % (v/v) de mélanges éthanol/eau, puis les PECs sont placés deux fois dans un bain d'éthanol absolu (100 %) [1]. Le passage par des bains successifs permet d'éviter l'écrasement des gels lié à un changement trop brutal de milieu. Les alcogels obtenus sont ensuite placés dans un sécheur à CO<sub>2</sub> supercritique (Polarion 3100). La cuve est remplie par du CO<sub>2</sub>, le système est purgé. L'opération est répétée au moins 3 fois et jusqu'à ce que l'on ne détecte plus

d'éthanol en sortie de purge, puis la cuve est partiellement remplie de sorte que l'échantillon soit immergé. La température est fixée à 45 °C (pression = 100 bars) afin d'atteindre des conditions supercritiques. Les échantillons sont laissés 20 min avant de dépressuriser (environ 1 bar/min). Les échantillons obtenus sont blancs, légèrement mous et notés SCC-Mat.

## 5.2.5 Caractérisations

### 5.2.5.1 Détermination des masses molaires

#### a) Viscosimétrie capillaire

La détermination de la masse molaire viscosimétrique ( $M_v$ ) par viscosimétrie capillaire est effectuée sur viscosimètre Cannon-fenske n° 75 W170 avec une constante de 0,008 mm<sup>2</sup>/s<sup>2</sup> et dont le diamètre interne du capillaire est de 0,54 mm.

Pour l'alginate, le solvant est une solution aqueuse NaCl 0,1 M, avec des concentrations en alginate de 0,01, 0,02,0,03,0,4 et 0,05 g.dL<sup>-1</sup>.

Pour ce faire, le viscosimètre est rempli avec la solution à analyser grâce à une poire d'aspiration. Le viscosimètre est placé verticalement dans un bain thermostaté à 25 °C pendant 15 minutes, puis le temps d'écoulement du fluide entre un point A et un point B est mesuré.

#### b) Etudes rhéologiques

La détermination de la masse molaire viscosimétrique ( $M_v$ ) par rhéologie (Anton Paar, MCR 302) rotation (accélération logarithmique sur 88 s) de 10 à 100 s<sup>-1</sup> sur un cône/plan (cône : diamètre 50 mm, angle 2°). Les mesures sont réalisées à température ambiante.

Pour l'alginate, les conditions sont les mêmes que pour les mesures de viscosimétrie capillaire, à savoir que le solvant est une solution aqueuse NaCl 0,1 M, avec des concentrations en alginate allant de 0,01, 0,02,0,03,0,4 et 0,05 g.dL<sup>-1</sup>.

Pour le chitosane, le solvant est une solution aqueuse à 0,1 M AcOOH et 0,2 M NaCl, avec les mêmes concentrations que pour l'alginate.

### 5.2.5.2 Résonance magnétique nucléaire : ratio M/G et DA

#### a) Alginate : ratio M/G

Pour la détermination du ratio M/G, les spectres RMN 1H liquide de l'alginate dissous dans CDCl<sub>3</sub> sont enregistrés via un spectromètre Advance DMX 500 MHz (Bruker Biospin GmbH, Allemagne) équipé d'une sonde liquide (BBI 500 MHz).

#### b) Chitosane : degré d'acétylation (DA)

Pour la détermination du DA, les spectres RMN 13C CP MAS (solide) ont été enregistrés sur un spectromètre BRUKER Avance III 400 (9,4 T). La référence des déplacements

chimiques est le tétraméthylsilane (TMS). Les échantillons ont été placés dans des rotors en zircone de 4 mm. La vitesse de rotation autour de l'angle magique (MAS) a été réglée à 10 kHz. Les expériences ont été effectuées à la température ambiante de 21°C. Les spectres ont été obtenus avec une expérience CP quantitative réalisée à l'aide d'un train de 10 périodes de polarisation croisée d'une durée de 1,1 ms séparées par un temps de repolarisation 1H de 0,7s [2]. Le temps de recyclage a été fixé à 2s.

### 5.2.5.3 Spectroscopie infra rouge

Les spectroscopies infrarouges par transformée de Fourier (FTIR) ont été réalisées directement sur les matériaux via un module ATR («attenuated total reflectance») sur un spectromètre Perkin Elmer Frontier, avec une résolution de 4 cm<sup>-1</sup> et 32 accumulations. La mesure via un module ATR consiste à placer l'échantillon au contact d'un cristal (ZnSe). Le rayon infrarouge traverse le cristal et est réfléchi au niveau de l'interface cristal/échantillon. L'absorption infrarouge subie par les ondes évanescentes au niveau du cristal permet d'obtenir des informations sur la composition chimique de l'échantillon localisées en surface (environ 1 µm).

### 5.2.5.4 Etude de la texture des gels

Les mesures ont été effectuées via un texturomètre TA.XTplus équipé d'un capteur de forces de 5 kg. Le seuil de détection du contact est de 0,1 g. La sensibilité du capteur de force est de 0,1 g. Toutes les mesures ont été faites à température ambiante. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque échantillon.

La sonde utilisée est un cylindre de diamètre 3 cm. Les gels, préalablement préparés selon la méthode décrite plus haut, ont été versés dans des pots cylindriques de volume 140 mL (hauteur = 65 mm, diamètre = 55 mm). L'expérience a consisté à faire pénétrer la sonde dans le gel à une vitesse fixée de 2 mm/s jusqu'à une distance de pénétration prédéfinie de 1 cm, puis à extraire la sonde du gel à cette même vitesse.

La force exercée par le gel sur la sonde lors de la descente et de la remontée est alors mesurée et convertie en contrainte.

### 5.2.5.5 Etude du temps de réticulation

L'étude de la texture a été effectuée avec un texturomètre TA.XT Plus équipé d'un capteur de forces de 5 kg. Le seuil de détection du contact est de 1,0 g. La sensibilité du capteur de force est de 0,1 g. Toutes les mesures ont été faites à température ambiante. La sonde utilisée est un cylindre de diamètre 10 mm.

Pour cette étude, des solutions d'alginate et de chitosane sont réalisées comme décrit précédemment. Après mélange à l'Ultra-Turrax (10 min), les PECs sont versés dans des puits de 21 mm de diamètre, avec un volume de PEC par puits de 2 mL. Dans chaque

puits, 1 mL d'une solution de  $\text{CaCl}_2$  (1 % m/v) est ajouté délicatement, de sorte que la solution de réticulation ne se mélange pas aux PECs et reste en surface.

L'expérience a consisté, à différents temps, à réaliser une compression sur les PECs à une vitesse fixée de 1 mm/s jusqu'à une distance de pénétration prédéfinie de 2,5 mm, en ayant préalablement aspiré la solution de  $\text{CaCl}_2$ . Trois mesures ont été réalisées pour chaque temps, sur des échantillons différents. La force nécessaire à la compression du matériau par la sonde est alors mesurée.

#### 5.2.5.6 Microscopie électronique à balayage

La microscopie électronique à balayage (MEB) a été réalisée avec un FEG-FEI Quanta 250 opérant à 5 kV. Avant les observations, les échantillons sont recouverts de 10 nm de platine.

Les analyses dispersives en énergie des rayons X (EDX) ont été réalisées à 30 kV à des magnifications x100 et un angle de collecte de 31,09 °.

#### 5.2.5.7 Etudes volumétriques

Dans le but de déterminer la surface spécifique, la méthode Brunauer, Emmet et Teller (BET) a été utilisée en utilisant un analyseur Micrometrics Tristar II. Les échantillons sont dégazés *in situ* à 353 K pendant une nuit avant d'être analysés. Pour ce faire, la pression d'azote est augmentée (adsorption) dans la chambre et la quantité d'azote adsorbée à la surface des échantillons est mesurée par pesée. La chambre est ensuite dépressurisée pour observer la désorption. Les mesures d'adsorption/désorption d'azote ont été réalisées à 77 K.

#### 5.2.5.8 Analyse dynamique mécanique (AMD)

L'analyse dynamique mécanique (AMD) permet d'évaluer le module de conservation ( $E'$ ) et de perte ( $E''$ ) d'un matériau. L'appareil utilisé est un Tritec 2000 DMA (Bohlin Instrument). Pour la mesure, les échantillons (15 x 5 mm) sont placés sur un module permettant d'appliquer une déformation (flexion) sinusoïdale. Les modules sont mesurés pour des fréquences de déformation allant de 1,0 à 10,0 Hz.

#### 5.2.5.9 Gonflement

Les études de gonflement ont été réalisées à température ambiante dans différents solvants :  $\text{H}_2\text{O}$ , tampon PBS et TRIS. Le tampon PBS est réalisé en dissolvant une tablette de PBS dans 200 mL d'eau, conduisant à un pH 7,4, une concentration en phosphates  $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}/\text{HPO}_4^-$  de 0,01 M et une concentration en sodium  $[\text{Na}] = 137$  mM. Les tampons TRIS ont été préparés en ajustant le pH d'une solution de TRIS, HCl à 0,01 M soit par de la soude NaOH, référencés comme «tampon TRIS/NaOH» (pH 7,4,  $[\text{Na}] = 7$  mM) soit

par l'ajout de la forme basique de TRIS (0,01 M), référencés comme «TRIS» (pH 7,4). Les échantillons sont placés dans le milieu adéquat, puis le pourcentage de gonflement en masse (ou volume), après 24 H, est calculé selon l'équation :

$$S_w = \frac{m_f(V_f) - m_i(V_i)}{m_i(V_i)} \times 100 \text{ (\%)} \quad (5.1)$$

, où  $S_w$  représente le gonflement en pourcentage,  $m_f(V_f)$  est la masse (ou le volume) finale de l'échantillon et  $m_i(V_i)$  sa masse (ou volume) initiale.

### 5.2.5.10 Evaluation en milieu enzymatique

Dans le but d'étudier le comportement des matériaux dans un milieu enzymatique, le gonflement et la dégradation ont été étudiés à 37 °C dans un milieu pancréatique simulé contenant 3,5 g.L<sup>-1</sup> de pancréatine porcine (PP) dans un tampon phosphate (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2 M) à pH 8 [3]. Les mesures de gonflement ont été effectuées selon le protocole décrit plus haut. Afin de s'assurer du maintien de l'activité enzymatique tout au long de l'expérience, celle-ci à tout d'abord été évaluée suivant le protocole du Phadebas Amylase Kit test. Brièvement, des solutions de PP ont été traitées avec des tablettes Phadebas Amylase à 37 °C pendant 15 minutes puis par de la soude à 0,5 M. Les solutions ont ensuite été centrifugées (1 500 g). Le surnageant à été prélevé et centrifugé une seconde fois. Le surnageant a alors été analysé par spectroscopie UV-visible sur un spectromètre SHIMADZU UV-1800 (620 nm). L'activité enzymatique a alors été calculée à partir de l'absorbance mesurée A suivant la formule :

$$Activité \text{ (U/l)} = 60 e^{-5,8908 + \sqrt{70,8436 + 13,9082 \times \ln(A)}} \quad (5.2)$$

A t=0, l'activité enzymatique d'une solution à 8 mg/L a été mesurée à 953 unités par litre (U/L). Les résultats ont montré que, après 2 jours, les enzymes étaient toujours actives avec une activité calculée de 80 % ± 10, comparé à t=0. Pour les études de dégradation, le milieu a donc été remplacé tous les deux jours dans le but de maintenir l'activité enzymatique et l'expérience a été conduite pendant 14 jours. Un échantillon contrôle de type xérogel (Xero) a été placé dans le tampon phosphate pH 8, sans enzymes. Au bout de 14 jours, les échantillons sont séchés à l'étuve (50 °C) puis pesés. La dégradation est alors calculée selon la formule :

$$D = \frac{m_f - m_i}{m_i} \times 100 \text{ (\%)} \quad (5.3)$$

où D est le pourcentage de dégradation de l'échantillon,  $m_f$  sa masse finale et  $m_i$  sa masse initiale.

### 5.2.5.11 Etude de la cinétique de libération

#### a) Vérification des conditions Sink

Pour l'évaluation des cinétiques de libération, les conditions Sink ont été vérifiées. Ces conditions définissent que, dans le cas où la totalité de la molécule étudiée serait libérée, la concentration finale du milieu de libération ne devrait pas dépasser 30 % de la solubilité critique de cette molécule. Ces conditions permettent de s'assurer que, quelle que soit la quantité libérée, cette libération s'effectue en milieu suffisamment dilué pour que la cinétique ne soit pas affectée par la concentration de la molécule déjà libérée dans le milieu.

Pour les études menées ici, la solubilité de l'éosine a été observée comme étant supérieure à 5 g/L dans le milieu d'étude (PBS). Avant la libération, la quantité d'éosine incorporée par échantillon est inférieure à 3 mg. Le volume du milieu de libération a été fixé à 5 mL. Ainsi, la concentration maximale dans le milieu, en considérant que la totalité de l'éosine incorporée est libérée, atteindrait 0,6 g/L. Cette concentration est bien inférieure à 3 fois la solubilité critique, supérieure à 5 g/L : les conditions Sink sont vérifiées.

#### b) Cinétique de libération

Les études de cinétique de libération ont été réalisées dans un tampon phosphate (PBS, pH 7,4, 0,01 M). Les échantillons (10 x 10 mm) ont d'abord été placés dans 10 mL de tampon contenant 0,5 g.L<sup>-1</sup> d'éosine pendant 12 H. Après l'imprégnation, la masse de chaque solution éosine/PBS est mesurée afin de déterminer le volume restant (densité considérée comme 1). La concentration en éosine est déterminée par spectroscopie UV-visible (SHIMADZU UV-1800) à 517 nm grâce à la courbe d'étalonnage présentée figure 5.1. L'éosine restante est alors comparée à la quantité initiale afin de déterminer la quantité incorporée  $m_{incorporée}$  dans les matrices PECs. De plus, après l'imprégnation, les échantillons sont placés directement dans des puits contenant 5 mL d'une solution PBS, exempte d'éosine. Les solutions sont légèrement agitées via une plaque d'agitation rotative et des aliquots (2 mL) sont prélevés régulièrement pendant 3 jours. Le volume est maintenu constant en remplaçant les aliquots par un volume équivalent de solution PBS. Chaque aliquot est analysé par spectroscopie visible (517 nm), et la quantité cumulée d'éosine libérée est calculée par la formule  $m_{relarguée} = \sum m_{aliquots}$ , où  $m_{aliquots}$  correspond à la masse d'éosine prélevée par aliquot. Le pourcentage de libération est alors déterminé comme le ratio :

$$\text{Pourcentage relarguée} = \frac{m_{relarguée} \times 100}{m_{incorporée}} \quad (5.4)$$

Afin d'étudier le système, le modèle de Korsmeyer-Peppas a ensuite été appliqué aux courbes de libération obtenues, selon l'équation :

$$\frac{m_{relarguée}}{m_{incorporée}} = Kt^n \quad (5.5)$$

, où K est la constante de libération, et  $n$  l'exposant de libération [4, 5]. L'application du modèle a été réalisée en utilisant une régression linéaire sur la courbe de libération log/log.

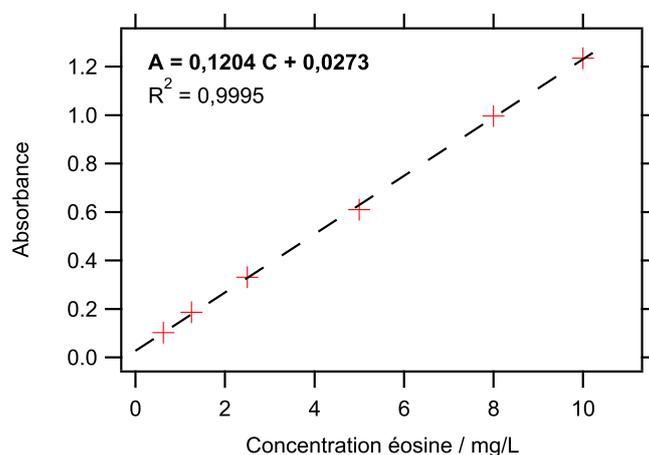


FIGURE 5.1 – Courbe d'étalonnage de l'absorbance ( $\lambda = 517$  nm) réalisée pour la détermination de la concentration d'éosine dans PBS.

### 5.2.5.12 Microscopie de force atomique (AFM)

La micrographie à force atomique (AFM) a été réalisée sur un Bruker Dimension 3100 avec un contrôleur de type IIIa. La pointe utilisée est de type NSC16. La taille de balayage est de 30  $\mu\text{m}$ , avec une fréquence de balayage de 0,4 Hz.

### 5.2.5.13 Spectroscopie XPS

La spectrométrie photoélectronique X (XPS) a été réalisée sur un spectromètre ESCALAB 250 de Thermo Electron. La source d'excitation est monochromatique, raie Al  $K\alpha$  (1486,6 eV). Les surfaces analysées ont un diamètre de 400  $\mu\text{m}$ . La charge est compensée par un faisceau d'électrons (-2 eV).

Pour le stockage avant analyse, les échantillons sont gardés dans des contenants en verre, propres, et idéalement maintenus sous vide pour éviter toute pollution des surfaces.

### 5.2.5.14 Etude de l'influence du pH

Pour étudier l'effet du pH sur les films d'alginate, de chitosane et de PEC, avec et sans réticulation ( $\text{CaCl}_2$  à 1 % m/v, 1 h 30), ces derniers (20 x 20 mm) sont placés dans diverses solutions ( $V = 50$  mL), pendant différents temps. Les différentes solutions utilisées sont

présentées tableau 5.1. Après traitement, les matériaux sont séchés à l'étuve (50 °C) puis analysés par ATR-FTIR.

TABLEAU 5.1 – Solutions utilisées pour l'étude de l'influence du pH sur les films d'alginate, de chitosane et de PECs.

Solvant	Acide/Base	pH
Eau	HCl	2,5
	NaOH	11
DMSO	HCl	3
	NaOH	12-14
	NH <sub>4</sub> OH	>15

Après traitement, certains échantillons sont placés dans du DMSO simple pendant 3 H puis séchés à l'étuve (50 °C) et analysés par ATR-FTIR, afin d'observer l'évolution du comportement des fonctions acido-basiques des PECs après traitement.

## 5.3 Chapitre 3

Cette section présente les protocoles de réaction généraux. Les quantités exactes utilisées sont disponibles dans le texte du chapitre 3 au niveau des discussions associées.

### 5.3.1 Matériel

Le N-Isopropylacrylamide (NIPAM), le poly(N-Isopropylacrylamide) (PNIPAM,  $M_w = 5\,000\text{ g.mol}^{-1}$ ), le N-Hydroxysuccinimide (NHS), le N-(3-Diméthylaminopropyl)-N'-éthylcarbodiimide hydrochloride (EDC, HCl), N-(3-Diméthylaminopropyl)-N'-éthylcarbodiimide (EDC), l'éthylène diamine (EDA), le 1,6 hexane diamine (HDA) le diméthylsulfoxyde (DMSO), le Methyl-2-(dodecylthiocarbonothioylthio)-2-méthylpropionate (CTA), le 4,4'-Azobis(4-cyanovaleric acid) (initiateur radicalaire) ainsi que tous les solvants sont fournis par Sigma-Aldrich. Le NIPAM est purifié avant utilisation. Les autres produits sont utilisés tels que reçus. Pour les couplages NHS/EDC, EDC est utilisé sous forme EDC,HCl pour les solvants aqueux et sous forme EDC pour les solvants organiques. Dans tous les cas, il y est fait référence par EDC.

### 5.3.2 Elaboration des films d'alginate

Pour le chapitre 3, les matrices PECs sont réalisées suivant des protocoles similaires au chapitre 2.

### 5.3.3 Elaboration des films PECs

Pour le chapitre 3, les matrices PECs sont réalisées suivant des protocoles proches de ceux du chapitre 2. Brièvement, après mélange de l'alginate et du chitosane, les PECs sont séchés à l'étuve 50 °C (séchage total) avant d'être réticulés au CaCl<sub>2</sub> 1 % (m/v) pendant 1H30. Après lavage à l'eau déminéralisée, un deuxième séchage à l'étuve est effectué, jusqu'à observation d'une masse stable, afin d'obtenir les films PECs.

### 5.3.4 Purification du NIPAM

Avant d'être polymérisé, le NIPAM est purifié par recristallisation. Pour ce faire, environ 10 g de NIPAM sont versés dans 100 mL d'hexane et chauffés à 50 °C, pendant 15 min jusqu'à dissolution. Le milieu est ensuite refroidi dans un bain d'eau glacée pendant 30 min. Le précipité obtenu est filtré et lavé avec de l'hexane à 0 °C. Le rendement de purification est d'environ 92 %.

### 5.3.5 Polymérisation du PNIPAM : RAFT

Pour la polymérisation du PNIPAM, du monomère purifié (NIPAM) est placé dans un ballon et solubilisé dans son solvant en présence du CTA. Le montage réactionnel est fermé via des septa et de l'argon est mis à buller dans la solution via une aiguille pendant 30 minutes afin de dégazer l'oxygène présent dans le solvant. La solution est ensuite portée à la température désirée. Pendant ce temps, une solution contenant l'initiateur est préparée. La quantité nécessaire en initiateur est prélevée et injectée dans le milieu réactionnel au travers d'un des septa, par le biais d'une seringue, afin de maintenir le milieu fermé. La réaction est alors maintenue pendant 12 H. Des aliquots de 0,5 mL sont prélevés à la seringue pour les analyses SEC et RMN.

Après réaction, le polymère est dissous dans EtOH puis précipité dans l'éther, filtré et lavé à l'éther. L'étape est répétée deux fois et permet d'éliminer le monomère, soluble dans l'éther. Ensuite, le filtrat est solubilisé dans un mélange eau/DMSO avant d'être dialysé sous agitation magnétique pendant 3 jours dans l'eau, sur une membrane cellulosique (seuil de rétention de 12 000 g/mol). L'eau de dialyse est renouvelée trois fois par jour. Après dialyse, le polymère est laissé pour congélation à -5 °C pendant une nuit puis séché par lyophilisation.

### 5.3.6 Modification des gels

### 5.3.7 Gels de chitosane

Des mélanges contenant le PNIPAM-COOH (M<sub>n</sub> = 5 000 g/mol, 100 mg, 1 eq), NHS (40 µmol, 2 eq) et EDC (80 µmol, 4 eq) sont préparés pour activer l'acide carboxylique dans différents solvants (V = 5 mL). Trois solvants sont utilisés : H<sub>2</sub>O, un tampon et DMSO. Le

tampon est une solution aqueuse tamponnée par MES (0,01 M) à pH 6. L'activation est maintenue pendant 3 H sous agitation magnétique.

Dans un même temps, des mélanges contenant 1,5 % (m/v) chitosane (poudre) sont préparés ( $V = 6,6$  mL). Trois solvants sont utilisés :  $H_2O$  acidifiée (0,34 % v/v AcOOH), un tampon et DMSO. La présence d'acide acétique AcOOH pour le solvant  $H_2O$  permet la solubilisation du chitosane. Le tampon est quant à lui un tampon PBS (0,01 M) à pH 7,4.

Après l'activation du PNIPAM-COOH, les mélanges contenant le chitosane sont ajoutés aux solutions contenant PNIPAM-COOH. La réaction est maintenue pendant 12 H sous agitation magnétique. Les échantillons sont ensuite dialysés dans l'eau pendant 5 jours sous agitation magnétique sur une membrane cellulosique (seuil de rétention de 12 000 g/mol) pour éliminer le PNIPAM-COOH n'ayant pas réagi. L'eau de dialyse est changée trois fois par jour. Après dialyse, les échantillons sont lyophilisés pendant 3 jours.

### 5.3.8 Gels d'alginate

#### 5.3.8.1 Greffage de la diamine : 1<sup>ère</sup> étape

De l'alginate (poudre) est mis dans 5 mL de trois solvants différents ( $H_2O$ , un tampon et DMSO) contenant NHS (860  $\mu\text{mol}$ , 1 eq) et EDC (1 600  $\mu\text{mol}$ , 2 eq) pour activer l'acide carboxylique, de sorte que la concentration en alginate soit de 1,5 % m/v. Le tampon est une solution aqueuse tamponnée par MES (0,01 M) à pH 6. L'activation est maintenue pendant 3 H sous agitation magnétique.

Parallèlement, la diamine (40 ou 200 eq) est mélangée à 5 mL de solvant ( $H_2O$ , tampon ou DMSO) et ajoutée à la solution d'alginate et la réaction est maintenue pendant 12 H sous agitation magnétique. Dans le cas des tampons, la diamine est mélangée à une solution tampon PBS (0,01 M, pH 7,4). Les échantillons sont ensuite dialysés dans l'eau pendant 5 jours sous agitation magnétique sur une membrane (seuil de rétention de 12 000 g/mol) pour éliminer la diamine n'ayant pas réagi. L'eau de dialyse est changée trois fois par jour. Après dialyse, les échantillons d'alginate- $NH_2$  obtenus sont lyophilisés pendant 3 jours.

#### 5.3.8.2 Greffage du PNIPAM-COOH : 2<sup>ème</sup> étape

Des mélanges contenant le PNIPAM-COOH ( $M_n = 5\ 000$  g/mol, 150 mg, 1 eq), NHS (90  $\mu\text{mol}$ , 3 eq) et EDC (130  $\mu\text{mol}$ , 4 eq) sont préparés pour activer l'acide carboxylique ( $V = 5$  mL). Trois solvants sont utilisés :  $H_2O$ , un tampon et DMSO. Le tampon est une solution aqueuse tamponnée par MES (0,01 M) à pH 6. L'activation est maintenue pendant 3 H sous agitation magnétique.

Dans un même temps, des mélanges contenant 1,5 % (m/v) d'alginate- $NH_2$  (issus de la première étape) sont préparés dans différents solvants ( $V = 10$  mL) :  $H_2O$ , un tampon et DMSO. Le tampon est une solution tamponnée PBS (0,01 M) à pH 7,4.

Après l'activation de PNIPAM-COOH, les mélanges contenant l'alginate-NH<sub>2</sub> sont ajoutés aux solutions contenant PNIPAM-COOH et la réaction est maintenue pendant 12 H sous agitation magnétique. Les échantillons sont ensuite dialysés dans l'eau pendant 5 jours sur une membrane (seuil de rétention de 12 000 g/mol) pour éliminer le PNIPAM-COOH n'ayant pas réagi. L'eau de dialyse est changée trois fois par jour. Après dialyse, les échantillons sont lyophilisés pendant 3 jours.

### 5.3.9 Modification de surface : alginate

Pour la modification de surface des films d'alginate, ceux-ci sont tout d'abord lavés 2 fois à l'éthanol (50 mL) et 2 fois au DMSO (50 mL), sous légère agitation magnétique (200 rpm) pendant 10 min. Après chaque réaction, ils sont de nouveau lavés (DMSO puis EtOH) selon le même procédé.

#### 5.3.9.1 Synthèse de Alg-CDI-PNI-60°C

Les films d'alginate (300 mg) sont mis dans 40 mL de DMSO anhydre (séché sur tamis moléculaire) contenant 99,6 mg de CDI (15 mmol/L), à 60 °C. La réaction est maintenue sous légère agitation magnétique (200 rpm) pendant 1H30, sous argon. Le film est alors prélevé via une pince métallique puis rincé rapidement avec du DMSO anhydre et placé dans une deuxième solution contenant 40 mL de DMSO anhydre et 440,5 mg de PNIPAM-NH<sub>2</sub> (MN = 5 500 g/mol, 2 mmol/L), à 60 °C. Après 12 H sous légère agitation magnétique, les films sont lavés (EtOH puis DMSO) et séchés à l'étuve (50 °C) avant d'être analysés par XPS. Des échantillons sont réalisés dans les mêmes conditions à l'exception que le CDI n'est pas ajouté à la solution d'activation (Alg-PNI-60°C).

#### 5.3.9.2 Synthèse de Alg-NHS-PNI-RT

Les films d'alginate (300 mg) sont mis dans 40 mL de DMSO puis 72 mg de NHS (15 mmol/L) et 117 mg de NHS (15 mmol/L) sont ajoutés, à température ambiante. La réaction est maintenue sous légère agitation magnétique (200 rpm) pendant 20 min puis 440 mg de PNIPAM-NH<sub>2</sub> (5 500 g/mol, 2 mmol/L) sont ajoutés. Après 12 H, les films sont lavés (EtOH puis DMSO) et séchés à l'étuve (50 °C) avant d'être analysés par XPS. Des échantillons sont réalisés dans les mêmes conditions à l'exception que NHS et EDC ne sont pas ajoutés à la solution d'activation (Alg-PNI-RT).

### 5.3.10 Modification de surface des PECs : influence d'un traitement acide sur l'efficacité de greffage

Pour la modification de surface des films à base de PEC présenté section 3.3.3.1, ceux-ci sont tout d'abord lavés 2 fois à l'éthanol (50 mL) et 2 fois au DMSO (50 mL), sous légère

agitation magnétique (200 rpm) pendant 10 min. Après chaque réaction, ils sont de nouveau lavés (DMSO puis EtOH) selon le même procédé.

#### **5.3.10.1 Greffage de la diamine : 1<sup>ère</sup> étape**

Les films PECs sont mis dans un ballon contenant du DMSO puis NHS et EDC sont ajoutés, à température ambiante, afin d'activer l'acide carboxylique du chitosane. La réaction est maintenue sous légère agitation magnétique (200 rpm) pendant 3 H. La diamine, EDA ou HDA, est ajoutée. Après 12 H de réaction, les films sont lavés (EtOH et DMSO).

#### **5.3.10.2 Greffage du PNIPAM-COOH : 2<sup>ème</sup> étape**

Du PNIPAM-COOH est mis à réagir, pendant 3 H, avec NHS et EDC afin d'activer l'acide carboxylique du PNIPAM, sous légère agitation magnétique (200 rpm). Des films PECs non modifiés ou greffés par une diamine sont ajoutés à la solution sous légère agitation et la réaction est maintenue pendant 12 H. Les films sont lavés (EtOH et DMSO).

### **5.3.11 Modification de surface des PECs : adaptation aux études de bioadhésion**

Pour la dernière série de réactions présentée dans le chapitre 3 (section 3.3.3.2), les films de PECs sont réalisés suivant des protocoles similaires au chapitre 2, à ceci près qu'ils sont élaborés directement sur des lames de verre afin de permettre les études de bioadhésion *in vitro*. Brièvement, après mélange et homogénéisation à l'UT de l'alginate et du chitosane, les PECs (0,2 mL) sont déposés sur des lames de verre (1 cm) puis séchés à l'étuve (50 °C) pendant 2 H. La réticulation est effectuée au CaCl<sub>2</sub> (0,5 mL, 1 % m/v) pendant 30 minutes.

Afin de modifier chimiquement la surface des films PECs, les protocoles utilisés sont ceux présentés ci-avant. Les réactions sont cependant effectuées sur les PECs, collés aux lames de verre, déposés dans les puits de culture d'une plaque 24 puits, sous agitation grâce à une plaque d'agitation rotative.

Pour le lavage des surfaces avant et après réactions, les volumes de solvant (EtOH et DMSO, 1 mL) sont adaptés à la contenance des puits de culture.

### **5.3.12 Caractérisations**

#### **5.3.12.1 Microscopie électronique à balayage**

La microscopie électronique à balayage (MEB) a été réalisée dans les mêmes conditions que pour le chapitre 2.

### 5.3.12.2 Spectroscopie infra rouge

Les spectroscopies infrarouges par transformée de Fourier (FTIR) ont été réalisées via un module ATR (voir protocole expérimental du chapitre 2).

### 5.3.12.3 Détermination du taux de conversion du NIPAM : RMN

La détermination du taux de conversion du monomère lors de la polymérisation RAFT du NIPAM est effectuée par RMN liquide via un spectromètre Advance DMX 500 MHz (Bruker Biospin GmbH, Allemagne) équipé d'une sonde liquide (BBI 500 MHz). Pour l'acquisition, les prélèvements effectués lors de la polymérisation sont dissous dans le  $\text{CDCl}_3$ .

Le taux de conversion est déterminé en quantifiant la disparition de la double liaison à 5,5 ppm (figure 5.2, a). Pour ce faire, le ratio entre les aires du signal de la double liaison  $I_1$  et du proton en C5 de l'isopropyl  $I_2$  à 4,0 ppm est calculé tel que  $conv. (\%) = I_1/I_2 \times 100$  (figure 5.2, b) [6]. On notera que le signal du proton en C5 n'est pas le même pour le monomère et le polymère, mais l'intégration totale des deux contributions reste constante au fur et à mesure de la polymérisation.

### 5.3.12.4 Détermination de la masse molaire du PNIPAM : SEC

La chromatographie par exclusion stérique (SEC) permet, par des phénomènes stériques, de séparer des chaînes de polymère en fonction de leur masse molaire. Le principe consiste à faire passer une solution contenant le polymère à travers une colonne contenant des particules poreuses. Les petites chaînes de polymère suivront la porosité des particules de la colonne et auront donc un temps de parcours plus long que les grandes chaînes, qui contourneront les particules du fait de la gêne stérique. Une fois séparées, les chaînes peuvent être analysées pour déterminer la masse molaire moyenne en nombre ( $M_n$ ), en masse ( $M_w$ ) ainsi que la polydispersité du polymère.

Afin de limiter les interactions entre la colonne et le polymère, du DMF/LiBr (10 mM, indice de réfraction de 1,431) est utilisé comme solvant. Avant analyse, les solutions sont filtrées sur un filtre nylon 10 micron pour éviter la présence de particules pouvant endommager la colonne.

Deux colonnes, 804 et 805 Shadex (colonnes polyvalentes), sont utilisées en série pour la séparation des chaînes de polymère. La détection est assurée par mesure de la variation de l'indice de réfraction (détecteur Optilab rEX), couplé à une mesure de diffusion de lumière (détecteur miniDawn, 690 nm).

Pour déterminer les masses des chaînes de polymère, il est classiquement utilisé une courbe d'étalonnage du temps de rétention des chaînes dans la colonne en fonction de leurs masses. Les échantillons de calibration sont des polymères présentant des structures proches de celui à analyser (polymère linéaire par exemple) et sont en outre relativement onéreux.

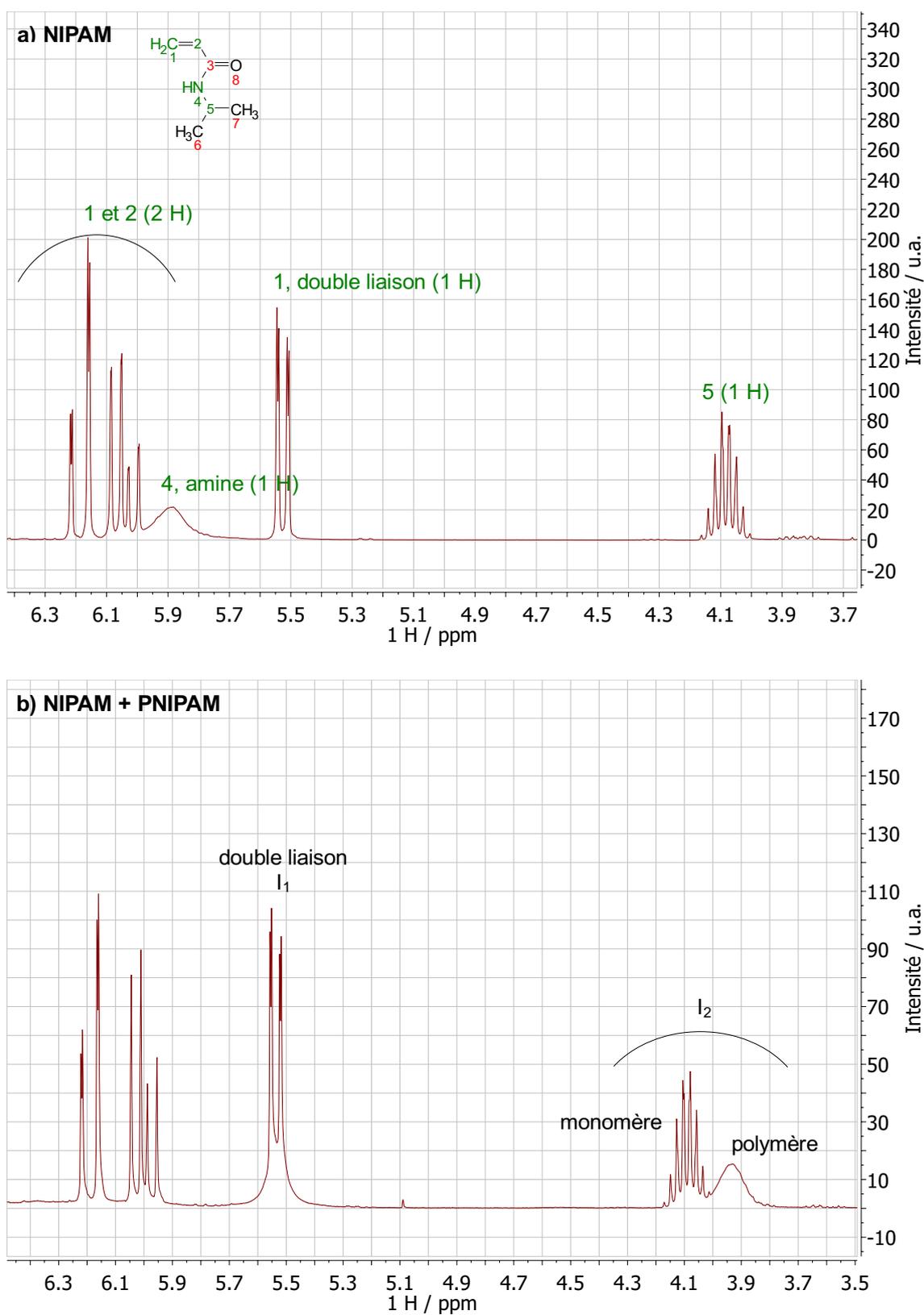


FIGURE 5.2 – Spectres RMN 1 H (a) du NIPAM et (b) d'un aliquot prélevé lors d'une polymérisation (mélange de NIPAM et PNIPAM).

La mesure de l'indice de réfraction, sensible à la concentration, en combinaison avec la diffusion de lumière, sensible à la masse des chaînes, est une alternative qui permet de déterminer la «masse vraie» du polymère, sans utiliser de courbe d'étalonnage. Elle nécessite cependant de connaître l'incrément de l'indice de réfraction  $dn/dc$ . Pour le PNIPAM, sa valeur est connue et égale à 0,0731 mL/g dans le DMF [7].

#### 5.3.12.5 Quantification des fonctions carboxyliques du PNIPAM-COOH

Pour la quantification des fonctions carboxyliques (R-COOH) du PNIPAM-COOH synthétisé par RAFT, des solutions de PNIPAM-COOH (0,5 g dans 20 mL H<sub>2</sub>O) ont été dosées par de la soude 0,02 M. Le suivi pH-métrique est assuré par un pH-mètre 766 Calimatic (électrode KCl) calibré avant chaque campagne de mesures.

#### 5.3.12.6 Quantification du greffage du PNIPAM sur les gels par spectroscopie UV-Visible

Les gels greffés sont dissous dans l'eau (1 mg/mL) puis l'absorbance est mesurée sur un spectromètre SHIMADZU UV-1800 à 470 nm. La mesure est effectuée sur les solutions à température ambiante (25 °C) puis les gels sont chauffés à 50°C. Une fois chauffés, les gels ont précipité et une deuxième mesure est rapidement effectuée.

#### 5.3.12.7 Spectroscopie XPS

La spectrométrie photoélectronique X (XPS) a été réalisée dans les mêmes conditions que pour le chapitre 2.

#### 5.3.12.8 Etude de la cinétique de libération

Pour l'étude des cinétiques de libération, les conditions Sink ont été vérifiées (voir protocole expérimental du chapitre 2). Brièvement, l'incorporation de l'éosine dans les échantillons est inférieure à 4 mg, la concentration maximale du milieu de libération (5 mL) est donc de 0,8 g/L et bien inférieure à 3 fois la solubilité critique (supérieure à 5 g/L).

Pour la réalisation des études elles-mêmes, le protocole utilisé est proche de celui du chapitre 2, à ceci près que la solution utilisée pour l'imprégnation de l'éosine dans les échantillons (PEC et PEC-5K) est concentrée à 1,5 g.L<sup>-1</sup>. Les modèles théoriques de libération n'ont pas été appliqués.

## 5.4 Chapitre 4

### 5.4.1 Matériel

Les composés chimiques utilisés sont les mêmes qu'aux chapitres précédents. Pour la culture cellulaire, le mélange M3 :Basel est fourni par Incell, DMEM (4,5 g/L D-Glucose)

et le sérum de veau foetal par Gibco. L'EGF («Epidermal Growth Factor») et la L-Glutamine ont été fournis par Sigma Aldrich, le tampon PBS par Life technologies.

### 5.4.2 Elaboration des films PECs modifiés

Pour le chapitre 4, les matrices PECs sont réalisées suivant des protocoles similaires au chapitre 3, selon les protocoles d'adaptation pour les études *in vitro* dans le cas des études de bioadhésion et de mesure d'angle de contact.

Afin de modifier chimiquement la surface des films de PECs, les protocoles utilisés sont ceux du chapitre 3. Toujours dans le cas des études de bioadhésion et de mesure d'angle de contact, les protocoles adaptés pour les études *in vitro*. Les quantités utilisées sont celles définies en fin de chapitre 3 et sont rappelées tableaux 5.2 et 5.3.

TABLEAU 5.2 – Conditions expérimentales pour le greffage de l'EDA sur les surfaces PECs. L'acidification se fait dans une solution à pH 2,5 dans l'eau, pendant 1 H.  $V = 0,6$  mL DMSO,  $V_{EDA} = 0,6$  mL. Les acides carboxyliques des PECs sont activés 3 H par NHS/EDC avant ajout de l'EDA.

Echantillon	Diamine	Acidification	$m_{PEC}$ (mg)	$C_{EDA}$ (mol/L)	$C_{EDC}^1$ (mmol/L)	$C_{NHS}^1$ (mmol/L)
PEC-EDA	EDA	Oui	30	7,2 (excès)	200 (2 eq)	100 (1 eq)

<sup>1</sup> avant ajout de l'EDA

TABLEAU 5.3 – Conditions expérimentales pour le greffage du PNIPAM-COOH sur les surfaces PECs aminées (PEC-EDA) ou non. L'acidification se fait dans une solution à pH 2,5 dans l'eau, pendant 1 H.  $V = 1$  mL DMSO. L'acide carboxylique du PNIPAM-COOH est activé 3 H par NHS/EDC avant ajout sur les PECs.

Echantillon	Diamine	Acidification	$m_{PEC}$ (mg)	$M_{nPNIPAM}$ (g/mol)	$C_{PNIPAM}$ (mmol/L)	$C_{EDC}$ (mmol/L)	$C_{NHS}$ (mmol/L)
PEC-5K	Sans	Oui	30	5 000 <sup>1</sup>	2,0 (1 eq)	50 (25 eq)	25 (12,5 eq)
PEC-EDA-5K	EDA	Oui	30	5 000 <sup>1</sup>	2,0 (1 eq)	50 (25 eq)	25 (12,5 eq)
PEC-20K	Sans	Oui	30	24 000 <sup>2</sup>	2,0 (1 eq)	50 (25 eq)	25 (12,5 eq)
PEC-EDA-20K	EDA	Oui	30	24 000 <sup>2</sup>	2,0 (1 eq)	50 (25 eq)	25 (12,5 eq)

<sup>1</sup> commercial; <sup>2</sup> synthétique, RAFT PNI-3

### 5.4.3 Evaluation *in-vitro*

Les études de *in vitro* ont été réalisées sur des lignés cellulaires HPNe immortalisées, transfectées «green fluorescente protein» (GFP) afin de faciliter leur visualisation au microscope à fluorescence. Le décollage cellulaire est assuré par de la trypsine.

### 5.4.3.1 Milieu de culture

Le milieu de culture est composé, pour environ 200 mL, de :

- 50 mL M3 Basef (base de culture, contient entre autres facteurs de croissance)
- 150 mL DMEM à 4,5 g/L D-glucose (base de culture, contient entre autres des vitamines et du glucose)
- 3  $\mu$ L EGF (facteur de croissance épidermique)
- 10 mL sérum de veau fœtal (contient des nutriments comme l'albumine de sérum bovin)
- 2 mL L-Glutamine (acide aminé essentiel mais instable)

### 5.4.3.2 Cytotoxicité

Les études de cytotoxicité ont été réalisées avec des cellules HPNe. Les échantillons (5 x 5 mm) sont immergés dans du milieu de culture pendant 20 min avant la mise en contact avec les cellules, dans le but de relarguer les éventuels agents toxiques adsorbés en surface. Au bout de 20 minutes, le milieu est alors aspiré et les cellules sont mises au contact des matériaux avec une quantité de 10 000 cellules par puits ( $V = 1$  mL). Des expériences contrôles, sans matériau, sont réalisées en parallèle. Les cultures sont mises à incuber à 37 °C pendant 4 jours. Les matériaux sont retirés délicatement et les cellules sont décollées de leurs supports de culture par l'action de 1 mL de trypsine. Un prélèvement de 10  $\mu$ L est ensuite dilué dans une solution isotonique afin de réaliser le comptage via un compteur Beckman Coulter Z1, réglé pour comptabiliser les particules supérieures à 10  $\mu$ m. L'expérience contrôle est normalisée à 100 % et le pourcentage de prolifération des échantillons est calculé comme le ratio entre le nombre de cellules de l'échantillon  $N_{ech}$  et du contrôle  $N_{cont}$  tel que  $\% = N_{ech} / N_{cont} \times 100$ . L'expérience est répétée trois fois pour chaque type d'échantillon.

### 5.4.3.3 Bioadhésion : culture cellulaire

Les études de bioadhésion ont été réalisées avec des cellules HPNe. Les échantillons sont élaborés directement sur des lamelles de verre qui permettent d'obtenir un meilleur recouvrement du fond des puits de culture. Une fois au fond des puits, ils sont recouverts de milieu de culture (1 mL, 20 min) afin de permettre leur gonflement et d'évacuer les éventuels composés toxiques adsorbés en surface. Le milieu est aspiré et les cellules HPNe sont délicatement semées sur les PECs (60 000 cellules/puits, 1 mL). Une partie des cultures est incubée à 37 °C et l'autre à 27 °C. Après 8 H, le milieu est aspiré, les PECs sont transvasés dans des puits de culture propres et sont rincés deux fois au PBS pour éliminer les cellules non adhérentes. Dans le cas des cultures effectuées à 37 °C, le PBS de rinçage est

chauffé à 37 °C avant d'être utilisé pour le lavage. La surface des échantillons est observée au microscope inversé à fluorescence Zeiss Axio Vert A-1, avec une longueur d'onde d'excitation de 493 nm (émission à 517 nm). Le nombre de cellules en surface est alors comptabilisé par traitement d'image en utilisant une macro de comptage ImageJ. L'expérience est répétée trois fois pour chaque type d'échantillon.

#### **5.4.3.4 Bioadhésion : comptage**

Pour le comptage des cellules, des traitements d'image via le logiciel ImageJ ont été réalisés. Le traitement d'image s'effectue en plusieurs étapes. Brièvement, l'image d'origine (figure 5.3, 1) est tout d'abord convertie en nuances de gris (2). Le contraste de l'image est exacerbé, avec une valeur seuil, pour transformer le signal en «tout ou rien» (3). Les éléments de l'image sont alors transformés en masque (4). La fonction «watershed» permet de séparer, plus ou moins efficacement, les cellules collées. Ces dernières sont alors comptées par le logiciel (5). Il suffit alors de relever le nombre de cellules comptabilisées pour chaque champ (6 par échantillons). Afin de traiter un grand nombre d'images simultanément tout en gardant les mêmes paramètres pour chaque image, le processus est automatisé via la création d'une macro.

### **5.4.4 Propriétés de surface**

#### **5.4.4.1 Angle de contact**

Les mesures d'angle de contact statiques ont été réalisées sur un GBX digidrop. Pour ce faire, une goutte (1 µL) est formée au bout d'une aiguille présentant un diamètre d'environ 800 µm. La goutte est déposée sur la surface de l'échantillon (collé sur lame de verre) et l'acquisition d'une image est effectuée après 500 ms. L'angle entre la goutte et la surface est mesuré manuellement sur l'image et déterminé comme étant la moyenne des angles mesurés à gauche et à droite de la goutte.

#### **5.4.4.2 Microscopie électronique à balayage**

La microscopie électronique à balayage (MEB) a été réalisée dans les mêmes conditions que pour le chapitre 2.

#### **5.4.4.3 Adhésion physique : essais sur surfaces modèles**

Pour la mesure de l'adhésion entre les différents PECs et des surfaces modèles, le matériau à analyser est fixé sur une sonde de diamètre 10 mm. Les surfaces modèles sont quant à elle immergées dans une solution thermorégulée à 25 °C ou 40 °C. Le matériau est mis au contact de la surface modèle pendant 5 minutes, avec une force d'application de 500 g. Au bout de ce temps, le matériau est séparé de la surface (0,5 mm/s) et la force

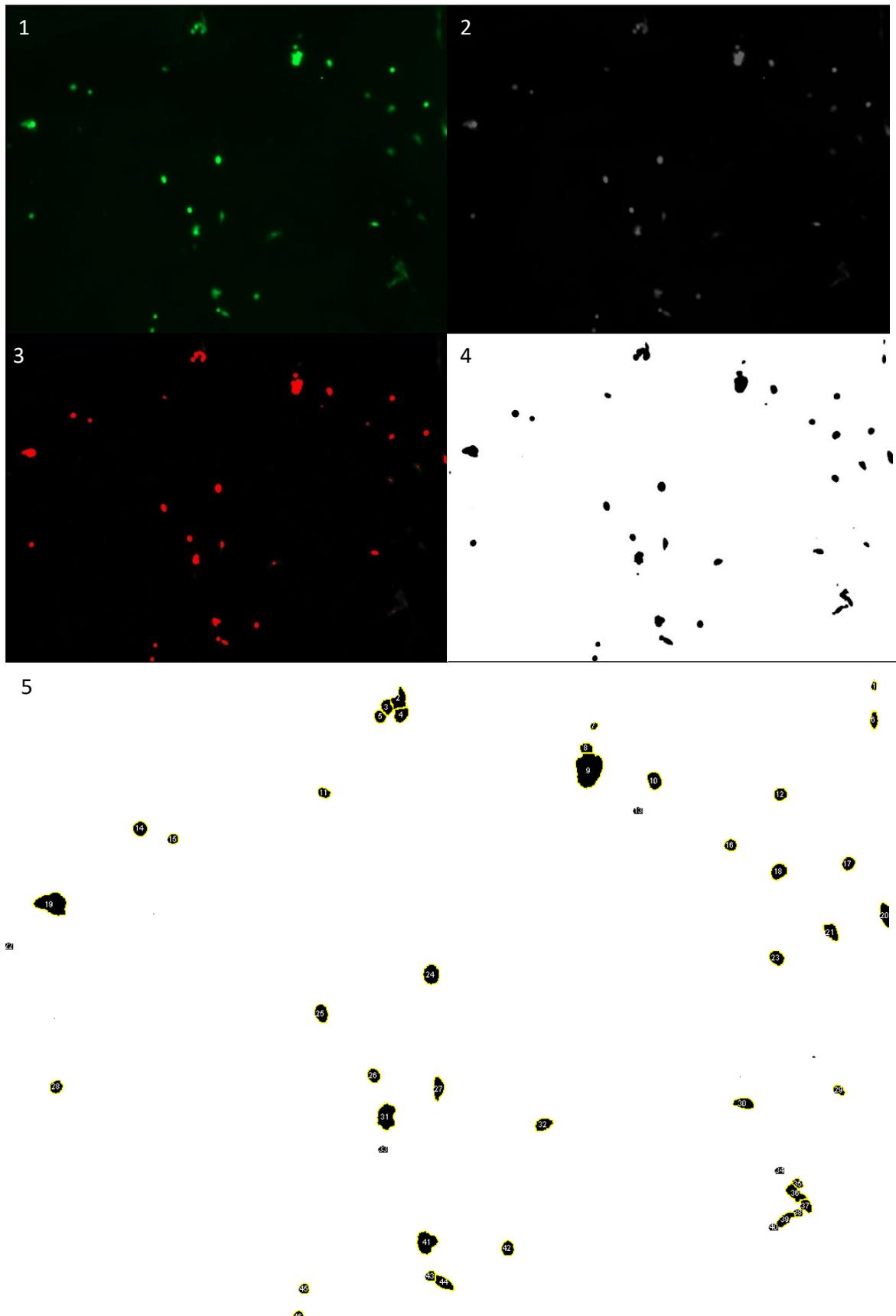


FIGURE 5.3 – Etapes du traitement d'image pour le comptage cellulaire.

maximum nécessaire à cette séparation est mesurée. La contrainte associée correspond à l'adhésion.

#### 5.4.4.4 Adhésion *ex vivo* : essais sur organes

Les mesures d'adhésion entre les différents PECs et les organes sont réalisées de la même manière que pour l'étude sur les surfaces modèles. Pour ce faire, des organes porcins (foie et pancréas) sont prélevés le jour même et conservés dans une solution physiologique à 0 °C. Avant la mesure, des prélèvements d'une partie externe de l'organe frais sont excisés et immergés dans une solution physiologique thermorégulée à 25 °C ou 40 °C. Le PEC à analyser est fixé sur une sonde de diamètre 10 mm et mis en contact avec la surface de l'organe prélevé pendant 5 minutes, avec une force d'application de 500 g. Au bout de ce temps, le matériau est séparé de la surface de l'organe (0,5 mm/s) et la force maximum nécessaire à cette séparation est mesurée. La contrainte associée correspond à l'adhésion.

## Références

- [1] M. Robitzer, A. Tourrette, R. Horga, R. Valentin, M. Boissière, J. Devoisselle, F. Di Renzo, et F. Quignard. Nitrogen sorption as a tool for the characterisation of polysaccharide aerogels. *Carbohydrate Polymers*, 85(1) :44–53, 2011. [209](#)
- [2] R. L. Johnson et K. Schmidt-rohr. Quantitative solid-state cross polarization C NMR with signal enhancement by multiple. *Journal of Magnetic Resonance*, 239 :44–49, 2014. [211](#)
- [3] W. D. Worthington Biochemical Corporation. *Manual of Clinical Enzyme Measurements*. 1972. [213](#)
- [4] S. Dash, P. N. Murthy, L. Nath, et P. Chowdhury. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta poloniae pharmaceutica*, 67(3) :217–23, 2001. [215](#)
- [5] R. W. Korsmeyer, R. Gurny, E. Doelker, P. Buri, et N. A. Peppas. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *International Journal of Pharmaceutics*, 15 (1) :25–35, 1983. [215](#)
- [6] C.-J. Huang et F.-C. Chang. Polypeptide Diblock Copolymers : Syntheses and Properties of Poly( N-isopropylacrylamide)- b-Polylysine. *Macromolecules*, 41(19) :7041–7052, 2008. [221](#)
- [7] F. Audouin et A. Heise. Surface-initiated RAFT polymerization of NIPAM from monolithic macroporous polyHIPE. *European Polymer Journal*, 49(5) :1073–1079, 2013. [223](#)

## Conclusion générale

Lors de ce travail de thèse, nous avons identifié les problématiques liées aux fistules pancréatiques (FPs) pouvant survenir dans le cadre du traitement de tumeurs situées au niveau du pancréas. Ces fistules donnent lieu à un écoulement intra-péritonéal du liquide pancréatique, conduisant à des complications pouvant être lourdes, voir mortelles pour les patients.

Il a été proposé d'élaborer un biomatériau absorbant afin de limiter la dissémination de ces fuites. Les différentes études ont mené à l'élaboration d'une matrice à base d'alginate et de chitosane assemblés sous forme d'un complexe polyélectrolyte (PEC). Bien que des architectures poreuses permettent des propriétés d'absorption plus importantes, l'étude a montré que le milieu extérieur était déterminant. En particulier, l'augmentation des capacités d'absorption des matrices poreuses en milieu pancréatique simulé ne justifie pas l'emploi de procédés des séchages plus complexes (Lyoph et SCC). L'évaporation se présente ainsi comme une technique simple permettant l'obtention d'une matrice aux capacités absorbantes intéressantes. Dans le cas des FPs, les fuites pancréatiques oscillent entre 50 mL à 200 mL par jour et 90 % sont classiquement exfiltrées par des drains. Au vu des volumes importants que représentent ces fuites, il ne s'agit pas de substituer les matrices absorbantes aux drains, mais d'apporter un soutien limitant la diffusion du liquide dans le milieu péri-pancréatique. Ainsi, en pouvant absorber jusqu'à 8 fois son poids, un film de 1 g, tel qu'élaboré lors des études présentées ici, peut emmagasiner jusqu'à 8 mL de sécrétions pancréatiques tout en obstruant la fistule. Cette matrice est résistante aux enzymes mais se dégrade au cours du temps ce qui permet d'éviter une intervention chirurgicale consistant à la retirer. De plus, des travaux précédents ont montré que l'incorporation d'une couche imperméable permettait de limiter la diffusion des liquides absorbés.

Au-delà de l'aspect absorbant, le deuxième point de ces travaux a porté sur la fonctionnalisation de la matrice absorbante. Il s'agissait de s'intéresser aux propriétés de surface pouvant être conférées à ces matrices afin d'en faciliter l'usage. Le PNIPAM est connu dans la littérature pour apporter des propriétés bioadhésives thermorégulées aux surfaces. Toutefois, seules de rares études rapportent ce type comportement envers des tissus biologiques, et le transfert de la thermosensibilité de l'adhésion cellulaire, connue, envers des organes était le défi le plus important de ce projet.

La modification de la surface de la matrice absorbante, c'est-à-dire le greffage du PNI-

PAM en surface, a donc été la deuxième étude de ce projet. L'application biomédicale ainsi que l'étendue du projet ont imposé l'utilisation de procédés de synthèse simples et les moins toxiques possible. En outre, ces procédés devaient être modulables puisque les propriétés bioadhésives sont dépendantes de la longueur des chaînes greffées et de la densité de greffage. Les PECs étant des systèmes complexes, plusieurs études préliminaires ont été menées afin d'arriver au greffage efficace du PNIPAM de différentes tailles, commercial ou synthétisé par polymérisation RAFT. Finalement, il est apparu que la disponibilité des fonctions réactives de l'alginate et du chitosane pouvait être améliorée via des traitements acides. Différents types d'échantillons, faisant varier longueur de chaîne et densité de greffage, ont pu être mis au point. Dans la littérature, le greffage du PNIPAM est généralement effectué sur des surfaces modèles inorganiques, type Si. Le greffage sur des PECs, dont la surface est moins maîtrisée et définie, représentait le premier défi de projet et a été effectué avec succès. La détermination de la LCST, sur les gels, par des techniques rhéologiques ou spectroscopiques (UV-visible) serait néanmoins une perspective intéressante pour le projet.

La caractérisation de telles surfaces (organiques, chargées, rugueuses...) était une difficulté supplémentaire, puisqu'un certain nombre de techniques de caractérisation n'étaient pas applicables (SPR, Réflectométrie, Ellipsométrie...), notamment lorsqu'il s'agit d'étudier des couches nanométriques. La rugosité de surface, le caractère absorbant et la multiplicité des étapes d'élaborations ont de plus donné lieu à des écarts de mesures parfois importants, comme dans le cas des études d'hydrophilie. Toutefois, les analyses via XPS, bien que délicates du fait de la pollution éventuelle des surfaces, ont permis de mettre en évidence le greffage du PNIPAM en surface. Il est de plus à noter que des réactions parasites (aminolyse) peuvent se produire entre les amines du chitosane et les groupements thio(carbonylthio) du CTA. L'élimination du CTA en fin de polymérisation, par l'action d'une autre amine primaire, pourrait permettre d'optimiser cette étape de greffage.

Les études *in vitro* ont en outre permis d'observer la fonctionnalité thermosensible des surfaces, avec une bioadhésion cellulaire favorable au-dessus de la LCST du PNIPAM. Il s'agit d'un résultat important de ce travail de thèse : les observations de la littérature concernant les propriétés d'adhésion cellulaires thermorégulées du PNIPAM ont ainsi été confirmées sur des surfaces à base de biopolymères. L'étude d'adhésion entre les PECs greffés et des surfaces modèles (PMMA, Ti, Téflon) a révélé que les interactions PNIPAM/matériaux pouvaient être complexes, notamment, peut-être, du fait d'interactions entre les chaînes de PNIPAM et leur substrat. Les études réalisées *ex vivo* ont quant à elles révélé des interactions plus favorables en dessous de la LCST qu'au-dessus, contrairement à l'objectif initial. Il est difficile d'expliquer ce comportement, mais il semblerait que l'augmentation de la quantité de PNIPAM en surface tende à inverser le phénomène. Si des précautions doivent être prises concernant cette hypothèse, une diminution des interactions des chaînes de PNIPAM greffées avec leurs substrats pourrait expliquer cette

tendance, qui reste à être confirmée. L'utilisation de PNIPAM de plus grande taille pourrait alors permettre d'atteindre l'objectif de bioadhésion thermorégulée appropriée à l'application chirurgicale visée. En outre, cela permettrait d'améliorer la compréhension théorique des phénomènes en jeux.

Enfin, des études supplémentaires doivent mener à l'identifier la méthode de stérilisation la plus adaptée, c'est-à-dire capable de maintenir l'intégrité du matériau et les propriétés de surface avancées.

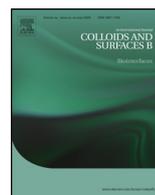
De manière générale, l'étude fondamentale des phénomènes observés serait une suite intéressante au projet. L'élucidation des interactions PNIPAM/substrat permettrait d'étoffer les hypothèses posées lors de ces travaux, et contribuerait à une meilleure compréhension générale de ce polymère et des phénomènes de (bio)adhésion.



---

## **Publications associées**





# PNIPAM grafted surfaces through ATRP and RAFT polymerization: Chemistry and bioadhesion



G. Conzatti<sup>a</sup>, S. Cavalie<sup>a</sup>, C. Combes<sup>b</sup>, J. Torrisani<sup>c</sup>, N. Carrere<sup>c,d</sup>, A. Tourrette<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> CIRIMAT, University of Toulouse, CNRS, INPT, UPS, Université Paul Sabatier, Faculté de Pharmacie, 35 Chemin des Maraichers, 31062 Toulouse cedex 9, France

<sup>b</sup> CIRIMAT, Université de Toulouse, CNRS, INPT, UPS, ENSIACET, 4 allée Emile Monso, CS 44362, 31030 Toulouse cedex 4, France

<sup>c</sup> Université Fédérale Midi-Pyrénées, Université de Toulouse III Paul Sabatier, Inserm U1037, CRCT de Toulouse, 2 avenue Hubert Curien CS 53717 31037 Toulouse Cedex 1, France

<sup>d</sup> Gastrointestinal Surgery Department, Purpan Hospital – CHU de Toulouse, Place du Dr Baylac, 31059 Toulouse, France

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 14 July 2016

Received in revised form

25 November 2016

Accepted 7 December 2016

Available online 7 December 2016

### Keywords:

Surface functionalization

Reversible addition fragmentation chain transfer polymerization

Atom transfer radical polymerization

Poly(*N*-isopropylacrylamide)

Bioadhesion

## ABSTRACT

Biomaterials surface design is critical for the control of materials and biological system interactions. Being regulated by a layer of molecular dimensions, bioadhesion could be effectively tailored by polymer surface grafting. Basically, this surface modification can be controlled by radical polymerization, which is a useful tool for this purpose. The aim of this review is to provide a comprehensive overview of the role of surface characteristics on bioadhesion properties. We place a particular focus on biomaterials functionalized with a brush surface, on presentation of grafting techniques for “grafting to” and “grafting from” strategies and on brush characterization methods. Since atom transfer radical polymerization (ATRP) and reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT) polymerization are the most frequently used grafting techniques, their main characteristics will be explained. Through the example of poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAM) which is a widely used polymer allowing tuneable cell adhesion, smart surfaces involving PNIPAM will be presented with their main modern applications.

© 2016 Published by Elsevier B.V.

## Contents

1. Introduction .....	143
2. Bioadhesion .....	144
2.1. Bioadhesion mechanisms .....	144
2.2. Surfaces and bioadhesion .....	144
3. Surface modification .....	147
3.1. Brush structure .....	147
3.2. Grafting techniques .....	147
3.2.1. Atom transfer radical polymerization (ATRP) .....	147
3.2.2. Reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT) radical polymerization .....	148
3.3. Characterization of brushes .....	148
4. Smart bio-surfaces: example of poly( <i>N</i> -isopropylacrylamide) thermosensitive surfaces .....	150
5. Conclusion .....	152
Acknowledgement .....	152
References .....	152

## 1. Introduction

Current developments in medicine have led to a need for new biomaterials in applications involving innovative strategies

for disease treatment. These biomaterials have to fulfil various requirements depending on the application but in all cases biocompatibility is a crucial point that has to be considered in early processing stages. Biocompatibility is defined as the ability to act in a living system without any toxicity or rejection, whether physiological or immunological. Although biocompatibility includes “non-toxicity”, these two concepts still remain differentiated. Sur-

\* Corresponding author.

E-mail address: [audrey.tourrette@univ-tlse3.fr](mailto:audrey.tourrette@univ-tlse3.fr) (A. Tourrette).

face functionalization of a material is sometimes necessary to avoid strong inflammatory responses and improve biocompatibility.

On the other hand, surfaces not only act as passive interfaces between the body (immune system, blood, cells) and the biomaterial but also take an active part in cell spreading, proliferation, differentiation and migration: all of these phenomena are intensively linked to surface/cell interactions. Thus, surfaces play a crucial role in the function of the biomaterial and can be used, for example, as activators of cells for tissue reconstruction (tissue engineering) [1]. In this field, cell adhesion to the surface is a key factor that must be carefully considered. Bioadhesion is defined as the adhesion between a biological entity, e.g. cells or tissues, and a surface. It is a complex phenomenon that involves many parameters. For a long time, it was difficult for scientists to clearly identify the mechanisms underlying cell adhesion, but they are becoming increasingly well understood. The interest of scientists for bioadhesion is not only theoretical but is also essential for the wide spectrum of applications depending on cell/surface affinity.

In cell sheet engineering, surface properties are used to control cell adhesion, so the living sheets can be stripped off easily. It was shown that cell sheets integrate well into tissues [2] and are promising tools for tissue reconstruction. Smart surfaces tunable between “on” (adhesive) and “off” (non-adhesive) states are then feasible. Naturally, the study of thermosensitive materials has been widely reported in the literature. Poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAM) is a promising polymer as a change of its hydrophilic interactions, and indirectly bioadhesiveness, takes place between the room temperature and body temperature. More precisely, its lower critical solution temperature (LCST) occurs at 32 °C. While the monomer is cytotoxic, the polymer shows no toxicity for the various cell types [3] and constitutes a good example to help understand bioadhesion mechanisms. Its characteristics make this polymer one of the most intensively studied in the literature whether grafted or coated onto material surfaces.

Plasma treatment is probably the most common process for surface modification, both for the introduction of functional groups or for coating the surface with polymer [4]. In the presence of air, oxygenated surfaces will be produced under the plasma, leading to a change in hydrophilicity [5]. This modification can involve an increase in cell adhesion, as is the case for polystyrene (PS) [6]. In addition, the plasma can etch the surface, enhancing its roughness. This modification of topography, as observed in plasma-treated poly(methyl methacrylate) (PMMA), tends to increase the cell affinity to these surfaces [7]. The introduction of reactive groups also permits compounds or chemical functions to be grafted onto the material surfaces. In the presence of oxygen, surfaces activated *via* the introduction of hydroxyl groups, can be grafted with monomers or polymers, such as NIPAM/PNIPAM through *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide (EDC)/*N*-hydroxysuccinimide (NHS) amide coupling [8]. Under argon plasma, radicals will be produced. These radicals can be used directly or, after exposition to air, create peroxides that can initiate polymerization [9].

While plasma treatment presents the advantage of being easy to perform on materials, only a low level of surface structuring is obtained. In addition, it was shown that plasma-deposited PNIPAM shows greater cell adhesion than e-beam coated PNIPAM [10]. These results emphasized the importance of the method used for surface modification. Control of the surface structure also seems to be a critical point. A brush structure, *i.e.* a self-assembled close-packed monolayer of polymer chains, provides precise control of the surface morphological properties. More specifically, it becomes possible to control the thickness and the density of the grafted layer. As a result, these structures are now extensively used, especially for biomedical applications, and display good performance in terms of bioadhesion [11].

To obtain controlled brushes, a well-defined grafted polymer is necessary. Controlled radical polymerization can be used to control polymer grafting using various techniques. The most popular ones are ring-opening polymerization, nitroxide-mediated polymerization, reversible addition fragmentation chain transfer (RAFT) and atom transfer radical polymerization (ATRP). A review of functional polymer brushes produced by controlled radical polymerization was published by Olivier *et al.* [12]. RAFT polymerization and ATRP are widely used as they are versatile and reduce poly-dispersities. They rely on the equilibrium between dormant and active species, so are sometimes called “living” polymerizations.

It is necessary to understand cell adhesion mechanisms to design a biomaterial with tunable bioadhesion properties. The aim of this review is not to be exhaustive on surface modification processing but to give a comprehensive multidisciplinary overview of the cell/surface adhesion mechanisms as well as the chemical engineering of surfaces. Hence, an introduction to cellular biology and bioadhesion will be made. A second part will deal with brushes and the chemical routes used to obtain such structures. More precisely, ATRP and RAFT polymerization methods will be reviewed along with the ways in which they have been characterized. Finally, engineering of tunable surfaces using PNIPAM will be presented with its main and most recent applications.

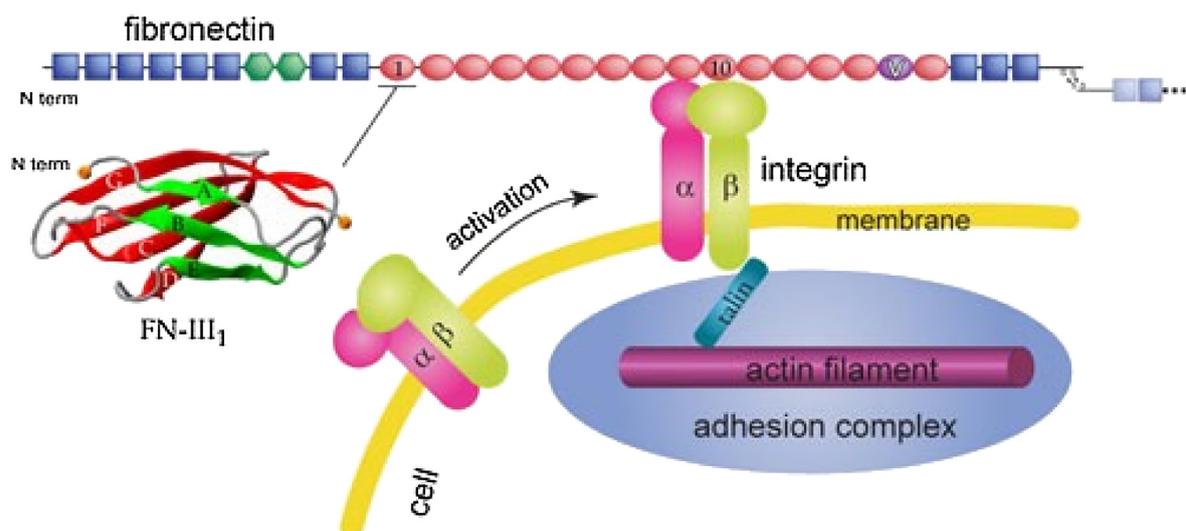
## 2. Bioadhesion

### 2.1. Bioadhesion mechanisms

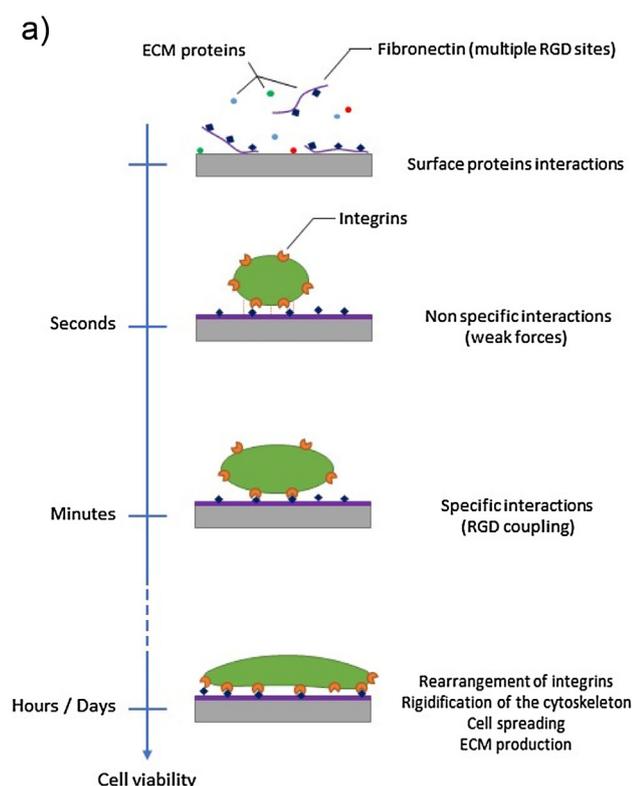
With a size from 1 to 100 μm, cells are composed of various entities. Some are dedicated to its structure: a phospholipid bilayer, the cell membrane, maintains the separation between the cytosol (internal liquid phase) and the extra-cellular matrix (ECM) and the cytoskeleton, composed mainly of microtubules and actin filament networks, control the rigidity of the structure [13]. The ECM composition varies depending on the tissue concerned. It contains a number of proteins: fibronectin, collagen, laminin, but also growth factors and all the proteins needed for cell support and inter-cell communication. Actin filaments assemble to constitute the cytoskeleton. They are connected to integrins (transmembrane glycoproteins) through vinculin and talin (Fig. 1) [14,15]. These integrins specifically bind to ECM proteins such as fibronectin (or vitronectin) through arginylglycylaspartic acid (contraction of L-arginine, glycine, and L-aspartic acid, abbreviated RGD) coupling. These integrin/ECM protein interactions are responsible for cell adhesion to surfaces (intercellular cohesion is regulated by other mechanisms, *e.g.* cadherin-mediated homotypic junctions). This adhesion is commonly divided into the different phases described in Fig. 2a [16]. The first seconds of contact are characterized by the formation of non-specific interactions. Then, biological interactions occur, including adhesion protein/fibronectin interactions. This second step leads to a cascade of actions including the reorganization of the cytoskeleton and clustering of integrin receptors. Consequently, cells contract their cytoskeleton to maintain a mechanical state of tension, also called prestress. Later, cells produce ECM to reinforce their integration and maintain a propitious environment. It is thus obvious that the adsorption of adhesive proteins is a key point for cell adhesion.

### 2.2. Surfaces and bioadhesion

Two main parameters will determine the behavior of implanted biomaterials: (1) their bulk properties, especially the rigidity, plays a role in the quality of the implantation into tissues, and (2) their surface properties control the immune system response (called immunogenicity), the destruction of cell integrity, and the bioad-



**Fig. 1.** The adhesion structure of a cell in a matrix. The matrix is linked to the cytoskeleton through integrins and talins. Reproduced from Ref. [14] with the permission of The Royal Society of Chemistry.



**Fig. 2.** (a) Stages of cell adhesion: interactions and kinetics. (b) SEM picture of a myoblast cell on an artificial surface, 2001. Fig. 2b is reprinted from Ref. [17]. Copyright (2002), with the permission of Elsevier.

hesion. As cell membranes are anionic, cationic surfaces have to be carefully used since they can damage cells and tissues, whereas negatively charged polymers will electrostatically repel cells [18–21]. The importance of surface/cell interactions has been investigated for many years, and an interesting discussion was published in 2001 by Castner *et al.* [17]. In this aim, synthetic materials and bioadhesion have been studied and observed by scanning electron microscopy (SEM, Fig. 2b).

An important point is to realize that in a living system surfaces are spontaneously covered by proteins. It is now better understood

that cell adhesion is both ruled by (i) specific (biological) interactions (receptor/ligand) and (ii) the physico-chemical properties of the material. Hydrophilicity, mechanical properties and morphology are among the parameters involved in the bioadhesion process.

As mentioned above cell adhesion between tissues and ECM is possible through the specific binding of integrin with fibronectin (Fig. 1) [22]. In 2011, Pei *et al.* observed the importance of specific interactions (*i.e.* fibrinogen RGD coupling) in the process of attachment between cells and their substrate [23]. They noted the number of human foreskin fibroblast (hFF) cells and how they

spread on poly(ethylene glycol) (PEG) brush surfaces (see Section 3.1) grafted onto TiO<sub>2</sub> and compared pre-treated hFF (blocked integrin bonding-sites) and non-treated hFF (free integrin bonding sites).

The number of attached cells strongly decreased when the integrin bonding sites were blocked. Nevertheless, weak non-specific interactions occurred when there was a high level of affinity between the cells and the biomaterial. This study also provides precious information on the influence of the PEG brush density. PEG is an anti-fouling polymer. At high grafting density, PEG chains are collapsed in a “brush regime” ( $L < 2R_g$ , with  $L$  the distance between two neighboring chains and  $R_g$  the radius of gyration of polymer chains), whereas a “mushroom regime” is observed at lower values ( $L > 2R_g$ ). A gradient of PEG was used to observe its effect on protein adsorption and cell adhesion. For short experiments, as the density of PEG increased, a strong decrease of the number of adhered cells occurred when the brush regime was reached and a correlation established with the protein adsorption profile. Fibroblast saturation occurs in the “brush regime”, meaning that even a low amount of fibrinogen ( $2.2 \pm 3.4$  ng/cm<sup>2</sup>) is sufficient to activate adhesion. Here the importance of protein/cell specific interactions is obviously crucial.

A model involving a protein layer between biomaterials and cells was established in the early 2000's [1,17,24]. According to this model, cell/matrix adhesion depends on the ability of the surface to adsorb proteins without modifying their native structure. Denaturation is brought about by the water structure near the surface, *i.e.* the hydrophilicity of the superficial layer on the material. A review, published in 2011 dealt with the concept of native immune system response (cascade system) [25]. The article emphasized the importance of the non-denaturation of protein structure at the material/body interface to avoid activation of the primary immune system. In 1998 Volger *et al.* already underlined the importance of surface chemistry in terms of hydrophobic/hydrophilic properties [26]. This group showed that water/surface interactions are of interest. As criteria of hydrophilicity/hydrophobicity they used contact angle measurements. A strongly bound water to a surface (*i.e.* hydrophilic surface) cannot be removed. This will avoid interactions directly between a biological entity (*e.g.* a protein), and the surface, leading to low or absence of adsorption [27]. Moreover, it is widely accepted that moderately hydrophilic materials are suitable for cell adhesion, with a contact angle around 70–80° [28,29]. For example, endothelial cells show good attachment to polycaprolactone-grafted-poly(methyl methacrylate) (PCL-g-PMMA) surface with a contact angle around 70°. Additionally, it is now accepted that surfaces which are too hydrophobic lead to the denaturation of proteins [1,28]. More precisely, hydrophobic and hydrophilic amino acids, constitutive of proteins, rearrange their organization depending on the surrounding media and thus hydrophobic surfaces can favor the externalisation of hydrophobic moieties, leading to unfolded proteins [30]. Regarding this assessment, post-treatments (*e.g.* plasma treatments) are sometimes used to increase surface hydrophilicity through the introduction of polar functional groups. In contrast, it is known that the interactions of highly hydrophilic surfaces with ECM adhesion proteins are weak [6]. Keselowsky *et al.* characterized various functional groups on the criteria of fibronectin adsorption (in increasing order):  $OH < COOH < CH_3 < NH_2$ . On the other hand, adhesion of osteoblasts increases as follows:  $CH_3 < NH_2 = COOH < OH$  [31]. This trend inversion can be explained by the geometrical deformation of ECM proteins, *i.e.* denaturation. On brush surfaces, the optimal contact angle depends not only on the nature of the matrix but also on the method of surface modification. This can be due to the influence of chain length and density of the grafted polymer on the conformation of the protein adsorbed on the surface. For instance, it has been pointed out that when Fe<sup>2+</sup> is used as initiator for the graft polymer-

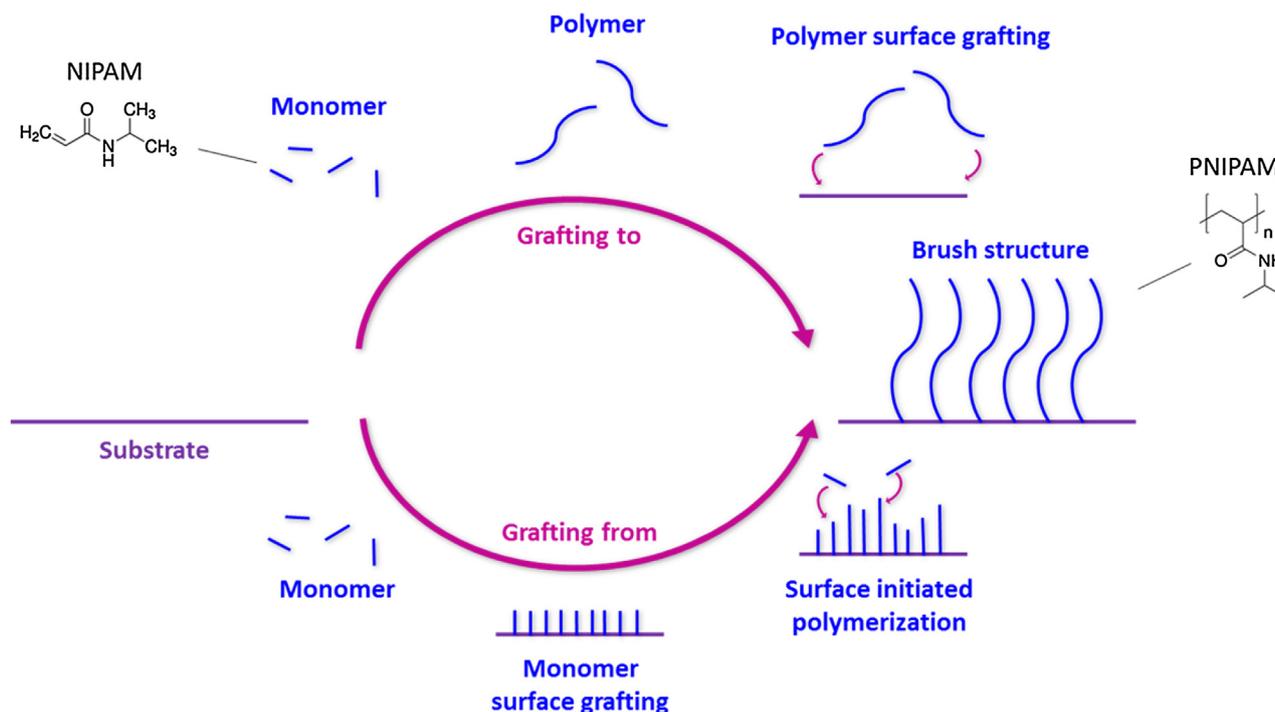
ization of PMMA on poly(L-lactic acid) (PLLA) surfaces, maximum chondrocyte attachment is obtained when the contact angle is 52°, whereas UV-initiated surfaces are optimal for a contact angle of 76° [28]. The authors suggest that the difference of biological properties between the two PLLA grafted PMMA could be due not only to surface wettability (contact angle) but also to the higher density, uniformity and shorter chains of iron-initiated polymerized surfaces. The wettability criterion is obviously strongly limited as the surface mechanical properties and structure, cell types and charge density are ignored. For example, Bacakova *et al.* showed that soft matrices are not favorable for cell adhesion [6]. They explained that ECM deposited on such surfaces is not able to resist the forces involved during cell focal point formation.

Indeed, specific interactions are not enough to describe adhesive phenomena entirely and physico-chemical properties have to be added to the equation. Hence, the internal organization of cells is remodelled throughout their life and is strongly influenced by the surrounding medium not only *via* chemical stimulation but also by mechanosensing, until a morphological equilibrium is reached [13,32]. Thereby, the shape of cells, as well as their rigidity and motility depend on their support. For example, many cells have the ability to sense the stiffness, by applying a stress, of their external environment. These cells include brain, muscle, neurons and many other cell types [33]. Cells probe the surface through myosin and actin filament cross-bridging and a stiffness control loop is set up: cytoskeleton and adhesion will adapt depending on the feedback. As a consequence, stiffer matrices lead to an increase in the elasticity of the cells, and can be measured by atomic force microscopy (AFM) [34] or, more gently, by indentation with optical tweezers [35]. However, rigidity scanning of the cell substrate is a time-consuming process, taking from minutes to hours [13], thus viscosity can be considered, in the case of a gel for example. Sometimes, cross-linking can improve cell activity on a gel [36]. In addition, mechanosensing can be an initiator of cell displacement on surfaces (mechanotaxis, discovered by Lo *et al.* [37]), from the soft to the stiff [38] and motility were shown to be linked to focal contacts and thus indirectly to cellular adhesion [39,40].

Moreover, depending on their type, cells will not behave in the same way depending on the elasticity of the biomaterial. For instance, on soft matrices, fibroblasts adhere in a labile way whereas on stiffer materials they make stable focal points (adhesion) and rigidify their cytoskeletons. Consequently, the motility of fibroblasts on stiff materials is reduced [38]. The mobility of the chains that constitute the brushes could also lead to superficial mechanical instability and thus to lower adhesion [41].

Despite the adhesion of cells, the biomaterial can also disturb cell activity. A perturbation in the exocytosis response of cells is revelatory of this perturbation in ways that can, for instance, be measured by histological studies or carbon-fibre microelectrode amperometry (CFMA), as observed by Reed *et al.* [10]. In this study, the introduction of PNIPAM (through plasma deposition or spin coating) on surfaces have shown to slow down the cell exchange between vesicles and extracellular space. Additionally, spin-coated PNIPAM were shown to hyper-activate the exocytosis activity of cells, whereas plasma deposited PNIPAM only affected kinetics. If this hyper-activation by the surface can present harmful effects, some studies seek for accelerating tissue regeneration by modifying the surface, such as observed by the introduction of free amino group on PLLA surfaces [42]. The surface architecture is also a key point. 3D architectures are commonly modulated in the field of tissue engineering, as they reproduce a more realistic natural biological environment. A nice review of this topic was published by Abbott and Kaplan in 2015 [43].

In conclusion, the surface hydrophilicity (presence of functional groups), the surface structure and stiffness are characteristics that must be considered for efficient bioadhesion. However, in the



**Fig. 3.** Two different strategies of polymer grafting (example of PNIPAM): the surface initiated polymerization of a monomer (“grafting from”) or the grafting of the polymer (“grafting to”) on a surface to obtain a brush structure.

present review, we only consider surface modification that does not involve any bulk modification, in particular in term of biomaterial stiffness, and the effect of brush structures on mechanical surface properties will not be discussed. Below, we focus on a key step, *i.e.* the choice of surface modification method used to obtain brush structures on material surfaces that enable good control of the surface state and properties.

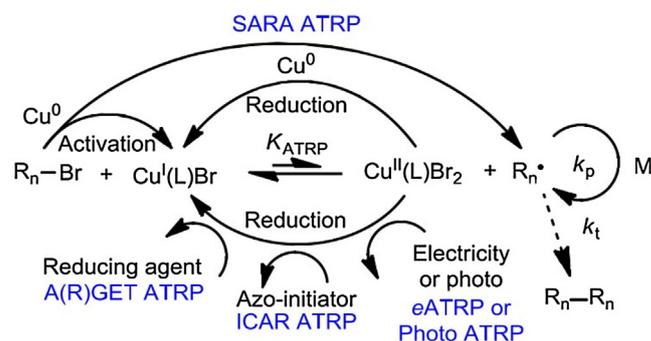
### 3. Surface modification

#### 3.1. Brush structure

As discussed above, the control of biomaterial surfaces is a challenge for scientists involved in the development of medical devices. Brush structures in particular are interesting in terms of protein penetration and calibration studies [44]. Thanks to recent developments in chemistry, various techniques are available to graft or coat biomaterials with polymers. For biological applications, covalent grafting seems to be the best choice compared to physically grafted systems, due to risks of desorption with this latter method. Polymer brushes, which consist on a thin film of self-assembled polymers, are of interest [10,45]. Wettability, but also the variety of possible end-group functions, the substrate and the chemistry are the main points that make these systems attractive. The modularity of the polymer brush synthesis is illustrated by the broad range of systems that have been developed in recent years: uniform, patterned, or gradient (in terms of density or chemical composition) brush layers have been prepared with one or several polymers [12,45].

Two different approaches can be considered, namely “grafting to” (*i.e.* to the surface) and “grafting from”, as shown in Fig. 3 [45,46].

The “grafting to” method consists in coupling an end-functionalized polymer and a reactive surface. This approach yields well-defined grafted polymer. However, the deposited layers have low densities and their thickness is limited (100 nm [47]) due to the steric hindrance during grafting and diffusion processes [48–51].



**Fig. 4.** Advanced ATRP mechanisms catalyzed by Cu(I)/Cu(II) complexes. Reprinted from Ref. [54], Copyright(2014), with permission of Elsevier.

The “grafting from” method consists in polymerization directly from the surface. Several techniques are based on this process. Surface-initiated polymerization (SIP) based on radical chemistry is commonly used [47,51,52]. “Grafting from” techniques yield higher grafted layer densities and overcome thickness limitations. These advantages made this strategy the most widely adopted. However, the characterization of grafted chains is more difficult and, apart from model surfaces, still remains a great challenge.

Various techniques are commonly used for grafting polymers to surfaces, both for “grafting to” or “grafting from” strategies [47,53,54]. Among these techniques, the most used, *i.e.* ATRP and RAFT, will be developed in the next sections.

#### 3.2. Grafting techniques

##### 3.2.1. Atom transfer radical polymerization (ATRP)

As is generally the case in controlled radical polymerization, ATRP chemistry relies on the equilibrium between active and dormant chains [46,47,55,56]. The mechanism is illustrated in Fig. 4. Surface initiated ATRP (SI-ATRP) is a “grafting from” technique that

consists in immobilizing a halogenated initiator on the surface, followed by ATRP. The main advantages of the ATRP are the close control of film thickness and chain length with low polydispersity [47]. It is also possible to control thickness and graft density separately, by modulating the reaction time and stoichiometric ratio, respectively [57,58]. In addition, ATRP is known to be versatile and easy to perform (mild conditions) [51,58,59]. While high temperatures make the reaction time shorter, some studies also show a slight reduction of the polydispersity [60]. Nevertheless, the need of metal catalysts is a limitation for biomedical applications. Basically, the metal is oxidized/reduced, and thus generates or absorbs a radical, leading to the activation/deactivation of polymer chains, respectively as shown in Fig. 4. At the present time, due to its high catalytic activity copper is used most [61,62]. Iron catalyzed-ATRP can be performed using low amounts of catalyst, reducing the toxicological risks as iron is considered less toxic and more environmentally friendly than copper [63–65]. Iron is also the most abundant metal on earth making it relatively cheap; these characteristics have initiated a lot of research and interest in Fe catalyzed organic chemistry, including ATRP, in line with the perspectives of “green chemistry” [66,67]. The choice of the ligand is a complex question; it depends on the nature of the polymer and the catalyst used [68]: for example, pentamethyldiethylenetriamine (PMDETA) can be used in combination with Cu [69], and tris(3,6-dioxaheptyl) amine (TDA) with Fe [70]. Furthermore, the activators regenerated by electron transfer (ARGET) ATRP, developed by Matyjaszewski *et al.* diminish the amount of catalyst needed (< 50 ppm) [71,72]. This advanced ATRP, derived from the AGET-ATRP (for activators generated by electron transfer ATRP) involving a reducing agent to initiate the reaction, consists in using an excess of reducing agent (e.g. environmentally friendly ascorbic acid [73]). This initiator does not only generate but also maintains a sufficient amount of Cu(I) (in the case of copper catalyzed ATRP) without the use of a radical organic compound which could lead to side reactions, cross-linking or the formation of new chains [55]. Another advantage of ARGET-ATRP is that the oxidized catalyst, e.g. Cu(II) or Fe(III), can be used directly without the need for early-stage reduction and careful handling. Finally, this technique increases the air tolerance and can avoid the need of a controlled atmosphere [74,75]. Ascorbic acid (also called vitamin C) is preferable to classic Sn reducing agents due to its non-toxicity towards human beings and the environment. However, ascorbic acid presents the disadvantage of being a strong reducing agent, so its use in water can lead to an extensive conversion of Cu(II) to Cu(I) and can diminish the control of ATRP. One solution would be to use a less efficient solvent, such as anisole, to decrease the reducing activity of the ascorbic acid [73,75].

Initiators for continuous activator regeneration (ICAR) ATRP use the addition of a free radical initiator such as azobisisobutyronitrile (AIBN) to (re)generate the active metal [63,71].

In supplemental activator and reducing agent (SARA) ATRP the reducing agent is M(0), e.g. Cu(0) for a copper catalyzed ATRP [67,76]. Using iron powder, the polymerization can be catalyzed by Fe(0) [60], with or without the use of Fe(III) salts but in this latter case a less controlled polymerization over time can occur [63].

Many ATRP elaborations are involved for surface modification, nonetheless we would like to mention biomedical uses of this chemical route: biofouling surfaces or membranes [77], double responsive cellulose membranes [78,79], cell attachment/detachment (through PNIPAM grafting) [69,80]. To perform a “grafting from”, the idea is to chemically graft the initiator on the surface so the growth will be directly initiated on the material. This step is facilitated by the fact that ATRP initiators are acyl bromides. A self-assembled monolayer (SAM) is generally also grafted before the initiator. ATRP can be achieved in combination with plasma treatments to help initiator immobilization [81]. A few examples of SI-ATRP are given in Table 1.

ATRP commonly exhibits a pseudo-first-order kinetics, at least below high rates of conversion. The direct characterization of grafted polymer through the “grafting from” method is difficult. Generally, a sacrificial initiator is used, assuming that the polymer growth is similar on the surface and in the medium [51,52,58,59,82–85]. Another method is to use reversible or breakable surface bonds in order to detach and study the grafted polymer [86]. A more detailed discussion on brush characterization is given in Section 3.3.

### 3.2.2. Reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT) radical polymerization

Similarly to ATRP, RAFT polymerization is a living polymerization based on the equilibrium between active (*i.e.* bearing radicals) and dormant chains, and also shows pseudo-first-order kinetics. Initiation is performed in traditional ways, e.g. using thermal initiators such as azobisisobutyronitrile (AIBN) or 4,4'-azobis(4-cyanovaleric acid), which has the advantage of being carboxylic acid end-functionalized. A chain transfer agent (CTA) (also called RAFT agent) ensures this equilibrium during the propagation steps, as shown in Fig. 5 [87,88]. The reduction of active chain concentration results in a narrow distribution of the chain length, with a polydispersity index (PDI), for PNIPAM, able to reach values around 1.20, but PDI below 1.10 can be obtained in optimal conditions [89–91]. Additionally, RAFT polymerization can be achieved with a broad range of temperatures, from room temperature to 140 °C [92]. A higher temperature allows a shorter reaction time; lower polydispersities can sometimes be expected.

One of the main advantages of RAFT polymerization compared to ATRP is that it is a metal-free chemical route. In contrast, it can require the synthesis of the RAFT agent. In modern RAFT polymerization, this agent classically contains a thiocarbonylthio moiety, as for the commonly used trithio-carbonate and dithio-carboxylate type. As the RAFT polymerization process relies on the kinetics of addition and fragmentation of this agent, the choice of its substitute, classically called Z and R, is crucial. Z is dedicated to the activation of the double bond by stabilizing the adduct radical, R is a leaving group. A complete discussion about the choice of the RAFT agent is available in the literature [92]. The surface initiated RAFT (SI-RAFT) polymerization of PNIPAM can allow to obtain polydispersities below 1.3 [93]. Thanks to the sulfuryl groups of the CTA, elemental analysis can, in some cases, be used to determine the quantity of grafted RAFT agent. The theoretical molecular mass of the polymer,  $M_{n_{th}}$ , can be estimated through the following equation:

$$M_{n_{th}} = \frac{[Mono]_0}{[CTA]_0} \times M_{Mono} \times conv. + M_{CTA}$$

where  $M_{Mono}$  corresponds to the molecular weight of the monomer,  $[Mono]_0$  to its initial concentration, *conv.* is the conversion rate of the monomer,  $M_{CTA}$  is the molecular weight of the CTA and  $[CTA]_0$  its initial concentration [91,93].

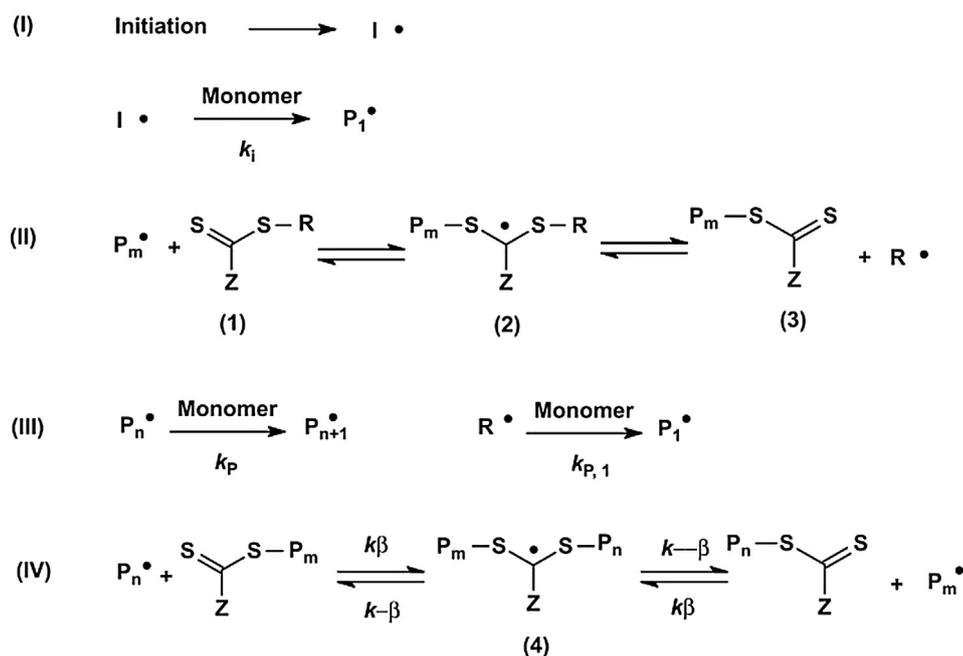
In order to perform SI-RAFT polymerization, the initiator [90] or the CTA [93] have to be previously grafted to the surface. In the first case the homolytic cleavage of the initiator will lead to growth either on the surface or in the medium, both with the free CTA. In the case of CTA grafted surfaces, the initiator and another amount of the RAFT agent are introduced to permit the polymerization of free chains and their characterization. Few examples of SI-RAFT polymerization are given Table 1.

### 3.3. Characterization of brushes

Characterization of the “grafted from” polymer brush is a challenging task. In specific cases, the grafted chains can be removed from their substrate [86]. In other cases, free chains are generally

**Table 1**  
Examples of surface functionalization with PNIPAM brushes using ATRP or RAFT polymerization process.

Radical polymerization	Technic	Substrate	Solvent	Refs.		
ATRP	grafting from	polyethylene terephthalate (PET)	water	[94]		
		Au	water/methanol	[95]		
		graphene	water	[96]		
		poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL)	water/methanol	[69]		
		parlyene C	DMF/water	[80]		
		Si	water/methanol	[97]		
		cellulose	various solvents	[98,99]		
		mesoporous Si films	water	[100]		
		RAFT polymerization	grafting to grafting from	Au nanoparticles	water	[89]
				mesoporous Si nanoparticle	DMF	[101]
aminated polyHIPE (high internal phase emulsions)	DMF			[93]		
cellulose	various solvents			[98,102]		
glass	dioxane			[90]		



**Fig. 5.** Mechanism of a RAFT polymerization. The CTA plays the role of activator/deactivator. Reproduced from Ref. [86], Copyright(2002), with permission of John Wiley and Sons.

produced (see Sections 3.2.1 and 3.2.2). If free polymer is generated, the molecular weight can be easily determined by size-exclusion chromatography (SEC) or viscosimetry. From optical waveguide lightmode spectroscopy (OWLS) the mass of a deposited polymer can also be obtained [23].

Moreover, the morphology, graft density and thickness have to be determined directly on the surface. AFM is a powerful tool to study morphology [103,104] (Fig. 6). For example, in the case of PNIPAM, a change in conformation accompanying a change in temperature can be observed by AFM [103].

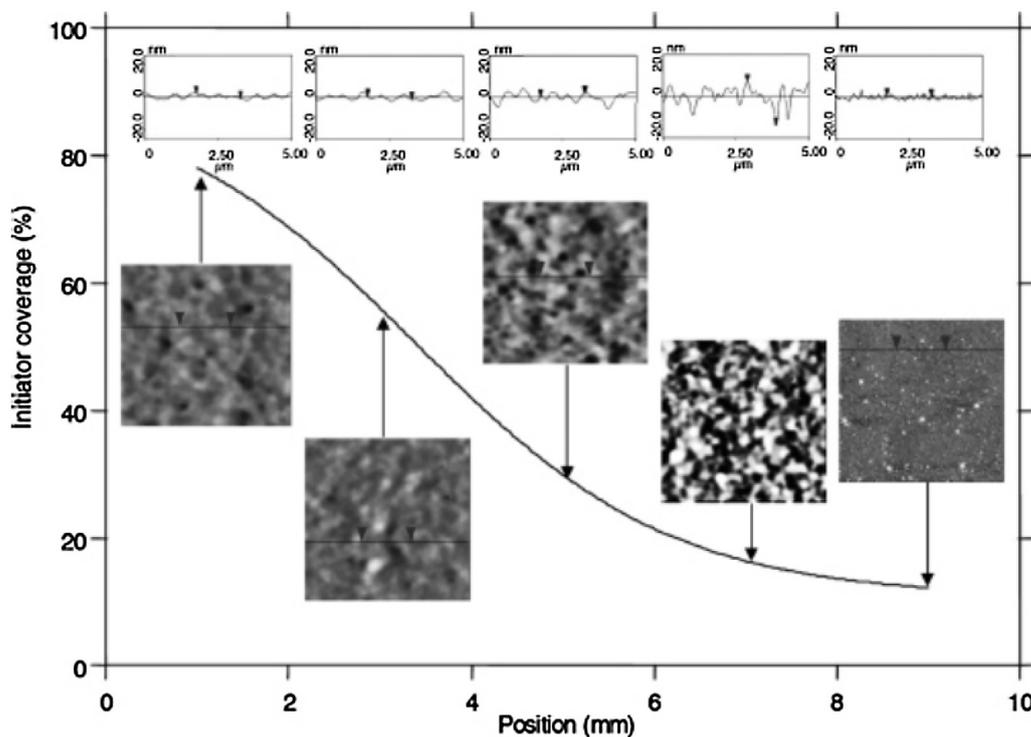
Surface plasmon resonance (SPR) gives the wet thickness of the layer, *i.e.* its thickness in a liquid environment, taking into account swelling phenomena. The dry thickness, *i.e.* in the absence of water, of the grafted layer can be measured by ellipsometry [103]. AFM can also be used to determine the dry thickness, but systematic errors were reported due to AFM tips being attracted by the PNIPAM layer [105]. PNIPAM grafting density can be deduced from the dry thickness value, through the following equation:

$$\sigma = \frac{h\rho N_A}{M_n}$$

with  $\sigma$  the graft density,  $h$  the dry thickness,  $N_A$  Avogadro's number and  $M_n$  the molecular weight. The density of dry PNIPAM,  $\rho$ , is sometimes arbitrarily taken equal to 0.95 g/cm<sup>3</sup> by certain authors [106], but the actual density can be measured by U-tube oscillation [107] or by X-ray reflectometry [108]. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy can also be used, in some cases, to determine the graft density, as reported by Mizutani *et al.* [109].

Chemical analysis can be performed through classic surface analysis: X-ray photoelectron spectrometry (XPS), attenuated total reflection FTIR spectroscopy (ATR-FTIR), Raman spectroscopy. For nanolayer studies, XPS is preferable to ATR-FTIR spectroscopy due to its lower penetration depth (a few nm for XPS against up to 1  $\mu$ m for ATR-FTIR spectroscopy) [28]. Secondary ion mass spectrometry (SIMS) techniques can be even more surface localized. In this technique, the surface is etched by an ion beam and sputtered material is collected by a detector. Elements and chemical structure can be determined.

Quartz microbalance (QCM) is an interesting tool for the evaluation of the amount of a deposited layer. The determination of the quantity of proteins adsorbed on a biomaterial surface can be obtained by measuring, *in situ*, the frequency shift of the quartz



**Fig. 6.** Relationship of PNIPAM film morphology to local grafting density as tracked through the initiator density. The grafting density increases, from a discontinuous mushroom structure (left, low grafting density), to a heterogeneous patchy structure (middle, intermediate grafting density). At high grafting density (right), a smoother, presumably more extended, structure is obtained. Reprinted from Ref. [102]. Copyright (2006), American Chemical Society.

[24]. Quartz microbalance with dissipation monitoring (QCM-D) is useful to obtain the swelling behavior of polymer brushes [97].

Finally, carbon fibre microelectrode amperometry (CMFA) can give information about biochemical exocytosis of cells (kinetics and amount of release) and thus evaluate how the substrate impacts the excretion activity of cells [10].

Most of these techniques are not applicable to “brush grafted on polymer” systems due to the relatively high roughness of this type of surface, which explains the lack of reliable brush characterization techniques in the literature.

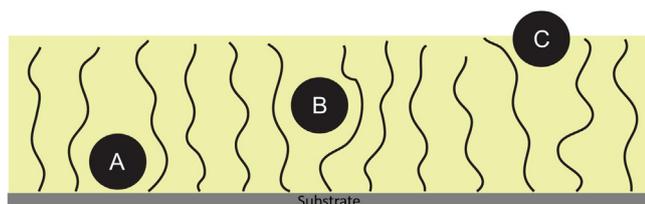
#### 4. Smart bio-surfaces: example of poly(*N*-isopropylacrylamide) thermosensitive surfaces

Poly(*N*-isopropylacrylamide) is a thermo-responsive polymer. Its structure is shown in Fig. 3. Indeed, PNIPAM changes its water affinity according to the temperature of the surrounding medium, turning from hydrophilic to hydrophobic. This change occurs at around 32 °C, whose temperature is called the lower critical solution temperature (LCST), and leads to a change in its conformation. Above this temperature, PNIPAM collapses in solution. This coil to globule transition is endothermic and is related to water/polymer and polymer inter and intra-molecule hydrogen bonding. In other words, below the LCST PNIPAM is bound to water through amide/water (C=O ··· H–O) hydrogen bonding. As the temperature increases above LCST, the polymer becomes dehydrated and amide/amine (C=O ··· H–N) hydrogen bonding appears [110,111]. In the case of surfaces grafted with PNIPAM, it means that a “brush” system can be turned into a “mushroom” conformation above the LCST. The LCST of PNIPAM was reported to depend on the chain length and the grafting density while remaining between room and physiological temperature making this polymer interesting for various biomedical applications [105]. Additionally, the use of PNIPAM in a copolymer system [112], as well as the presence of

salts can strongly influence this LCST [113,114]. Cl<sup>−</sup> and CH<sub>3</sub>COO<sup>−</sup> have a particularly strong influence as predicted by the Holfmeister series. Moreover, ion concentrations are generally low (below 0.15 M) in both culture media and body fluids, its influence thus has to be relativized. It is noteworthy to mention that proteins, if concentrated, can also affect the LCST of PNIPAM from a decrease of 2.6 °C to an increase of 1.5 °C, depending on the protein involved [111].

Surface interactions can be modulated by the temperature of the PNIPAM. This variation of the interactions is clearly observed by AFM measurements [105,115]. Bovine serum albumin (BSA) bound to AFM tips was used to study the variation of protein/PNIPAM surface interactions. It appeared that interactions are temperature dependent, with a protein adsorption phenomenon occurring above LCST [116]. This phenomenon was also observed using a QCM. The mechanism is related to PNIPAM hydration but is not well understood at the present time. Various studies were performed to evaluate the ability of PNIPAM to trigger cell attachment. In addition to their slight control of LCST, it appears that the grafting density and the chain length also play an important role on bioadhesion. Thus, the material seems to be resistant to the adsorption of either proteins or cells when chain density and chain length are both high [117]. This is explained by the difficulty for proteins to enter the PNIPAM layer due to steric hindrance when chain grafting is dense. Halperin *et al.* proposed a theoretical approach of mechanisms for harvesting cells cultured on thermoresponsive PNIPAM polymer brushes [118].

First, two interaction modes have to be examined when we consider particles (*e.g.* proteins) and a brush structure. The compressive mode, where the brushes are compressed by a particle, occurs when its size is greater than the space available between chains, taking into account the ability of chains to rearrange themselves around the particle. This is typically the case for cells. The other mode, the insertive mode, occurs for small particles, *e.g.*



**Fig. 7.** The three different modes of protein adsorption through brushes: (A) primary adsorption, (B) ternary adsorption and (C) secondary adsorption. Adapted from Ref. [117], Copyright(2012), with permission of Elsevier.

extra cellular proteins such as fibronectin. Here, we see the importance of the grafting density: high density limits protein insertion. Then, the depth of the inserted protein can also vary, forming three modes: primary, secondary and ternary adsorption (Fig. 7). High affinity between ECM proteins and substrate promotes primary adsorption, whereas a high grafting density tends to suppress primary and maybe ternary adsorption [117,118]. Primary and ternary adsorption favor bioadhesion, whereas a theoretical model predicts that secondary adsorption preferably occurs for large cylindrical proteins [44,119]. Nonetheless, if ternary adsorption mediated bioadhesion was shown to be possible, its effect on protein denaturation is still to be demonstrated [118]. Finally, a thin layer (*i.e.* low molecular weight) facilitates primary and ternary adsorbed proteins/cells interactions, leading to an increase of cell adhesion. In addition, protein adsorption is also concentration dependent and, at high concentrations, the adsorption rate below and above LCST can become close [120]. Then, the graft density was shown to influence the brush structure. A high graft density can cause phase separation [121], and more generally the density will modulate the protein adsorption rate within the brushes, as for BSA [44]. Malham *et al.* showed that chain rearrangements over time could slightly increase inter-chain adhesion and related this to  $-NH$  and  $C=O$  hydrogen bonding [121]. It is obvious that inter-chain attractive interactions would play a role on protein inclusion.

Various cells adhere to heated PNIPAM surfaces and are released during cooling [122]. Typically, cell detachment is achieved at  $T=20^{\circ}C$  [118]. This property allows cells to be seeded and gently detached them, without a need of trypsin: it is used in the field of cell sheet engineering [123].

Mono or multilayer cell sheets are thus produced and used for tissue regeneration [2]. These biological layers demonstrate good integration in tissues. *In vivo* studies were performed to treat various diseases: cartilage degeneration [124], damaged corneal tissues [125] or cardiac tissues [126]. Interestingly, it appeared that after cell lift-off, a layer of ECM remains attached to the surface. Research has tried to determine the composition of this remnant protein layer [127] and it was shown that most of the fibronectin leaves the surface with the cells. Nonetheless, this remnant layer promotes new cell growth, showing its viability.

A lot of systems have already been developed using PNIPAM brush surfaces. PNIPAM brushes were successfully grafted through ATRP [69,128] and RAFT polymerization [90,93]. By introducing reactive groups through plasma treatments, PNIPAM can be grafted *via* "grafting to" amide binding [8] or surface initiated ATRP [81]. ATRP produced Si-PNIPAM brush hybrids which were shown to be efficient in the thermo-triggered adhesion/de-adhesion of fibroblast cells [128]. In this case the thicker the PNIPAM layer is, the more profitable the surface is for cell proliferation after 2 days. In all cases, no adhesion is observed for temperatures below LCST independently of the thickness (3 nm, 11 nm or 31 nm). It also appeared that the antifouling properties of the poly(ethylene glycol) monomethacrylate (PEGMA) in combination with PNIPAM increases the cell release abilities of PNIPAM. For bovine endothelial cells, a thickness of PNIPAM brush on tissue culture polystyrene

around 15 nm showed optimal adhesion/de-adhesion properties [129]. They also reported no adhesion above 30 nm, whereas Mizutani *et al.* observed that endothelial cell adhesion on polystyrene ATRP grafted PNIPAM surfaces is suppressed for thickness greater than 60 nm [109]. Moreover, the best adhesion was obtained for thinner PNIPAM layers (1.8 nm). Takahashi *et al.* developed surface-initiated RAFT polymerization brushes on glass coverslips and studied both graft density and molecular weight of PNIPAM on reversible bioadhesion [90]. The study showed that the amount of cells also increased on lowering the graft density. In addition, better bioadhesion is observed for shorter brushes but de-adhesion needs a thick enough layer. The explanation is related to the necessity to push cells from the surface, as the PNIPAM brushes become extended on reducing the temperature. This can be the general conclusion, if possible, of thickness considerations: a balance between the ability for cells to attach (thin brush layer) and detach (thick brush layer) as to be found. Consequently, a thick PNIPAM layer can be useful to produce protein resistant surfaces.

Zhao *et al.* studied the anti-fouling properties of PNIPAM grafted polyurethane surfaces against fibrinogen and human serum albumin (HAS) proteins at  $37^{\circ}C$  [131]. It appeared that the thermosensitivity of the hydrophilicity was not significant on low PNIPAM thickness, and that the protein adsorption strongly decreased as this thickness increased. This effect can be due to higher hydrophilicity of thicker layers. As a consequence, cells do not adhere to thick brushes and thus anti-adhesion surfaces can be produced by the use of PNIPAM. Yu *et al.* showed thickness dependent thermo-sensitivity of PNIPAM grafted Si (surface initiated ATRP) surfaces and managed to produce HSA repellent, even with thin PNIPAM layers ( $<15$  nm) [132]. The variation of contact angle and HSA adsorption between  $27$  and  $37^{\circ}C$  is not so notable at low PNIPAM thickness. However, greater temperature sensitivity was observed at higher graft thickness both on contact angle and HSA protein adsorption. More interestingly, at  $37^{\circ}C$  HSA adsorption is not linearly dependent with PNIPAM thickness and, as the thickness increases, a decrease of sensitivity follows. This observation was attributed to possible adsorption on the Si-initiator surface at low graft thickness. As contact angle showed hydrophobic surfaces (higher than traditional anti-fouling polymer), the authors deduced that the anti-fouling properties of low PNIPAM thickness were not due to the hydrophilicity of the PNIPAM surface, but to the interactions between PNIPAM and the substrate. Indeed, short PNIPAM brush end chains can also interact with the substrate and reduce the freedom of conformation changes, reducing the temperature effect [132]. This study also showed the importance of the protein size on adsorption. Indeed, the size of the protein molecule is of importance as the penetration will be dependent on steric hindrance phenomena. In addition, it can be noted that the three proteins studied, HSA, fibrinogen protein and lysozyme also have different charge characteristics. The smallest protein, the lysozymes, adsorbed whether or not the PNIPAM was in collapsed or extended regime. An explanation can be the ability of this small protein to pass through the PNIPAM brushes and then to interact with the substrate (primary adsorption). As the protein size increased, the proteins were no longer able to efficiently go through PNIPAM chains below the LCST (extended regime), but are able, above the LCST, to interact with the outermost region of PNIPAM when hydrophobic and maybe with the substrate (collapsed regime).

Comparing these two last results, it appears that in the case of polyurethane substrate the hydrophilicity tends to increase with the thickness, leading to a decrease of protein adsorption [131], whereas the Si substrate graft led to an increase of protein adsorption, as the hydrophobicity increased [132]. Thus, we see the importance of the substrate, and the resulting surface properties will depend on the ability of its substrate to allow primary binding and on the hydrophilicity/hydrophobicity balance of the resulting

surface. In fact, adsorption of HSA was of the same order of magnitude whatever the substrate, for thicker PNIPAM layers, the latter having also the same hydrophilicity.

Nanostructured or patterned surfaces were also investigated. Silicon nanowires were thus used as a substrate for SI-ATRP [133]. The addition of PNIPAM strongly reduced platelet activation and adhesion, both above and below the LCST. As expected, the nanostructuring of PNIPAM surfaces (*i.e.* the increase of surface area) involves an exacerbation of the hydrophilic/hydrophobic surface state. In fact, Chen *et al.* highlighted that these nanostructures, which present a high aspect ratio, tend to trap water. This entrapped water led to a reduction of the platelet protein/surface interactions, whatever the coil or globule state of PNIPAM brushes. These results open new fields of application as platelet activation and adhesion can lead to blood coagulation and thrombosis. More recently, silicon nanopillars were shown to be able to reversibly attach/detach to/from breast cancer cells, through specific and selective interactions [134]. Compared to flat Si-PNIPAM surfaces, the introduction of nanopillar architecture widened the overall potential contact surface but limited the available space for interactions between cells and surfaces when adhered. As a result, the 3D architecture of these surfaces enhanced cell capture, but diminished the tendency of cells to spread, making release easier. Nanopatterned PNIPAM surfaces were also used to trap, kill and deliver bacteria [135]. In this work, biocides were grafted between patterned SI-ATRP PNIPAM brushes. Additionally, nanopatterning is a potential solution to overcome thickness limitations: even thick brushes allows cells to attach, so the necessity to have thick enough brushes in order to detach cells can be more easily fulfilled [136]. Owing to the fact that thick PNIPAM brushes do not support cell attachment but become bioadhesive when nanopatterned, controlled spatialization of cell culture is possible [136].

In the field of body implants and surgical biomaterials, Chen *et al.* grafted (“grafting to”) PNIPAM-COOH onto chitosan through an amide bond resulting in a comb-like polymer structure (branched PNIPAM on a chitosan backbone) which forms a gel [137]. The surface functionalization was followed by a study of chondrocytes and meniscus cells bioadhesion. The thermosensitive behavior of PNIPAM (brush to mushroom thermo triggered conformation change) was shown to provoke a phase transition, liquid to solid-like hydrogel. The gelification would occur inside the body after injection. Fibronectin adsorption was observed by fluorescence using rhodamine labelled fibronectin. Polypropylene-g-chitosan-g-PNIPAM was performed through a “grafting to” process with a view to easily stripping off of the skin wound dressing [138]. Non-toxicity and temperature-responsiveness behavior were fulfilled.

While brushes do present some interesting properties, other non-brush systems have been used to develop the same kind of functionalities. Ignacio *et al.* made a wound dressing using UV grafted PNIPAM polyurethane membranes [139]. New subcutaneous connective tissue grew but no toxicity was observed. The detachment on mice skin wounds was triggered by the reduction of temperature below the LCST. We can also mention the easy removal of retinal implants achieved with PNIPAM surfaces [140]. In this study, bioadhesion, measured by a pull-off test, appeared one minute after passing through the LCST. The correlation between the cell culture behavior and thermo-sensitive tissue adhesion clearly indicates that bioadhesion on tissues is related to the ability of PNIPAM to adsorb proteins and thus catch cells.

## 5. Conclusion

Bioadhesion is a characteristic of interactions between materials and cells. This phenomenon is now better understood and gives rise to interesting fields in biomedical science such as cell sheet

engineering. Brush structures have been shown to be efficient for cell adhesion, and to offer the advantage of a well-controlled preparation process. The “grafting from” approach enables dense brush layers to be made without steric hindrance limitations and thus leads to homogeneous layers, especially for rough surfaces. Living polymerization provides a way to control the growth of these layers. Various techniques exist, such as Fe-catalyzed ARGET-ATRP or RAFT polymerizations. It is known that the grafting method can lead to different properties (*e.g.* cross-linking), and impact the surface interaction with cells. PNIPAM, as a thermo-sensitive polymer, is widely studied and is a promising polymer in the cell sheet generation area, but its applications can be wider, including, for example, implants. Thus, several parameters such as graft density, layer thickness and grafting method have to be studied, characterized and compared in terms of cytotoxicity and bioadhesion. As yet, no solutions have been found to thoroughly characterize and study brushes directly on polymer substrates, this challenge will have to be overcome in the future. This limitation puts a brake on the control of the surface state, which is a key point for the prospective work in bioadhesion and can allow the investigation of new insights in the bioadhesion field, both theoretically and in terms of applications. In some cases, (*i.e.* biomedical implants) antifouling surfaces are sought in order to limit the biological colonization or any immunological response. On the contrary, tissue engineering needs good integration, and thus bioadhesion, of cells within biomaterials. Strong efforts are needed to further investigate the effects of the physio-chemical parameters of surfaces: hydrophilicity, roughness, mechanical properties, patterns. The development of innovative biomaterials will be dependant of these advances.

## Acknowledgement

Authors would like to thank the French National Research Agency for its financial support (ANR-14-CE17-0002-01, FP-BioPrev project).

## References

- [1] B. Kasemo, Biological surface science, *Surf. Sci.* 500 (2002) 656–677, [http://dx.doi.org/10.1016/S0039-6028\(01\)01809-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0039-6028(01)01809-X).
- [2] J. Yang, M. Yamato, C. Kohno, A. Nishimoto, H. Sekine, F. Fukai, et al., Cell sheet engineering: recreating tissues without biodegradable scaffolds, *Biomaterials* 26 (2005) 6415–6422, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.04.061>.
- [3] M.A. Cooperstein, H.E. Canavan, Assessment of cytotoxicity of (N-isopropyl acrylamide) and poly(N-isopropyl acrylamide)-coated surfaces, *Biointerphases* 8 (2013) 19, <http://dx.doi.org/10.1186/1559-4106-8-19>.
- [4] A. Tourrette, N. De Geyter, D. Jocić, R. Morent, M.M.C.G. Warmoeskerken, C. Leys, Incorporation of poly(N-isopropylacrylamide)/chitosan microgel onto plasma functionalized cotton fibre surface, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Aspects* 352 (2009) 126–135, <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2009.10.014>.
- [5] H. Lim, Y. Lee, S. Han, Y. Kim, J. Song, J. Kim, Wettability of poly(styrene-co-acrylate) ionomers improved by oxygen-plasma source ion implantation, *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* 41 (2003) 1791–1797, <http://dx.doi.org/10.1002/polb.10536>.
- [6] L. Bacakova, E. Filova, M. Parizek, T. Ruml, V. Svorcik, Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants, *Biotechnol. Adv.* 29 (2011) 739–767, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.06.004>.
- [7] A.M.G. Borges, L.O. Benetoli, M. a. Licínio, V.C. Zoldan, M.C. Santos-Silva, J. Assreuy, et al., Polymer films with surfaces unmodified and modified by non-thermal plasma as new substrates for cell adhesion, *Mater. Sci. Eng. C* 33 (2013) 1315–1324, <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2012.12.031>.
- [8] A. Sdrobiş, G.E. Ioanid, T. Stevanovic, C. Vasile, Modification of cellulose/chitin mix fibers with N-isopropylacrylamide and poly(N-isopropylacrylamide) under cold plasma conditions, *Polym. Int.* 61 (2012) 1767–1777, <http://dx.doi.org/10.1002/pi.4268>.
- [9] Y.M. Lee, J.K. Shim, Preparation of pH/temperature responsive polymer membrane by plasma polymerization and its riboflavin permeation, *Polymer (Guildf)* 38 (1997) 1227–1232, [http://dx.doi.org/10.1016/S0032-3861\(96\)00548-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0032-3861(96)00548-4).
- [10] J.A. Reed, S.A. Love, A.E. Lucero, C.L. Haynes, H.E. Canavan, Effect of polymer deposition method on thermoresponsive polymer films and resulting

- cellular behavior, *Langmuir* 28 (2012) 2281–2287, <http://dx.doi.org/10.1021/la102606k>.
- [11] L. Moroni, M. Klein Gunnewiek, E.M. Benetti, Polymer brush coatings regulating cell behavior: passive interfaces turn into active, *Acta Biomater.* 10 (2014) 2367–2378, <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2014.02.048>.
- [12] A. Olivier, F. Meyer, J.-M. Raquez, P. Damman, P. Dubois, Surface-initiated controlled polymerization as a convenient method for designing functional polymer brushes: from self-assembled monolayers to patterned surfaces, *Prog. Polym. Sci.* 37 (2012) 157–181, <http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.002>.
- [13] G. Bao, S. Suresh, Cell and molecular mechanics of biological materials, *Nat. Mater.* 2 (2003) 715–725, <http://dx.doi.org/10.1038/nmat1001>.
- [14] M. Gao, M. Sotomayor, E. Villa, E.H. Lee, K. Schulten, Molecular mechanisms of cellular mechanics, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 8 (2006) 3692–3706, <http://dx.doi.org/10.1039/b606019f>.
- [15] W. Xu, H. Baribault, E.D. Adamson, Vinculin knockout results in heart and brain defects during embryonic development, *Development* 125 (1998) 327–337 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9486805>.
- [16] K. Anselme, L. Ploux, A. Ponche, Cell/material interfaces: influence of surface chemistry and surface topography on cell adhesion, *J. Adhes. Sci. Technol.* 24 (2010) 831–852, <http://dx.doi.org/10.1163/016942409X12598231568186>.
- [17] D.G. Castner, B.D. Ratner, Biomedical surface science: foundations to frontiers, *Surf. Sci.* 500 (2002) 28–60, [http://dx.doi.org/10.1016/S0039-6028\(01\)01587-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0039-6028(01)01587-4).
- [18] J.H. Lee, J.W. Lee, G. Khang, H.B. Lee, Interaction of cells on chargeable functional group gradient surfaces, *Biomaterials* 18 (1997) 351–358, [http://dx.doi.org/10.1016/S0142-9612\(96\)00128-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0142-9612(96)00128-7).
- [19] A. Tamura, M. Oishi, Y. Nagasaki, Efficient siRNA delivery based on PEGylated and partially quaternized polyamine nanogels: enhanced gene silencing activity by the cooperative effect of tertiary and quaternary amino groups in the core, *J. Control. Release.* 146 (2010) 378–387, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.05.031>.
- [20] A. Tamura, M. Nishi, J. Kobayashi, K. Nagase, H. Yajima, M. Yamato, et al., Simultaneous enhancement of cell proliferation and thermally induced harvest efficiency based on temperature-responsive cationic copolymer-grafted microcarriers, *Biomacromolecules* 13 (2012) 1765–1773, <http://dx.doi.org/10.1021/bm300256e>.
- [21] D. Fischer, Y. Li, B. Ahlemeyer, J. Krieglstein, T. Kissel, In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis, *Biomaterials* 24 (2003) 1121–1131, [http://dx.doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00445-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00445-3).
- [22] H. Lodish, A. Berk, C.A. Kaiser, M. Krieger, A. Bretscher, H. Ploegh, et al., *L'intégration cellulaire dans des tissus*, in: De Boeck (Ed.), *Biol. Moléculaire La Cell*, 4e ed., 2014, pp. 925–975.
- [23] J. Pei, H. Hall, N.D. Spencer, The role of plasma proteins in cell adhesion to PEG surface-density-gradient-modified titanium oxide, *Biomaterials* 32 (2011) 8968–8978, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.08.034>.
- [24] J. Andersson, K.N. Ekdahl, J.D. Lambris, B. Nilsson, Binding of C3 fragments on top of adsorbed plasma proteins during complement activation on a model biomaterial surface, *Biomaterials* 26 (2005) 1477–1485, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.05.011>.
- [25] K.N. Ekdahl, J.D. Lambris, H. Elwing, D. Ricklin, P.H. Nilsson, Y. Teramura, et al., Innate immunity activation on biomaterial surfaces: a mechanistic model and coping strategies, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63 (2011) 1042–1050, <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2011.06.012>.
- [26] E.A. Vogler, Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces, *Adv. Colloid Interface Sci.* 74 (1998) 69–117, [http://dx.doi.org/10.1016/S0001-8686\(97\)00040-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0001-8686(97)00040-7).
- [27] A.J. Pertsin, M. Grunze, Computer simulation of water near the surface of oligo(ethylene glycol)-terminated alkanethiol self-assembled monolayers, *Langmuir* 16 (2000) 8829–8841, <http://dx.doi.org/10.1021/la000340y>.
- [28] Z. Ma, Z. Mao, C. Gao, Surface modification and property analysis of biomedical polymers used for tissue engineering, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 60 (2007) 137–157, <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2007.06.019>.
- [29] T. Suzuki, Y. Mizushima, Characteristics of silica-chitosan complex membrane and their relationships to the characteristics of growth and adhesiveness of L-929 cells cultured on the biomembrane, *J. Ferment. Bioeng.* 84 (1997) 128–132, [http://dx.doi.org/10.1016/S0922-338X\(97\)82541-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0922-338X(97)82541-X).
- [30] C.D. Tidwell, D.G. Castner, S.L. Golledge, B.D. Ratner, K. Meyer, B. Hagenhoff, et al., Static time-of-flight secondary ion mass spectrometry and x-ray photoelectron spectroscopy characterization of adsorbed albumin and fibronectin films, *Surf. Interface Anal.* 31 (2001) 724–733, <http://dx.doi.org/10.1002/sia.1101>.
- [31] B.G. Keselowsky, D.M. Collard, A.J. García, Surface chemistry modulates fibronectin conformation and directs integrin binding and specificity to control cell adhesion, *J. Biomed. Mater. Res. A* 66 (2003) 247–259, <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.a.10537>.
- [32] M. Cockerill, M.K. Rigozzi, E.M. Terentjev, Mechanosensitivity of the IInd kind: tGfB mechanism of cell sensing the substrate stiffness, *PLoS One* (2015) 1–11, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0139959>.
- [33] D.E. Discher, P. Janmey, Y. Wang, Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate, *Science* 310 (2005) 1139–1143, <http://dx.doi.org/10.1126/science.1116995>.
- [34] Q.S. Li, G.Y.H. Lee, C.N. Ong, C.T. Lim, AFM indentation study of breast cancer cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 374 (2008) 609–613, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.07.078>.
- [35] M.S. Yousafzai, F. Ndoye, G. Coceano, J. Niemela, S. Bonin, G. Scoles, et al., Substrate-dependent cell elasticity measured by optical tweezers indentation, *Opt. Lasers Eng.* 76 (2016) 27–33, <http://dx.doi.org/10.1016/j.optlaseng.2015.02.008>.
- [36] M.G. Haugh, C.M. Murphy, R.C. McKiernan, C. Altenbuchner, F.J. O'Brien, Crosslinking and mechanical properties significantly influence cell attachment, proliferation, and migration within collagen glycosaminoglycan scaffolds, *Tissue Eng. Part A* 17 (2011) 1201–1208, <http://dx.doi.org/10.1089/ten.TEA.2010.0590>.
- [37] C.M. Lo, H.B. Wang, M. Dembo, Y.L. Wang, Cell movement is guided by the rigidity of the substrate, *Biophys. J.* 79 (2000) 144–152, [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76279-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76279-5).
- [38] S. Kidoaki, T. Matsuda, Microelastic gradient gelatinous gels to induce cellular mechanotaxis, *J. Biotechnol.* 133 (2008) 225–230, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.08.015>.
- [39] H.-W. Liu, C.-P. Lin, Y.-J. Liou, K.-W. Hsu, J.-Y. Yang, C.-H. Lin, NBT-II cell locomotion is modulated by restricting the size of focal contacts and is improved through EGF and ROCK signaling, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 51 (2014) 131–141, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2014.04.009>.
- [40] F.G.M. Russel, J.M. Bindels, C.H. Van, Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (1997) 13661–13665, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.95.20.13661>.
- [41] L. Bacakova, E. Filova, D. Kubies, L. Machova, V. Proks, V. Malinova, et al., Adhesion and growth of vascular smooth muscle cells in cultures on bioactive RGD peptide-carrying polyactides, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 18 (2007) 1317–1323, <http://dx.doi.org/10.1007/s10856-006-0074-1>.
- [42] Y. Zhu, C. Gao, X. Liu, T. He, J. Shen, Immobilization of biomacromolecules onto aminolyzed poly(L-lactic acid) toward acceleration of endothelium regeneration, *Tissue Eng.* 10 (2004) 53–61, <http://dx.doi.org/10.1089/107632704322791691>.
- [43] R.D. Abbott, D.L. Kaplan, Strategies for improving the physiological relevance of human engineered tissues, *Trends Biotechnol.* 33 (2015) 401–407, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.04.003>.
- [44] C. Xue, B.-C. Choi, S. Choi, P.V. Braun, D.E. Leckband, Protein adsorption modes determine reversible cell attachment on poly(N-isopropyl acrylamide) brushes, *Adv. Funct. Mater.* 22 (2012) 2394–2401, <http://dx.doi.org/10.1002/adfm.201103056>.
- [45] M.A.C. Stuart, W.T.S. Huck, J. Genzer, M. Müller, C. Ober, M. Stamm, et al., Emerging applications of stimuli-responsive polymer materials, *Nat. Mater.* 9 (2010) 101–113, <http://dx.doi.org/10.1038/nmat2614>.
- [46] J. Ran, L. Wu, Z. Zhang, T. Xu, Atom transfer radical polymerization (ATRP): A versatile and forceful tool for functional membranes, *Prog. Polym. Sci.* 39 (2014) 124–144, <http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.09.001>.
- [47] S. Edmondson, V.L. Osborne, W.T.S. Huck, Polymer brushes via surface-initiated polymerizations, *Chem. Soc. Rev.* 33 (2004) 14–22, <http://dx.doi.org/10.1039/b210143m>.
- [48] J. Draper, I. Luzinov, S. Minko, I. Tokarev, M. Stamm, Mixed polymer brushes by sequential polymer addition: anchoring layer effect, *Langmuir* 20 (2004) 4064–4075, <http://dx.doi.org/10.1021/la0361316>.
- [49] B. Zdyrko, I. Luzinov, Polymer brushes by the grafting to method, *Macromol. Rapid Commun.* 32 (2011) 859–869, <http://dx.doi.org/10.1002/marc.201100162>.
- [50] K.S. Iyer, B. Zdyrko, H. Malz, J. Pionteck, I. Luzinov, Polystyrene layers grafted to macromolecular anchoring layer, *Macromolecules* 36 (2003) 6519–6526, <http://dx.doi.org/10.1021/ma034460z>.
- [51] M. Husseman, E.E. Malmström, M. McNamara, M. Mate, D. Mecerreyes, D.G. Benoit, et al., Controlled synthesis of polymer brushes by living free radical polymerization techniques, *Macromolecules* 32 (1999) 1424–1431, <http://dx.doi.org/10.1021/ma981290v>.
- [52] N. Ayres, C.D. Cyrus, W.J. Brittain, Stimuli-responsive surfaces using polyampholyte polymer brushes prepared via atom transfer radical polymerization, *Langmuir* 23 (2007) 3744–3749, <http://dx.doi.org/10.1021/la062417+>.
- [53] U. Mansfeld, C. Pietsch, R. Hoogenboom, C.R. Becer, U.S. Schubert, Clickable initiators, monomers and polymers in controlled radical polymerizations – a prospective combination in polymer science, *Polym. Chem.* 1 (2010) 1560, <http://dx.doi.org/10.1039/c0py00168f>.
- [54] P. Liu, Modification of polymeric materials via surface-initiated Controlled/Living radical polymerization, *E Polymers* 7 (2007) 1–3, <http://dx.doi.org/10.1515/epoly.2007.7.1.725>.
- [55] P. Król, P. Chmielarz, Recent advances in ATRP methods in relation to the synthesis of copolymer coating materials, *Prog. Org. Coat.* 77 (2014) 913–948, <http://dx.doi.org/10.1016/j.porgcoat.2014.01.027>.
- [56] C.-Y. Hsiao, H.-A. Han, G.-H. Lee, C.-H. Peng, AGET and SARA ATRP of styrene and methyl methacrylate mediated by pyridyl-imine based copper complexes, *Eur. Polym. J.* 51 (2014) 12–20, <http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2013.11.013>.
- [57] N. Singh, X. Cui, T. Boland, S.M. Husson, The role of independently variable grafting density and layer thickness of polymer nanolayers on peptide adsorption and cell adhesion, *Biomaterials* 28 (2007) 763–771, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.09.036>.
- [58] W. Feng, J. Brash, S. Zhu, Non-biofouling materials prepared by atom transfer radical polymerization grafting of 2-methacryloxyethyl

- phosphorylcholine: separate effects of graft density and chain length on protein repulsion, *Biomaterials* 27 (2006) 847–855, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.07.006>.
- [59] J. Pyun, T. Kowalewski, K. Matyjaszewski, Synthesis of polymer brushes using atom transfer radical polymerization, *Macromol. Rapid Commun.* 24 (2003) 1043–1059, <http://dx.doi.org/10.1002/marc.200300078>.
- [60] J. Qin, Z. Cheng, L. Zhang, Z. Zhang, J. Zhu, X. Zhu, A highly efficient iron-mediated AGET ATRP of methyl methacrylate using Fe(0) powder as the reducing agent, *Macromol. Chem. Phys.* 212 (2011) 999–1006, <http://dx.doi.org/10.1002/macp.201000737>.
- [61] R. Gong, S. Maclaughlin, S. Zhu, Surface modification of active metals through atom transfer radical polymerization grafting of acrylics, *Appl. Surf. Sci.* 254 (2008) 6802–6809, <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2008.04.101>.
- [62] C. Hou, R. Qu, C. Sun, C. Ji, C. Wang, L. Ying, et al., Novel ionic liquids as reaction medium for ATRP of acrylonitrile in the absence of any ligand, *Polymer (Guildf)* 49 (2008) 3424–3427, <http://dx.doi.org/10.1016/j.polymer.2008.06.013>.
- [63] Y. Wang, Y. Zhang, B. Parker, K. Matyjaszewski, ATRP of MMA with ppm levels of iron catalyst, *Macromolecules* 44 (2011) 4022–4025, <http://dx.doi.org/10.1021/ma200771r>.
- [64] J. Cao, L. Zhang, X. Jiang, C. Tian, X. Zhao, Q. Ke, et al., Facile iron-mediated dispersant-free suspension polymerization of methyl methacrylate via reverse ATRP in water, *Macromol. Rapid Commun.* 34 (2013) 1747–1754, <http://dx.doi.org/10.1002/marc.201300513>.
- [65] L. Zhang, Z. Cheng, Z. Zhang, D. Xu, X. Zhu, Fe(III)-catalyzed AGET ATRP of styrene using triphenyl phosphine as ligand, *Polym. Bull.* 64 (2009) 233–244, <http://dx.doi.org/10.1007/s00289-009-0139-7>.
- [66] C. Bolm, J. Legros, J. Le Pailh, L. Zani, Iron-catalyzed reactions in organic synthesis, *Chem. Rev.* 104 (2004) 6217–6254, <http://dx.doi.org/10.1021/cr040664h>.
- [67] R. Poli, L.E.N. Allan, M.P. Shaver, Iron-mediated reversible deactivation controlled radical polymerization, *Prog. Polym. Sci.* 39 (2014) 1827–1845, <http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2014.06.003>.
- [68] S.-I. Nakanishi, M. Kawamura, H. Kai, R.-H. Jin, Y. Sunada, H. Nagashima, Well-defined iron complexes as efficient catalysts for green atom-transfer radical polymerization of styrene, methyl methacrylate, and butyl acrylate with low catalyst loadings and catalyst recycling, *Chemistry* 20 (2014) 5802–5814, <http://dx.doi.org/10.1002/chem.201304593>.
- [69] M. Klein Gunnewiek, A. Di Luca, X. Sui, C.A. van Blitterswijk, L. Moroni, G.J. Vancso, Controlled surface initiated polymerization of N-isopropylacrylamide from polycaprolactone substrates for regulating cell attachment and detachment, *Isr. J. Chem.* 52 (2012) 339–346, <http://dx.doi.org/10.1002/ijch.201100118>.
- [70] J. Liu, W. He, L. Zhang, Z. Zhang, J. Zhu, L. Yuan, et al., Bifunctional nanoparticles with fluorescence and magnetism via surface-initiated AGET ATRP mediated by an iron catalyst, *Langmuir* 27 (2011) 12684–12692, <http://dx.doi.org/10.1021/la202749v>.
- [71] K. Matyjaszewski, W. Jakubowski, K. Min, W. Tang, J. Huang, W.A. Braunecker, et al., Diminishing catalyst concentration in atom transfer radical polymerization with reducing agents, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 15309–15314, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0602675103>.
- [72] W. Jakubowski, K. Matyjaszewski, Activator generated by electron transfer for atom transfer radical polymerization, *Macromolecules* 38 (2005) 4139–4146, <http://dx.doi.org/10.1021/ma047389l>.
- [73] K. Min, H. Gao, K. Matyjaszewski, Use of ascorbic acid as reducing agent for synthesis of well-defined polymers by ARGET ATRP, *Macromolecules* 40 (2007) 1789–1791, <http://dx.doi.org/10.1021/ma070204l>.
- [74] B.V. Bhut, K. a. Conrad, S.M. Husson, Preparation of high-performance membrane adsorbers by surface-initiated AGET ATRP in the presence of dissolved oxygen and low catalyst concentration, *J. Membr. Sci.* 390–391 (2012) 43–47, <http://dx.doi.org/10.1016/j.memsci.2011.10.057>.
- [75] P. Shivapooja, L.K. Ista, H.E. Canavan, G.P. Lopez, ARGET-ATRP synthesis and characterization of PNIPAAm brushes for quantitative cell detachment studies, *Biointerphases* 7 (2012) 1–9, <http://dx.doi.org/10.1007/s13758-012-0032-z>.
- [76] Y. Zhang, Y. Wang, C. Peng, M. Zhong, W. Zhu, D. Konkolewicz, et al., Copper-Mediated CRP of methyl acrylate in the presence of metallic copper: effect of ligand structure on reaction kinetics, *Macromolecules* 45 (2012) 78–86, <http://dx.doi.org/10.1021/ma201963c>.
- [77] C.H. Worthley, K.T. Constantopoulos, M. Ginic-Markovic, R.J. Pillar, J.G. Matison, S. Clarke, Surface modification of commercial cellulose acetate membranes using surface-initiated polymerization of 2-hydroxyethyl methacrylate to improve membrane surface biofouling resistance, *J. Membr. Sci.* 385–386 (2011) 30–39, <http://dx.doi.org/10.1016/j.memsci.2011.09.017>.
- [78] X. Qiu, X. Ren, S. Hu, Fabrication of dual-responsive cellulose-based membrane via simplified surface-initiated ATRP, *Carbohydr. Polym.* 92 (2013) 1887–1895, <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.11.080>.
- [79] K. Pan, X. Zhang, R. Ren, B. Cao, Double stimuli-responsive membranes grafted with block copolymer by ATRP method, *J. Membr. Sci.* 356 (2010) 133–137, <http://dx.doi.org/10.1016/j.memsci.2010.03.044>.
- [80] C. Zhang, P.T. Vernier, Y.H. Wu, W. Yang, Surface chemical immobilization of polyene C with thermosensitive block copolymer brushes based on N-isopropylacrylamide and N-tert-butylacrylamide: synthesis, characterization, and cell adhesion/detachment, *J. Biomed. Mater. Res.—Part B Appl. Biomater.* 100 B (2012) 217–229, <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.b.31941>.
- [81] W. Zhen, C. Lu, Surface modification of thermoplastic poly(vinyl alcohol)/saponite nanocomposites via surface-initiated atom transfer radical polymerization enhanced by air dielectric discharges barrier plasma treatment, *Appl. Surf. Sci.* 258 (2012) 6969–6976, <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2012.03.145>.
- [82] J.-K. Chen, C.-Y. Hsieh, C.-F. Huang, P. Li, Characterization of patterned poly(methyl methacrylate) brushes under various structures upon solvent immersion, *J. Colloid Interface Sci.* 338 (2009) 428–434, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2009.06.040>.
- [83] Y. Liu, V. Klep, B. Zdyrko, I. Luzinov, Synthesis of high-density grafted polymer layers with thickness and grafting density gradients, *Langmuir* 21 (2005) 11806–11813, <http://dx.doi.org/10.1021/la051695q>.
- [84] S.J. Eichhorn, A. Dufresne, M. Aranguren, N.E. Marcovich, J.R. Capadona, S.J. Rowan, et al., Review: current international research into cellulose nanofibres and nanocomposites, *J. Mater. Sci.* 45 (2009) 1–33, <http://dx.doi.org/10.1007/s10853-009-3874-0>.
- [85] J. Lindqvist, E. Malmström, Surface modification of natural substrates by atom transfer radical polymerization, *J. Appl. Polym. Sci.* 100 (2006) 4155–4162, <http://dx.doi.org/10.1002/app.23457>.
- [86] C. Kang, R.M. Crockett, N.D. Spencer, Molecular-weight determination of polymer brushes generated by SI-ATRP on flat surfaces, *Macromolecules* 47 (2014) 269–275, <http://dx.doi.org/10.1021/ma401951w>.
- [87] M. Barsbay, O. Güven, A short review of radiation-induced raft-mediated graft copolymerization: a powerful combination for modifying the surface properties of polymers in a controlled manner, *Radiat. Phys. Chem.* 78 (2009) 1054–1059, <http://dx.doi.org/10.1016/j.radphyschem.2009.06.022>.
- [88] C. Barner-Kowollik, T.P. Davis, J.P.a. Heuts, M.H. Stenzel, P. Vana, M. Whittaker, RAFTing down under: tales of missing radicals, fancy architectures, and mysterious holes, *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* 41 (2003) 365–375, <http://dx.doi.org/10.1002/pola.10567>.
- [89] K. Kusolkamabot, P. Sae-ung, N. Niamnont, K. Wongravee, M. Sukwattanasinit, V.P. Hoven, Poly(N-isopropylacrylamide)-Stabilized gold nanoparticles in combination with tricationic branched phenylene-Ethynylene fluorophore for protein identification, *Langmuir* 29 (2013) 12317–12327, <http://dx.doi.org/10.1021/la402139g>.
- [90] H. Takahashi, M. Nakayama, M. Yamato, T. Okano, Controlled chain length and graft density of thermoresponsive polymer brushes for optimizing cell sheet harvest, *Biomacromolecules* 11 (2010) 1991–1999, <http://dx.doi.org/10.1021/bm100342e>.
- [91] J. Bigot, D. Fournier, J. Lyskawa, T. Marmin, F. Cazaux, G. Cooke, et al., Synthesis of thermoresponsive phenyl- and naphthyl-terminated poly(NIPAM) derivatives using RAFT and their complexation with cyclobis(paraquat-p-phenylene) derivatives in water, *Polym. Chem.* 1 (2010) 1024–1029, <http://dx.doi.org/10.1039/c0py00085j>.
- [92] Handbook of RAFT Polymerization, in: C. Barner-Kowollik (Ed.), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2008, <http://dx.doi.org/10.1002/9783527622757>.
- [93] F. Audouin, A. Heise, Surface-initiated RAFT polymerization of NIPAM from monolithic macroporous polyHIPE, *Eur. Polym. J.* 49 (2013) 1073–1079, <http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2013.01.013>.
- [94] H. Alem, A.-S. Duwez, P. Lussis, P. Lipnik, A.M. Jonas, S. Demoustier-Champagne, Microstructure and thermo-responsive behavior of poly(N-isopropylacrylamide) brushes grafted in nanopores of track-etched membranes, *J. Membr. Sci.* 308 (2008) 75–86, <http://dx.doi.org/10.1016/j.memsci.2007.09.036>.
- [95] I. Lokuge, X. Wang, P.W. Bohn, Temperature-Controlled flow switching in nanocapillary array membranes mediated by Poly(N-isopropylacrylamide) polymer brushes grafted by atom transfer radical polymerization †, *Langmuir* 23 (2007) 305–311, <http://dx.doi.org/10.1021/la060813m>.
- [96] L. Ren, S. Huang, C. Zhang, R. Wang, W.W. Tjui, T. Liu, Functionalization of graphene and grafting of temperature-responsive surfaces from graphene by ATRP on water, *J. Nanoparticle Res.* 14 (2012), <http://dx.doi.org/10.1007/s11051-012-0940-3>.
- [97] P. Zhuang, A. Dirani, K. Glinel, A.M. Jonas, Temperature dependence of the surface and volume hydrophilicity of hydrophilic polymer brushes, *Langmuir* 32 (2016) 3433–3444, <http://dx.doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b00448>.
- [98] W. Wu, J. Li, W. Zhu, Y. Jing, H. Dai, Thermo-responsive cellulose paper via ARGET ATRP, *Fibers Polym.* 17 (2016) 495–501, <http://dx.doi.org/10.1007/s12221-016-5877-1>.
- [99] L.L. Yang, J.M. Zhang, J.S. He, J. Zhang, Z.H. Gan, Synthesis and characterization of temperature-sensitive cellulose-graft-poly(N-isopropylacrylamide) copolymers, *Chin. J. Polym. Sci. (English Ed.)* 33 (2015) 1640–1649, <http://dx.doi.org/10.1007/s10118-015-1703-2>.
- [100] R.B. Vasani, S.J.P. McInnes, M.A. Cole, A.M.M. Jani, A.V. Ellis, N.H. Voelcker, Stimulus-responsiveness and drug release from porous silicon films ATRP-grafted with poly(N-isopropylacrylamide), *Langmuir* 27 (2011) 7843–7853, <http://dx.doi.org/10.1021/la200551g>.
- [101] P.-W. Chung, R. Kumar, M. Pruski, V.S.-Y. Lin, Temperature responsive solution partition of organic-Inorganic hybrid poly(N-isopropylacrylamide)-coated mesoporous silica nanospheres, *Adv. Funct. Mater.* 18 (2008) 1390–1398, <http://dx.doi.org/10.1002/adfm.200701116>.
- [102] A. Hufendiek, V. Trouillet, M.A.R. Meier, C. Barner-Kowollik, Temperature responsive cellulose-graft-copolymers via cellulose functionalization in an

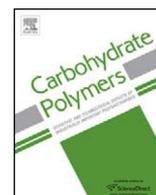
- ionic liquid and RAFT polymerization, *Biomacromolecules* 15 (2014) 2563–2572, <http://dx.doi.org/10.1021/bm500416m>.
- [103] X. Wang, H. Tu, P.V. Braun, P.W. Bohn, Length scale heterogeneity in lateral gradients of poly(N-isopropylacrylamide) polymer brushes prepared by surface-initiated atom transfer radical polymerization coupled with in-plane electrochemical potential gradients, *Langmuir* 22 (2006) 817–823, <http://dx.doi.org/10.1021/la052741p>.
- [104] X. Sui, S. Zapotoczny, E.M. Benetti, P. Schön, G.J. Vancso, Characterization and molecular engineering of surface-grafted polymer brushes across the length scales by atomic force microscopy, *J. Mater. Chem.* 20 (2010) 4981, <http://dx.doi.org/10.1039/b924392e>.
- [105] K.N. Plunkett, X. Zhu, J.S. Moore, D.E. Leckband, PNIPAM chain collapse depends on the molecular weight and grafting density, *Langmuir* 22 (2006) 4259–4266, <http://dx.doi.org/10.1021/la0531502>.
- [106] N. Brouette, C. Xue, M. Haertlein, M. Moulin, G. Fragneto, D.E. Leckband, et al., Protein adsorption properties of OEG monolayers and dense PNIPAM brushes probed by neutron reflectivity, *Eur. Phys. J. Spec. Top.* 213 (2012) 343–353, <http://dx.doi.org/10.1140/epjst/e2012-01681-4>.
- [107] R. Iwata, P. Suk-In, V.P. Hoven, A. Takahara, K. Akiyoshi, Y. Iwasaki, Control of nanobiointerfaces generated from well-defined biomimetic polymer brushes for protein and cell manipulations, *Biomacromolecules* 5 (2004) 2308–2314, <http://dx.doi.org/10.1021/bm049613k>.
- [108] M. Yasaka, X-ray thin-film measurement techniques, V. X-Ray reflectivity meas, *Rigaku J.* 26 (2010) 1–9, <http://dx.doi.org/10.1097/01.ss.0000026967.27546.82>.
- [109] A. Mizutani, A. Kikuchi, M. Yamato, H. Kanazawa, T. Okano, Preparation of thermoresponsive polymer brush surfaces and their interaction with cells, *Biomaterials* 29 (2008) 2073–2081, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.01.004>.
- [110] Y. Maeda, T. Nakamura, I. Ikeda, Changes in the hydration states of Poly(N-n-propylmethacrylamide) and Poly(N-isopropylmethacrylamide) during their phase transitions in water observed by FTIR spectroscopy, *Macromolecules* 34 (2001) 8246–8251, <http://dx.doi.org/10.1021/ma010222x>.
- [111] R. Umapathi, P.M. Reddy, A. Kumar, P. Venkatesu, C.-J. Chang, The biological stimuli for governing the phase transition temperature of the smart polymer PNIPAM in water, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 135 (2015) 588–595, <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.08.020>.
- [112] T. Qu, A. Wang, J. Yuan, J. Shi, Q. Gao, Preparation and characterization of thermo-responsive amphiphilic triblock copolymer and its self-assembled micelle for controlled drug release, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 72 (2009) 94–100, <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.03.020>.
- [113] L. Liu, Y. Shi, C. Liu, T. Wang, G. Liu, G. Zhang, Insight into the amplification by methylated urea of the anion specificity of macromolecules, *Soft Matter* 10 (2014) 2856–2862, <http://dx.doi.org/10.1039/c3sm52778f>.
- [114] A.C. Kumar, H.B. Bohidar, A.K. Mishra, The effect of sodium cholate aggregates on thermoreversible gelation of PNIPAM, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 70 (2009) 60–67, <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2008.12.004>.
- [115] D.M. Jones, J.R. Smith, W.T.S. Huck, C. Alexander, Variable adhesion of micropatterned thermoresponsive polymer brushes: AFM investigations of poly(N-isopropylacrylamide) brushes prepared by surface-initiated polymerizations, *Adv. Mater.* 14 (2002) 1130, [http://dx.doi.org/10.1002/1521-4095\(20020816\)14:16<1130::AID-ADMA1130>3.0.CO;2-7](http://dx.doi.org/10.1002/1521-4095(20020816)14:16<1130::AID-ADMA1130>3.0.CO;2-7).
- [116] E.C. Cho, Y.D. Kim, K. Cho, Thermally responsive poly(N-isopropylacrylamide) monolayer on gold: synthesis, surface characterization, and protein interaction/adsorption studies, *Polymer (Guildf)* 45 (2004) 3195–3204, <http://dx.doi.org/10.1016/j.polymer.2004.02.052>.
- [117] C. Xue, N. Yonet-Tanyeri, N. Brouette, M. Sferrazza, P.V. Braun, D.E. Leckband, Protein adsorption on poly(N-isopropylacrylamide) brushes: dependence on grafting density and chain collapse, *Langmuir* 27 (2011) 8810–8818, <http://dx.doi.org/10.1021/la2001909>.
- [118] A. Halperin, M. Kröger, Theoretical considerations on mechanisms of harvesting cells cultured on thermoresponsive polymer brushes, *Biomaterials* 33 (2012) 4975–4987, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.03.060>.
- [119] A. Halperin, Polymer brushes that resist adsorption of model proteins: design parameters, *Langmuir* 15 (1999) 2525–2533, <http://dx.doi.org/10.1021/la981356f>.
- [120] X. Cheng, H.E. Canavan, D.J. Graham, D.G. Castner, B.D. Ratner, Temperature dependent activity and structure of adsorbed proteins on plasma polymerized N-isopropyl acrylamide, *Biointerphases* 1 (2006) 61, <http://dx.doi.org/10.1116/1.2187980>.
- [121] I.B. Malham, L. Bureau, Density effects on collapse, compression, and adhesion of thermoresponsive polymer brushes, *Langmuir* 26 (2010) 4762–4768, <http://dx.doi.org/10.1021/la9035387>.
- [122] H.E. Canavan, X. Cheng, D.J. Graham, B.D. Ratner, D.G. Castner, Surface characterization of the extracellular matrix remaining after cell detachment from a thermoresponsive polymer, *Langmuir* 21 (2005) 1949–1955, <http://dx.doi.org/10.1021/la048546c>.
- [123] M.a. Cooperstein, H.E. Canavan, Biological cell detachment from poly(N-isopropyl acrylamide) and its applications, *Langmuir* 26 (2010) 7695–7707, <http://dx.doi.org/10.1021/la902587p>.
- [124] N. Kaneshiro, M. Sato, M. Ishihara, G. Mitani, H. Sakai, J. Mochida, Bioengineered chondrocyte sheets may be potentially useful for the treatment of partial thickness defects of articular cartilage, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 349 (2006) 723–731, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.08.096>.
- [125] T. Ide, K. Nishida, M. Yamato, T. Sumide, M. Utsumi, T. Nozaki, et al., Structural characterization of bioengineered human corneal endothelial cell sheets fabricated on temperature-responsive culture dishes, *Biomaterials* 27 (2006) 607–614, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.06.005>.
- [126] T. Shimizu, M. Yamato, Y. Isoi, T. Akutsu, T. Setomaru, K. Abe, et al., Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-Dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces, *Circ. Res.* 90 (2002) 40e–48e, <http://dx.doi.org/10.1161/hh0302.105722>.
- [127] H.E. Canavan, D.J. Graham, X. Cheng, B.D. Ratner, D.G. Castner, Comparison of native extracellular matrix with adsorbed protein films using secondary ion mass spectrometry, *Langmuir* 23 (2007) 50–56, <http://dx.doi.org/10.1021/la062330o>.
- [128] F.J. Xu, S.P. Zhong, L.Y.L. Yung, E.T. Kang, K.G. Neoh, Surface-active and stimuli-responsive polymer-Si(100) hybrids from surface-initiated atom transfer radical polymerization for control of cell adhesion, *Biomacromolecules* 5 (2004) 2392–2403, <http://dx.doi.org/10.1021/bm049675a>.
- [129] Y. Akiyama, A. Kikuchi, M. Yamato, T. Okano, Ultrathin Poly(N-isopropylacrylamide) grafted layer on polystyrene surfaces for cell adhesion/detachment control, *Langmuir* 20 (2004) 5506–5511, <http://dx.doi.org/10.1021/la036139f>.
- [131] T. Zhao, H. Chen, J. Zheng, Q. Yu, Z. Wu, L. Yuan, Inhibition of protein adsorption and cell adhesion on PNIPAAm-grafted polyurethane surface: effect of graft molecular weight, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 85 (2011) 26–31, <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.10.047>.
- [132] Q. Yu, Y. Zhang, H. Chen, Z. Wu, H. Huang, C. Cheng, Protein adsorption on poly(N-isopropylacrylamide)-modified silicon surfaces: effects of grafted layer thickness and protein size, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 76 (2010) 468–474, <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.12.006>.
- [133] L. Chen, M. Liu, H. Bai, P. Chen, F. Xia, D. Han, et al., Antiplaetlet and thermally responsive poly(N-isopropylacrylamide) surface with nanoscale topography, *J. Am. Chem. Soc.* 131 (2009) 10467–10472, <http://dx.doi.org/10.1021/ja9019935>.
- [134] H. Liu, X. Liu, J. Meng, P. Zhang, G. Yang, B. Su, et al., Hydrophobic interaction-mediated capture and release of cancer cells on thermoresponsive nanostructured surfaces, *Adv. Mater.* 25 (2013) 922–927, <http://dx.doi.org/10.1002/adma.201203826>.
- [135] Q. Yu, J. Cho, P. Shivapooja, L.K. Ista, G.P. López, Nanopatterned smart polymer surfaces for controlled attachment, killing, and release of bacteria, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 5 (2013) 9295–9304, <http://dx.doi.org/10.1021/am4022279>.
- [136] Q. Yu, L.M. Johnson, G.P. López, Nanopatterned polymer brushes for triggered detachment of anchorage-dependent cells, *Adv. Funct. Mater.* 24 (2014) 3751–3759, <http://dx.doi.org/10.1002/adfm.201304274>.
- [137] J.-P. Chen, T.-H. Cheng, Thermo-responsive chitosan-graft-poly(N-isopropylacrylamide) injectable hydrogel for cultivation of chondrocytes and meniscus cells, *Macromol. Biosci.* 6 (2006) 1026–1039, <http://dx.doi.org/10.1002/mabi.200600142>.
- [138] J.-P. Chen, C.-Y. Kuo, W.-L. Lee, Thermo-responsive wound dressings by grafting chitosan and poly(N-isopropylacrylamide) to plasma-induced graft polymerization modified non-woven fabrics, *Appl. Surf. Sci.* 262 (2012) 95–101, <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2012.02.106>.
- [139] C. Ignacio, L. Barcellos, M.D. Ferreira, S. a L. Moura, I. a Soares, R.L. Oréfice, In vivo tests of a novel wound dressing based on biomaterials with tissue adhesion controlled through external stimuli, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 22 (2011) 1357–1364, <http://dx.doi.org/10.1007/s10856-011-4299-2>.
- [140] M. Tunc, X. Cheng, B.D. Ratner, E. Meng, M. Humayun, Reversible thermosensitive glue for retinal implants, *Retina* 27 (2007) 938–942, <http://dx.doi.org/10.1097/IAE.0b013e318042ae81>.





Contents lists available at ScienceDirect

## Carbohydrate Polymers

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/carbpol](http://www.elsevier.com/locate/carbpol)

# Alginate/chitosan polyelectrolyte complexes: A comparative study of the influence of the drying step on physicochemical properties



G. Conzatti, D. Faucon, M. Castel, F. Ayadi, S. Cavalie, A. Tourrette\*

University of Toulouse, CIRIMAT, UMR UPS-INPT-CNRS 5085, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, 118 Route de Narbonne, 31062 Toulouse Cedex 4, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 26 January 2017

Received in revised form 24 April 2017

Accepted 6 May 2017

Available online 8 May 2017

## Keywords:

Alginate

Chitosan

Freeze drying

Supercritical CO<sub>2</sub> drying

Hot air drying

Physical-chemistry

## ABSTRACT

Polyelectrolyte complexes (PECs) based on Alginate and Chitosan were prepared for biomedical application. These two biopolymers are valuable resources for biomedical applications. In the present work, three PECs materials were produced using three different drying techniques: hot air drying, lyophilization and supercritical CO<sub>2</sub> drying. The choice of the drying technique allowed producing different type of structures, with different porosity scale. In order to evaluate their potential as intra-abdominal wound dressings, swelling ability in various media, enzymatic resistance and drug release behavior of the resulting materials was studied. It was shown that the increase of the porosity improved the swelling ability, without altering the resistance of the materials, whereas drug release studies revealed that the majority of the drug was released within the first 24 h whatever the drying process.

© 2017 Published by Elsevier Ltd.

## 1. Introduction

Polysaccharides have been widely used in recent decades as potential biomaterials. They have received particular attention in various fields such as wound dressing or scaffolds. In particular, alginate and chitosan are interesting biopolymers as they are cheap and well tolerated by the immune system (Lee & Mooney, 2012; Sahoo & Nayak, 2011). Although their use in polyelectrolyte complex (PEC) is widely reported (Lawrie et al., 2007; Li, Xie, Lin, Xie, & Ma, 2009; Yan, Khor, & Lim, 2000), the drying step is critical to ensure the desired structure.

Alginate, extracted from brown algae and bacteria, is a biocompatible and biodegradable polymer. Alginate has a linear structure and is composed of two blocks of  $\alpha$ -L-guluronic (G) and  $\beta$ -D-mannuronic (M) acid residues (Aarstad, Tøndervik, Sletta, & Skjåk-Bræk, 2012; Augst, Kong, & Mooney, 2006; Lee & Mooney, 2012). The G/M ratio and the structural repartition of these two blocks have a real impact on the alginate characteristics, and as with most of the biopolymers, it is not obvious to speak about one kind of alginate (Aarstad et al., 2012; Lee & Mooney, 2012; Meng & Liu, 2013; Pongjanyakul & Khuathan, 2015). However, it is accepted that alginate presents good swelling abilities and it is already used as wound dressing (Momoh, Boateng, Richardson, Chowdhry, &

Mitchell, 2015; Rezvanian, Mohd Amin, & Ng, 2016) or support for cell culture (Andersen, Auk-Emblem, & Dornish, 2015; Cuadros, Erices, & Aguilera, 2015). Alginate is a polyanion that can be easily cross-linked with calcium alginate, or can interact with polycations to form PECs (REF).

Chitosan is a biocompatible polycation (Sahoo & Nayak, 2011). Chitosan is derived from the chitin and, as for alginate, several types of chitosans exist, with various physico-chemical properties depending on their acetylation degree (DA) and chain length (Bellich, Agostino, Semeraro, Gamini, & Cesàro, 2016). Nonetheless, chitosan is known to have interesting mechanical properties compared to alginate and can be used then to strengthen alginate structures. Chitosan is already used in many applications such as drug carrier (Garg, Rath, & Goyal, 2015; Li, Yang, Ouyang, Yang, & Chang, 2016) but also wound dressing (Anjum, Arora, Alam, & Gupta, 2016; Levi-Polyachenko, Jacob, Day, & Kuthirummal, 2016).

These two biopolymers were already used together in PECs (Lawrie et al., 2007; Li et al., 2009; Yan et al., 2000) elaboration and we have already reported the effect of alginate/chitosan as the mixing technique on physico-chemical properties (Castel et al., 2017). However, the drying method remains a sensitive step that can strongly involve changes in their structure and then their properties (Annabi et al., 2010). Three classic techniques are generally used to dry polymers: hot air drying, lyophilization (also called freeze drying) and supercritical CO<sub>2</sub> drying (SCC). The porosity but also the network shaping are parameters that can be controlled over the drying stage. It is known that in the case of tissue engi-

\* Corresponding author.

E-mail address: [audrey.tourrette@univ-tlse3.fr](mailto:audrey.tourrette@univ-tlse3.fr) (A. Tourrette).

neering, the 3D structure can be a key factor to control in order to obtain sufficient cell colonization and biological activity (Annabi et al., 2010). At the same time, the rigidity of the structure is determinant for an efficient cell culture (Haugh, Murphy, McKiernan, Altenbuchner, & O'Brien, 2011). Too soft structure can avoid any cell adhesion whereas too hard structure can lead to strongly attached cells with reduced motility (Kidoaki & Matsuda, 2008). For this purpose, the design of the developed matrix is a crucial step, and drying elaboration can afford desired properties.

In the literature, a lot of research's focus on the influence of the polymer ratio, the DA of chitosan, the M/G repartition of alginate or the technique of homogenization on alginate/chitosan PECs properties. To the best of our knowledge, only few studies report the effect of the drying process on alginate/chitosan blends and are centered on the supercritical drying (Bueno, Moraes, de Sousa, & Braga, 2016; Raman, Gurikov, & Smirnova, 2015). The comparison of the drying process on the PECs is thus not well reported. However, in the case of alginate (Ho et al., 2004; Quraishi et al., 2015) or chitosan (Kassem, ElMeshad, & Fares, 2014; Kim & Lee, 2011) pure films, the drying influence the structure of the resulting material. Hence, we think the drying process is a key point and propose a comparative study of simple processed PECs dried with either hot air, lyophilization or SCC drying. With the same early stages elaboration process, we expect variations of the biomaterial structure and properties by varying only the last step of manufacturing. In addition, alginate/chitosan PECs are generally evaluated as potential external wound dressing. One could however expect that the resulting PECs should offer interesting properties for intra-abdominal applications. In particular, pancreatic surgery may require dressings to avoid pancreatic juice excretion after partial pancreatectomies. In this purpose, the materials' obtained structures were observed by scanning electron microscopy and their physico-chemical properties were determined. Porosity, mechanical behavior and swelling properties as well as degradation were investigated and are reported here in order to evaluate their potential as gastro-intestinal wound dressings.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Sodium alginate medium viscosity, chitosan, calcium chloride, phosphate buffer saline (PBS) and acetic acid were purchased from Sigma-Aldrich and used as received. Eosine disodique was furnished by DistriBS, sodium dihydrogenophosphate by RectaPur, disodium hydrogenophosphate, sodium hydroxide, Tris(hydroxymethyl)aminomethane (TRIS) and Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloric salt (TRIS, HCl) by Fischer and pancreatin from porcine pancreas (PPP) by Acros organics. All experiments were performed in distilled water.

Polysaccharides were characterized as previously reported (Castel et al., 2017). The G/M units ratio of alginate was estimated by NMR (Vilén, Klinger, & Sandström, 2011) to M/G = 2.93. Its Mw was determined by viscosimetry with  $\alpha$  and  $\kappa$  parameters known as 1.13 and  $6.9 \times 10^{-4} \text{ ml g}^{-1}$  (Martinsen, Skjåk-Bræk, Smidsrød, Zanetti, & Paoletti, 1991), respectively, to be 96 kDa. The deacetylation degree (DD) of chitosan was estimated to be 81% by the Shigemasa method (Shigemasa, Matsuura, Sashiwa, & Saimoto, 1996) and its Mw ( $\alpha = 0.93$ ,  $\kappa = 1.81 \times 10^{-1} \text{ ml g}^{-1}$  (Kasaai, 2007)) equal to 1 200 kDa.

### 2.2. Elaboration of the polyelectrolyte complex

A solution containing 0.34% v/v acetic acid and 1.5% w/w of chitosan, and a solution of 1.5% w/w of sodium alginate were

prepared overnight using a mechanical stirrer, 500 rpm. The two solutions were then poured into a glass petri dish with a mass ratio of 63/37 alginate/chitosan and mixed using an Ultra-Turax mixer (11,000 rpm) for 10 min. The resulting PEC was then partially dried in an oven at 50 °C overnight. A treatment with a 1% w/v  $\text{CaCl}_2$  was then performed for 3 h. Afterwards, the gelified PECs were washed thoroughly with distilled water 3 times. Three drying methods were then used.

### 2.3. Hot air drying – xero

The freshly partially dried PECs were placed in an oven at 50 °C overnight, until the mass was constant. Plate semi-transparent films were obtained and are referenced as Xero.

### 2.4. Lyophilization – lyoph

Partially dried PECs were frozen in liquid nitrogen and left 2 days under reduced pressure ( $4.10^{-4}$  mbar) in a Heto CT 60e lyophilizer. White, expanded foams were obtained and are referenced as Lyoph.

### 2.5. Super critical $\text{CO}_2$ drying – SCC

In order to avoid gel shrinkage, water was gently replaced by ethanol by 10 min successive baths of 1 0%, 30%, 50%, 70% and 100% (v/v) EtOH/water mixtures and then two times in 100% absolute EtOH (Robitzer et al., 2011). The resulting algogels were then placed in a  $\text{CO}_2$  super critical dryer (Polarion 3100). The vat was filled with  $\text{CO}_2$ , the system purged 3 times and re-filled. When no EtOH was detected any more, the temperature was set to 45 °C and the pressure to 100 bar in order to reach supercritical conditions. The samples were left 20 min before depressurization. The resulting samples were white and quite soft and are referenced as SCC.

### 2.6. Characterizations

#### 2.6.1. SEM

Scanning electron microscopy (SEM) imaging was performed using a FEG-FEI Quanta 250, operating at 5 kV. Before observation, samples were recovered by 10 nm of platinum.

#### 2.6.2. Volumetric experiments

In order to determine the surface area, the Brunauer, Emmett et Teller (BET) method was performed using a Micrometrics Tristar II analyzer. Samples were degassed in situ at 353 K for one night prior to analysis. Adsorption-desorption isotherms of nitrogen were plotted at 77 K.

#### 2.6.3. Swelling

Swelling studies were done at RT in different solvents: H<sub>2</sub>O, PBS buffer (pH 7.4, [Na] = 137 mM) and TRIS buffers. TRIS buffers were prepared either by adjusting pH of a TRIS, HCl salt solution with NaOH, referred as "TRIS/NaOH buffer" (pH 7.4, [Na] = 7 mM) or by the TRIS base compound, referred as "TRIS" (pH 7.4). The percentage of swelling of mass (or volume) was calculated through the equation:

$$S_w = \frac{m_f - m_i}{m_i} \times 100(\%)$$

Where  $S_w$  is the swelling in terms of percentage,  $m_f$  is the final mass (or volume) of the sample and  $m_i$  its initial mass (or volume).

#### 2.6.4. Enzymatic environment evaluation

In order to study the behavior in an enzymatic medium, swelling and degradation studies were performed at 37 °C in a pancreatic simulated media containing  $3.5 \text{ g L}^{-1}$  of pancreatin from porcine

pancreas (PPP) in phosphate buffer ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  and  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) pH 8. Swelling measures were performed using the same protocol as described above. The enzymatic activity of PPP was evaluated following the Phadebas Amylase Kit test protocol. Briefly, PPP solutions were treated with Phadebas Amylase tablets at  $37^\circ\text{C}$  for 15 min and subsequently with a 0.5 M NaOH solution. The mixtures were then centrifuged (1500g). The supernatant was taken and centrifuged another time. The supernatant was then analysed through UV–vis spectroscopy using a SHIMADZU UV-1800 spectrometer (620 nm). At  $t=0$ , the enzymatic activity of an 8 mg/L solution was determined as 953 Units per litre (U/l). The activity was then calculated as  $80\% \pm 10$  after two days, compared to  $t=0$ , using the formula:

$$\text{Activity (U/l)} = 60 \times e^{-5.8908 + \sqrt{70.8436 + 13.9082 \times \ln(\text{Absorbance})}}$$

For the degradation studies, the media was thus replaced every two days in order to keep an efficient enzymatic activity and the experiment was continued for 14 days. A control sample was made with a xerogel placed in a buffer pH 8, without enzymes. The degradation was evaluated with the following formula:

$$D = \frac{m_f(V_f) - m_i(V_i)}{m_f(V_f)} \times 100(\%)$$

Where D is the degradation in term of percentage,  $m_f(V_f)$  is the final mass (volume) of the sample and  $m_i(V_i)$  its initial mass (volume).

#### 2.6.5. Drug release studies

Release kinetics studies were done in phosphate buffered saline (PBS) solution (pH 7.4). Samples ( $10 \times 10$  mm) were first placed in buffers containing 0.5 g/L of eosin for 12 h. After impregnation, the mass of each eosin/PBS solution was measured in order to determine the remaining volume (density was considered as equal to 1); the eosin concentration was evaluated by UV–vis spectroscopy using a SHIMADZU UV-1800 spectrometer (517 nm). The remaining eosin quantity was then compared to the initial eosin amount to get the mass of eosin incorporated in the PECs samples  $m_{\text{incorporated}}$ . After impregnation, samples were then placed directly in an eosin free PBS solution under gentle agitation and aliquots were taken at the desired time for 3 days. Volume was maintained constant by replacing aliquots by eosin free PBS solution. Each aliquot was analyzed through UV–vis spectroscopy (517 nm), and the cumulative released eosin mass was calculated via the formula  $m_{\text{released}} = \sum m_{\text{aliquot}}$ , where  $m_{\text{aliquot}}$  correspond to the mass of eosin removed within the aliquot. Percentages of release were determined as the ratio of  $m_{\text{released}} \times 100/m_{\text{incorporated}}$ .

Release curves were fitted with the Korsmeyer–Peppas model, owing to the equation  $m_{\text{released}}/m_{\text{incorporated}} = Kt^n$ , where K is a general descriptive constant, called release rate constant and n is the release exponent (Dash, Murthy, Nath, & Chowdhury, 2001; Korsmeyer, Gurny, Doelker, Buri, & Peppas, 1983). The fitting was performed using a power type equation with a confident interval of 95%.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Structural characterization

The three obtained materials were all made of alginate/chitosan blends. However, they presented various aspects (Fig. 1). Hot air samples (Xero) were semi-transparent whereas freeze drying (Lyoph) resulted in relatively thick foams. Supercritical dried samples (SCC) were macroscopically between Xero and Lyoph, that is to say thin and opaque. These observations let to expect different internal structures.

Fig. 2 shows the SEM pictures of Xero, Lyoph and SCC. Xero samples showed compact structure, with no external macroporosity. The liquid/air surface energy tends to collapse PECs polymer chains during the drying process and explains the formation of a compact xerogel. Nonetheless, collapsed planar sheets are present and led to the presumed oriented collapse of PEC network. This orientation can reasonably be explained by the “plane by plane” superficial water evaporation during the process. The use of other drying methods prevented the collapse of the polymer chains and the resulting materials showed macroporosities.

The lyophilization process implies the freezing of the water contained in the PEC. Despite the elimination of water, the freezing step is a key point during the lyophilization process. Various techniques are possible, but herein, the freezing step was performed by quench freezing type process, using liquid nitrogen (Kasper & Friess, 2011). In solution, this type of freezing induces a fast freezing rate, with the formation of small ice crystals followed by directional solidification. In our case, water is trapped within the PECs. The water crystals grow quickly while freezing, limiting polymer reorganization. Large water crystals are thus formed within the material and the following sublimation extracts the water which leaves place for relatively large cavities. The frozen state of the PECs prevents any structure collapsing as it rigidifies the structure and avoids any polymer solvation. As a result, networked sheets with interconnected pores were obtained, as already observed in the literature for alginate (Annabi et al., 2010; Cuadros et al., 2015) or chitosan (Annabi et al., 2010; Kassem et al., 2014) hydrogels. Additionally, a “surface skin” was formed at the bulk/air interface, due to water evaporation induced surface tension, as generally observed for this type of drying (Ho et al., 2004). Supercritical  $\text{CO}_2$  (SCC) drying is an alternative method to lyophilization and avoids the freezing of the samples. In counterpart, water has to be first replaced by ethanol to obtain an alcogel. As PECs/ethanol interactions are not favorable, a slight shrinkage was observed, and it may be that a slight morphology change occurred (Robitzer et al., 2011). Ethanol is miscible with  $\text{CO}_2$  and can then be replaced by successive  $\text{CO}_2$  baths in the supercritical chamber. After being brought below its critical point,  $\text{CO}_2$  was evacuated from the chamber. The advantage is that the supercritical state of  $\text{CO}_2$  eliminates liquid/air interface and thus no surface tension exists while drying (Cardea, Baldino, Marco, Pisanti, & Reverchon, 2013; Robitzer, David, Rochas, Di Renzo, & Quignard, 2008). No denaturation, e.g. collapsing, occurs during the process. The obtained structure was a 3D nanofibrillated structure, which should be close to hydrogel structure. These observations correlate bulk densities: 860, 40 and  $220 \text{ mg cm}^{-3}$  were obtained for Xero, Lyoph and SCC samples, respectively (Table 1). These densities can be linked to the collapsed or expanded states during the drying, and the lower densities obtained for Lyoph samples are explained by the fact that no bulk collapsing occurs during the whole process in addition to the hole formation during water freezing expansion.

The BET methods results are presented in Fig. 3. Due to its collapsed state, Xero showed no adsorption, which is consistent with a low surface area and thus no or poor porosity. This type of isotherm was already reported for polysaccharides (Robitzer et al., 2011). N2 sorption studies are not suitable for large pores, e.g. macroporosity. By the way, Lyoph and SCC were shown to have a type IV isotherm, characteristic of mesoporous materials (Fig. 3a and b). This kind of isotherm is explained by the formation of an adsorbed monolayer at low pressure, meaning that a slight adsorbed amount was detected, followed by multilayer formation so a strong increase in adsorption was observed. Also an H3 type hysteresis can be observed, describing slit-shaped pores (Leofanti, Padovan, Tozzola, & Venturelli, 1998; Rio, Aguilera-Alvarado, Cano-Aguilera, Martínez-Rosales, & Holmes, 2012). Higher adsorbed quantities were observed for SCC samples, and surface areas of 160 and  $220 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  for Lyoph and SCC samples, respectively, were then calculated (Table 1).



Fig. 1. The three different materials: (left) a hot air dried Xero, (middle) a freeze dried Lyoph, and (right) a supercritical dried sample SCC.

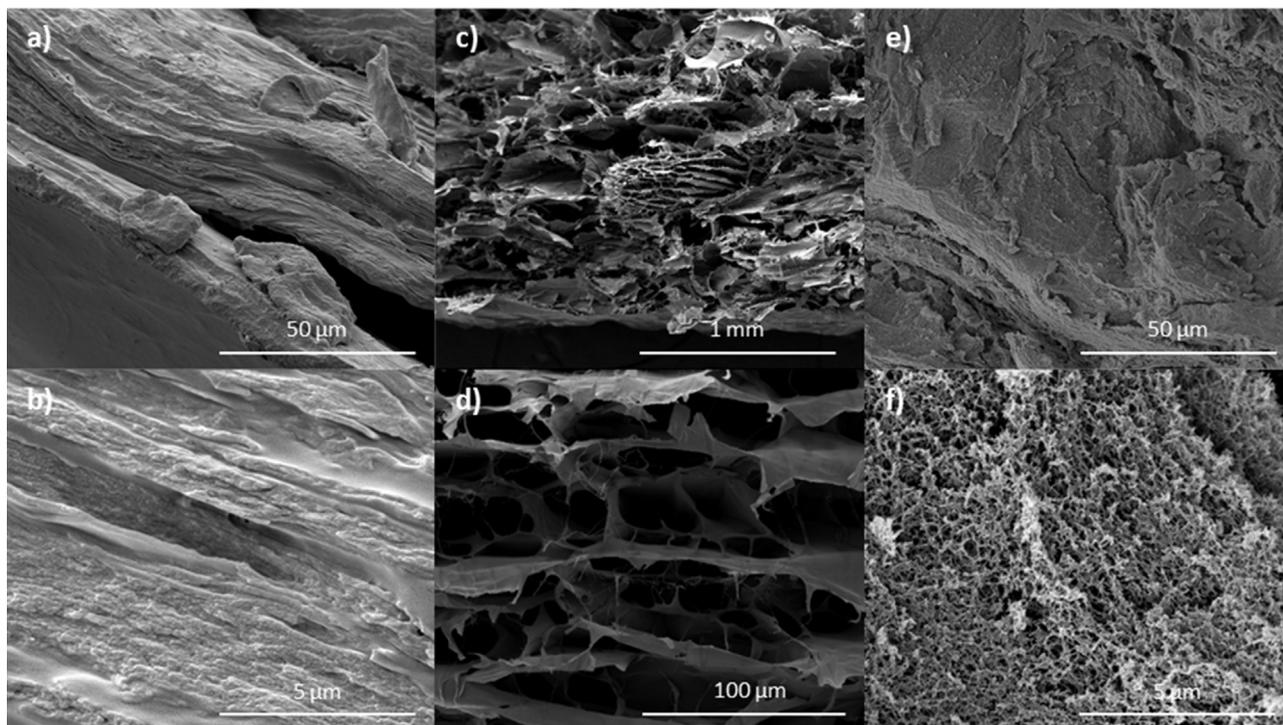


Fig. 2. SEM images of a) and b) xerogels, c) and d) lyophilized, and e) and f) SCC samples. Image magnifications are adapted to the different kind of structures and architecture scales obtained.

Table 1  
Structural properties of samples.

Sample type	Bulk density (mg/cm <sup>3</sup> )	Surface area (m <sup>2</sup> /g)	C-BET	Net molar energy of adsorption (kJ/mol)
Xero	821 ± 80	–	–	–
Lyoph	37 ± 2	160	160.8	3.3
SCC	175 ± 31	220	206.6	3.4

Cumulative pore volume indicated a large pore volume for SCC, around two times higher than Lyoph (Fig. 3c). This result can be surprising owing to the higher bulk density obtained for SCC, but the cumulative pore volume measured by the adsorption/desorption method does not take into account the large macroporosity of this material, leading to a wide undervaluation of this value. In this case, the measured value for Lyoph, which has a microsized structure, has to be carefully considered. However, the cumulative pore volume plot is revelatory of the higher mesoporosity of SCC. Pore size distribution confirmed that in addition to macropores observed through SEM, Lyoph and SCC samples presented mesoporosity (Fig. 3d). Indeed, both present pores starting from 10 nm

width up to 100 nm. The more numerous pores had width around 25 nm for both dried samples, but the mean pore sizes were about 28 and 35 nm for Lyoph and SCC, respectively. A narrower pore size distribution was thus observed for Lyoph compared to SCC. This can be consistent with the freeze drying process: the ice formation is a homogeneous process and leads to similar pores throughout the material.

In addition to the microscale shape observed by SEM, the BET measurements then showed that the overall mesopore volume and the pore size distribution can be directly tailored by the choice of the drying process.

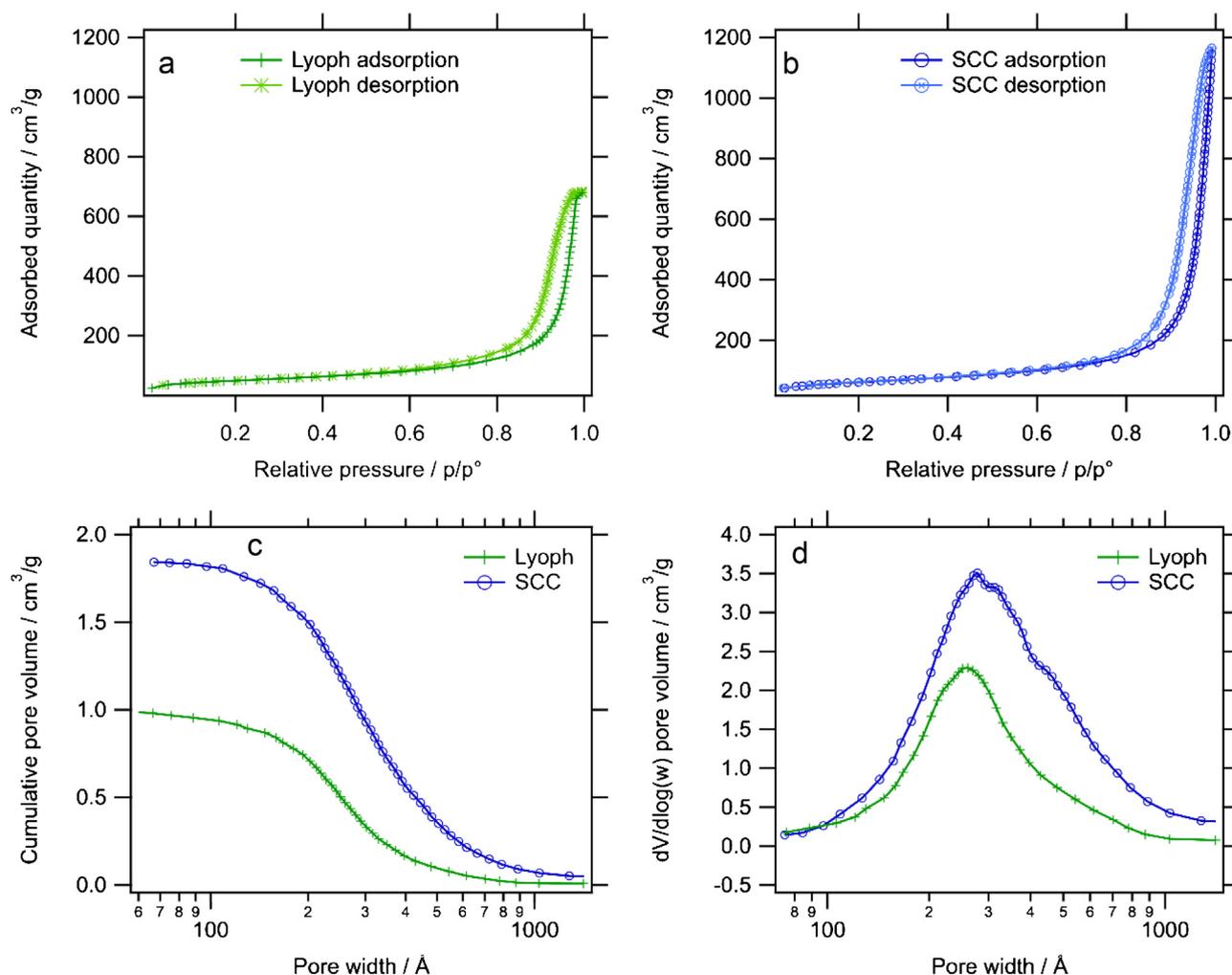


Fig. 3. Isotherms of adsorption and desorption of (a) Lyoph, and (b) SCC samples. (c) cumulative curves of pores volumes and (d)  $dV/d\log(w)$  curves.

Additionally, the net molar energy of adsorption, defined as  $\Delta E = E_{\text{ads}} - E_L$ , where  $E_{\text{ads}}$  is the adsorption energy and  $E_L$  the liquefaction energy ( $5.6 \text{ kJ mol}^{-1}$  pour  $\text{N}_2$ ), can be calculated through the equation  $\Delta E = RT \ln(C\text{-BET})$ , where C-BET is a BET constant reliable to the strength of the interaction between adsorbate ( $\text{N}_2$ ) and the surface (Robitzer et al., 2011; Trisunaryanti, 2009).  $\Delta E$  represents the difference of energy between surface/ $\text{N}_2$  interactions involved in the first adsorption layer formation, and the liquefaction energy involved in following layer adsorption, and is characteristic of the surface. It was found to be  $3.3 \text{ kJ mol}^{-1}$  for Lyoph (C-BET = 160.8) and  $3.4 \text{ kJ mol}^{-1}$  for SCC (C-BET = 206.6) (Table 1). It gives an estimation of the affinity between the gas and the solid, but has to be carefully considered while looking for mesoporous materials, as small pores tend to artificially increase this value. By the way, these values are in the range of polysaccharide values (Robitzer et al., 2011). These are relatively high, which is consistent with PECs surfaces. Indeed, as a PEC results from electrostatic interactions, it is a highly polar material. This high polarity favors a specific organization of quadrupolar  $\text{N}_2$  molecules as it adsorbs on the surface, and allows dense layers to form.

Finally, the similar net molar energy obtained for Lyoph and SCC indicates that interactions between alginate and chitosan within the PECs are not influenced by the drying process. Nonetheless, modification of the internal structures (not only meso- but especially macroporosities) are characteristics that are directly driven

by the drying step. In the following section, the influence of these variations will be discussed.

### 3.2. Swelling properties

The swelling properties were investigated in terms of mass and volume (Fig. 4). A previous study reported that swelling ability of alginate/chitosan PECs is related to the hydrophilic character of alginate (Castel et al., 2017). Herein, we clearly determined that an increase in the surface area leads to higher swelling abilities of the matrices. After 24 h, samples were considered full and by introducing porosity, swelling can be multiplied by more than 2 times in the case of the SCC, compared to the Xero. Lower swelling degree (1600%, in TRIS pH7.4) for dried alginate under supercritical  $\text{CO}_2$  (Quraishi et al., 2015) was reported. The Lyoph matrices showed intermediate absorption around 4 000%. Similar results were obtained with lyophilized cross-linked carboxymethyl chitin (Zhao, Wu, Chen, & Xing, 2015) (in phosphate buffer, pH 7.4). We can also mention that freeze dried chitosan sponge showed only 2 000% of absorption (in 2% agar water) (Kassem et al., 2014). All these results indicate an interesting water uptake ability of the present matrices, especially for the supercritical drying.

Additionally, volume variations showed that xerogels tend to widely increase their size while swelling (up to 2 300%). Indeed, the collapsed chains permit an extension of the structure. On the

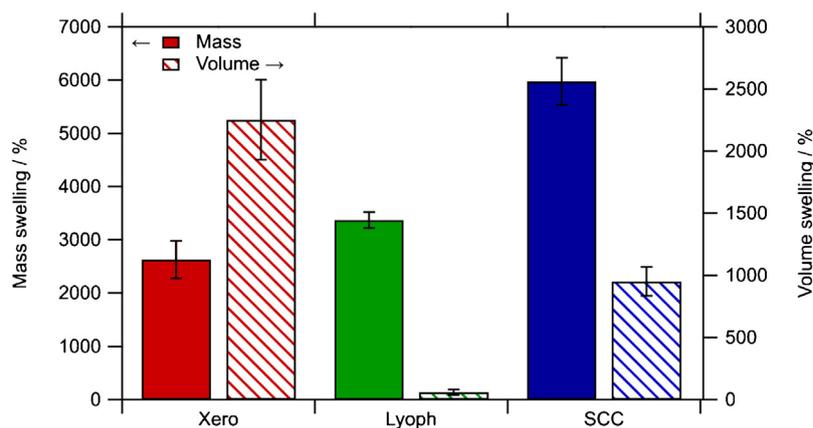


Fig. 4. Massic (left) and volumic (right) swelling percentages of Xero, Lyoph, and SCC in water, 24 h.

other hand, aerogels, and especially Lyoph, were not able to grow as their structures were already expanded.

However, owing to the electrostatic character of PECs, the surrounding media can be of critical importance in term of swelling abilities. The influences of three buffers were evaluated: PBS (pH 7.4), TRIS/NaOH (pH 7.4) and TRIS (pH 7.4). The presence of PBS (buffer pH 7.4) in the media tends to strongly reduce the absorption abilities of Xero and SCC materials whereas it has no significant effect on Lyoph samples (Fig. 5). A diminution was also observed for the TRIS/NaOH and TRIS buffer (same pH, 7.4). In opposition, distilled water is slightly acidic. One could assume this effect is pH driven: at pH 7.4 the amines of chitosan are partially deprotonated (pKa of 6.3 (Pillai, Paul, & Sharma, 2009)). This deprotonation is supported by ATR-FTIR measurements (Supporting information, Fig. S1).

Two hypotheses can then be drawn: i) the reduction of charge of the chitosan moieties results in less favorable hydrophilic interactions with water and ii) the deprotonation leads to the decomplexation of the PEC which can result in a partial solubilization of alginate. In both cases, the resulting effect on the swelling percentages is a diminution. Nonetheless, the lower swelling diminution in the case of TRIS/NaOH and, more importantly, TRIS buffer, in the case of SCC, leads to assumption of the influence of the nature of the buffer salt on the PEC. Especially, we assume the formation alginate excess cross-linking is destroyed while Na<sup>+</sup> replaced Ca<sup>2+</sup> ions, and the PECs structure tends to collapse and/or solubilize, as observed by ATR-FTIR (Supporting information, Fig. S1) and energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS, Supporting information Table S2). The presence of Na in the media could also facilitate the xerogels expansion while forming Na-alginate interactions and thus partially counterbalance the negative effect of the increase of the pH on the absorption ability of the material. Hence, for Xero, TRIS treatment exhibited the lower swelling percentage, as this solution contain only possible trace sodium content. The independence of Lyoph to its surrounding medium could be attributed to the relative large pores of Lyoph, responsible for the major part of the absorption of water. The water included in these large cavities is less affected by the state of the polymer. Even if the material is affected by the pH and/or the presence of phosphates, its overall macrostructure is kept intact.

### 3.3. Behavior in enzymatic media

Materials behavior was evaluated in pancreatin from porcine pancreas (PPP) in order to evaluate their potential interest as pancreas wound dressings. Indeed, it can arise that, after partial pancreatic resection; some pancreatic juice can leak through sur-

gical sutures. Absorption and resistance against these leakages are properties that a material should have in order to help pancreatic surgery. The solution was buffered with a sodium phosphate salt. PPP is an enzymes digestive cocktail produced by the exocrine cells of pancreas. It contains, among others, amylase, trypsin, lipase, ribonuclease and protease and is supposed to join the duodenum to help digestive functions. The enzymes activity depends on the temperature and the pH. Each enzyme has a pH dependent optimal pH, but an overall pH set to 8 allows efficient activity while reproducing the biological environment of this juice (Worthington Biochemical Corporation, 1972). The swelling over 24 h was measured (Fig. 6, right). The uptakes of the three materials significantly decreased compared to those obtained above in media without enzymes. The higher uptake was obtained for Lyoph samples (1300%), while SCC (1000%) and Xero (790%) remained low. The sodium contained in the buffer salt would explain this decrease, as the possible degradation due to enzymatic activity.

However, as potential wound dressings, materials have also to exhibit resistance to possible harsh conditions. Degradation studies were performed in the same enzymatic media for 14 days (Fig. 6, left). Despite the harsh conditions, the mass loss is not due to the enzymatic activity, as was shown by comparing samples with a control in water. It should be more related to partial solubilization of polysaccharides, especially alginate which is water soluble and affected by the presence of sodium in the buffer salt. Indeed, it was already shown that chitosan has a better resistance to this pancreatic medium than alginate which degraded by 6 days (Castel et al., 2017). By the way, the presence of enzymes seems to stabilize all of the three materials. In all cases, the degradation rates stayed under 35% after two weeks. Two weeks is generally the minimum time needed to achieve good healing. These degradation rates are low enough to ensure a good conservation of the wound dressing properties during the healing, but at the same time are not so low that a second operation would be needed to remove the wound dressing. However, we see that the SCC exhibits a lower degradation, indicating a higher resistance, probably due to its more highly interconnected nanometric structure which maintains a cohesive state.

### 3.4. Drug release

Drug release studies were performed in order to determine the ability of the 3 types of sample to incorporate and release eosin over time and to relate them to their structure. Results are shown in Fig. 7. In order not to modify the structure of PECs, the loaded eosine matrices were directly put in the release media without being dried.

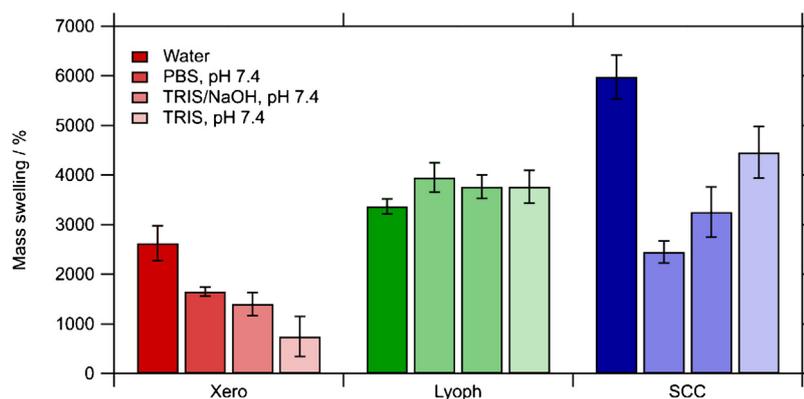


Fig. 5. Influence of the media on the swelling rate.

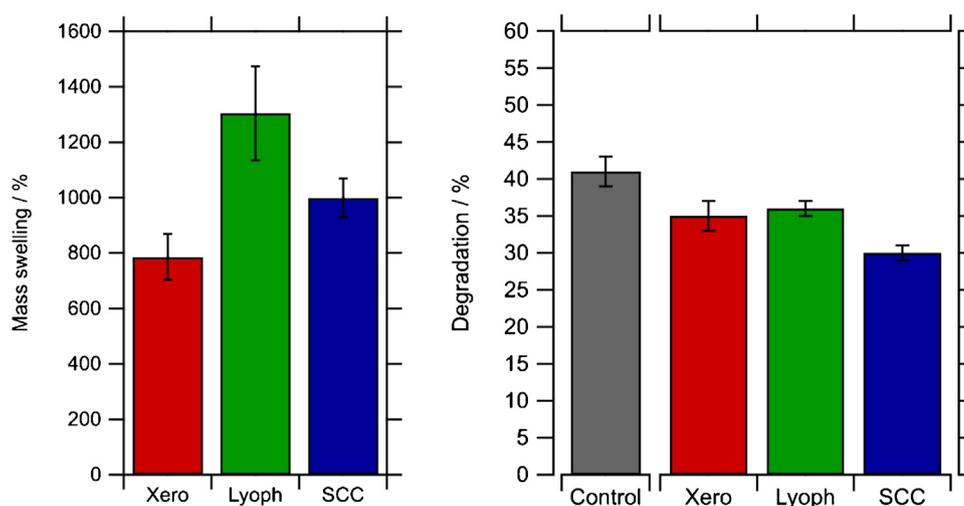


Fig. 6. (Right) swelling and (left) degradation percentages in pancreatic medium after 14 days in  $3.5 \text{ g L}^{-1}$  PPP in phosphate buffer ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  and  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) pH 8 at  $37^\circ\text{C}$ . Reference sample was a xerogel placed in a buffer pH 8, without enzymes.

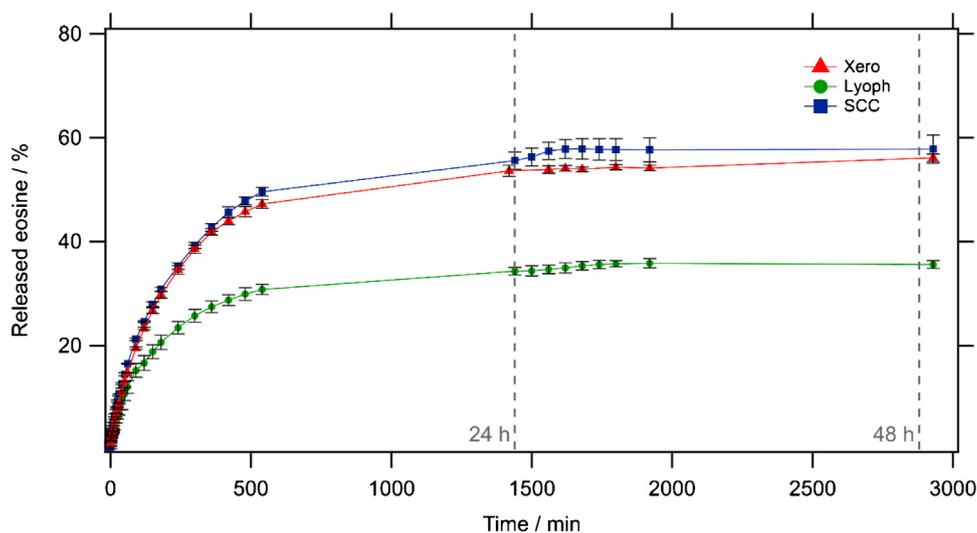


Fig. 7. Drug release kinetics of eosin in term of percentages of incorporated eosin.

After being immersed in an  $0.5 \text{ g L}^{-1}$  eosin bath for 12 h, the dropped eosin per gram of PEC was estimated by indirect assays to be of  $92 \pm 4 \text{ mg/g}$ ,  $102 \pm 10 \text{ mg/g}$  and  $80 \pm 11 \text{ mg/g}$  for Xero, Lyoph and SCC samples, respectively. One could expect that by increasing the surface area, the quantity of adsorbed hydrophilic eosin would

increase. This phenomenon was observed between Xero and Lyoph but SCC, which had a larger surface area, showed lower adsorption. The water uptake of SCC is decreased by the presence of PBS which explains this phenomenon, as already discussed. This effect could however be amplified by the modification of the material due to

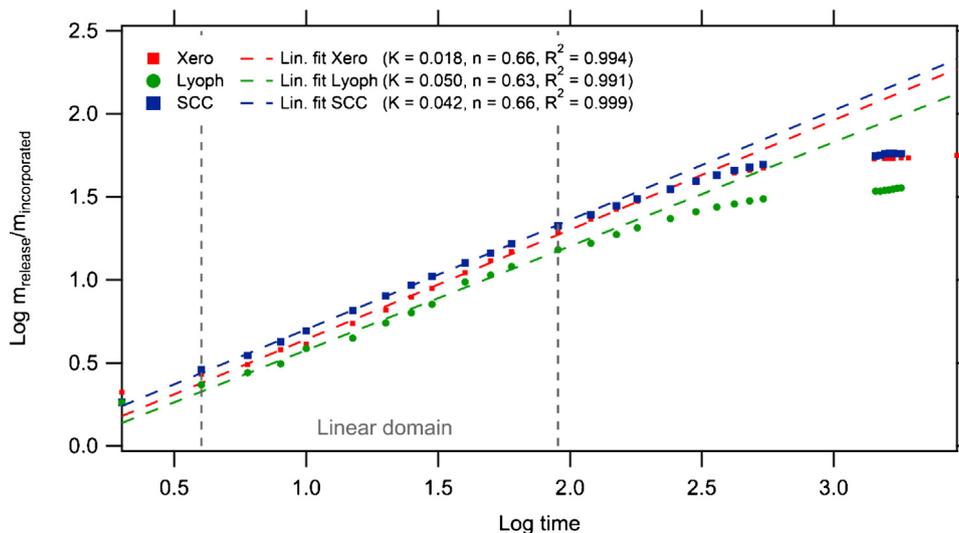


Fig. 8. Logarithm plots of release curves (solid lines) and linear fitting plots (dashed lines).

the process. Indeed, the passage via an alcogel needed to process SCC could lead, as EtOH is less polar than water and is a non-solvent for PECs, to the modification of the superficial conformation of the polymer chain and then to the reduction of its hydrophilicity. At the same time, Lyoph samples are quickly frozen so no conformation modification is possible and then hydrophilic moieties are still externally oriented. This would increase its affinity to eosin. This explanation is relativized by the similar neat molar energy of adsorption obtained for SCC and Lyoph samples. If this energy has to be carefully considered, the contribution of the macrostructure of Lyoph has to be added to the equation.

In all cases, the three samples seem to reach the maximum of cumulative release after one day (Fig. 7). The relative eosine liberation showed Lyoph exhibited low percentages of release compared to Xero and SCC. This observation is in agreement with the fact that Lyoph samples have much more affinity with eosin than SCC samples. However, not a huge difference was observed between Xero and SCC in terms of percentage of excretion. We would explain this by the fact that Xero has a much more compact structure and that eosin would be located at the outer region of xerogels. The following release would be faster than Lyoph, but still seem to be slightly lower than for SCC.

The diffusion through the sample volume should also be considered. All samples were taken with the same surface, but the Lyoph samples were much thicker. As a result, the distance from the sample core to the external medium is much more important for these samples. A reduction of the release quantity can then be obtained.

The release kinetic was fitted by the Korsmeyer-Peppas model for percentages of release inferior to 45% (30% for Lyoph), which correspond to the linear part of the log/log curves (Fig. 8, dashed lines) (Dash et al., 2001; Korsmeyer et al., 1983). This model is indicated for polymeric materials and gives the descriptive parameters  $K$ , the release rate constant, and  $n$ , the release exponent. The low deviation between the linear fit and experimental curves indicated that the release is mainly driven, at these low release percentages, by diffusion process. In polymeric porous materials, two diffusion processes can basically be kept in mind: diffusion of the drug through the water-filled pores and, as the polymers swell, diffusion through the swollen polymer is to be considered (Korsmeyer et al., 1983).  $K$  incorporates the overall solute diffusion and geometric characteristics of the system. In our case, matrices were already swollen when the release started.  $K$  parameter showed to be higher for Lyoph and SCC samples, which is consistent with the

higher surface area of these samples: the higher interfacial contact area between the polymers and the water led to a faster swollen polymers/pore filled water drug exchange, then a straightforward diffusion could be achieved and diffusion resistance was lowered. The higher  $K$  calculated for Lyoph samples can be attributed to the larger macropores of these structures which facilitate water diffusion. Parameter  $n$  gives information about the release mechanism. All types of samples gave  $n$  exponents between 0.60 and 0.70. These values are characteristic of a non-Fickian (also called anomalous) diffusion behavior (Costa & Sousa Lobo, 2001; Dash et al., 2001). This type of diffusion is relevant to a polymer-solvent-solute system, indicating that the already swollen polymer obstructs the eosine diffusion. Despite the steric barrier, this is also due to the carboxylate function of eosine, able to interact with chitosan's amines, thus the PECs materials do not act as inert support matrices: these PECs/eosines interactions limit the release and around 40% of the amount of antiseptic remains in the matrices after two days. After this period, a very low release rate seems to occur.

#### 4. Conclusion

In this work, we proposed the comparative study of three different drying techniques and their structural and physicochemical impact on alginate/chitosan PEC's as potential gastro-intestinal wound dressings.

The choice of drying process can highly affect the structure of a given polysaccharide material, and allow the tuning of its porosity and also its internal organization. More precisely, classic hot air drying led to a compact xerogel, whereas lyophilization and SCC drying gave rise to 3D architectures, with either a sheets network or a nanofibrillar structure, respectively.

If the structure varies strongly, its impact on the physicochemical was mainly observed on the swelling ability of the designed materials. Especially, by introducing a macro and micro porosity the swelling ability is strongly increased. However, the swelling is directly related to the external medium, and the higher porosity does not systematically imply the higher uptake. Indeed, the optimal material is dependent of the surrounding media. Additionally, we showed that evaluation in pancreatic juice simulated media significantly reduced the swelling ability. Evaluations of these materials should then be performed owing to the desired application in order to drive the choice of the drying process. In all cases, the increase of porosity does not involve a decrease in the

enzymatic resistance. In addition, the drying process could produce a change in the interactions between the matrix and the eventual drug molecule, which can modify its release ability. Incorporation of the eosin before the drying process would be an interesting perspective in order to obtain a swelling-controlled release system, possibly able to increase the release time, as the swelling of the polymer during the release is a factor that slows down the diffusion. All these observations showed an interesting potential for the three kind of materials as gastro-intestinal wound dressings and the choice of the drying process would not have to be neglected.

## Acknowledgement

Authors would like to thank the French National Research Agency for its financial support (ANR-14-CE17-0002-01, FP-BioPrev project).

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.05.023>.

## References

- Aarstad, O. A., Tøndervik, A., Sletta, H., & Skjåk-Bræk, G. (2012). Alginate sequencing: an analysis of block distribution in alginates using specific alginate degrading enzymes. *Biomacromolecules*, 13(1), 106–116. <http://doi.org/10.1021/bm2013026>
- Andersen, T., Auk-Emblem, P., & Dornish, M. (2015). 3D cell culture in alginate hydrogels. *Microarrays*, 4(2), 133–161. <http://doi.org/10.3390/microarrays4020133>
- 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(1–2), 92–101. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.05.013>
- Annabi, N., Nichol, J. W., Zhong, X., Ji, C., Koshy, S., Khademhosseini, A., & Dehghani, F. (2010). Controlling the porosity and microarchitecture of hydrogels for tissue engineering. *Tissue Engineering. Part B, Reviews*, 16(4), 371–383. <http://doi.org/10.1089/ten.TEB.2009.0639>
- Augst, A. D., Kong, H. J., & Mooney, D. J. (2006). Alginate hydrogels as biomaterials. *Macromolecular Bioscience*, 6(8), 623–633. <http://doi.org/10.1002/mabi.200600069>
- Bellich, B., Agostino, I. D., Semeraro, S., Gagini, A., & Cesàro, A. (2016). The Good, the Bad and the Ugly \* of Chitosans. <http://doi.org/10.3390/md14050099>.
- Bueno, C. Z., Moraes, A. M., de Sousa, H. C., & Braga, M. E. M. (2016). Effects of supercritical carbon dioxide processing on the properties of chitosan-alginate membranes. *The Journal of Supercritical Fluids*, 112, 128–135. <http://doi.org/10.1016/j.supflu.2015.10.001>
- Cardea, S., Baldino, L., Marco, I., De Pisanti, P., & Reverchon, E. (2013). Supercritical gel drying of polymeric hydrogels for tissue engineering applications. *Chemical Engineering Transactions*, 32, 1123–1128. <http://doi.org/10.3303/CET1332188>
- Castel, M., Conzatti, G., Torrisani, J., Rouilly, A., Cavalie, S., Carrere, N., & Tourrette, A. (2017). Influence of homogenization technique and blend ratio on chitosan/alginate polyelectrolyte complex properties. *Journal of Medical and Biological Engineering* (in press).
- Costa, P., & Sousa Lobo, J. M. (2001). Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(2), 123–133. [http://doi.org/10.1016/S0928-0987\(01\)00095-1](http://doi.org/10.1016/S0928-0987(01)00095-1)
- Cuadros, T. R., Elices, A. A., & Aguilera, J. M. (2015). Porous matrix of calcium alginate/gelatin with enhanced properties as scaffold for cell culture. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 46, 331–342. <http://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2014.08.026>
- Dash, S., Murthy, P. N., Nath, L., & Chowdhury, P. (2001). Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 67(3), 217–223. [http://doi.org/10.1016/S0928-0987\(01\)00095-1](http://doi.org/10.1016/S0928-0987(01)00095-1)
- Garg, T., Rath, G., & Goyal, A. K. (2015). Inhalable chitosan nanoparticles as antitubercular drug carriers for an effective treatment of tuberculosis. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 1401(July), 1–5. <http://doi.org/10.3109/21691401.2015.1008508>
- Haugh, M. G., Murphy, C. M., McKiernan, R. C., Altenbuchner, C., & O'Brien, F. J. (2011). Crosslinking and mechanical properties significantly influence cell attachment, proliferation, and migration within collagen glycosaminoglycan scaffolds. *Tissue Engineering Part A*, 17(9–10), 1201–1208. <http://doi.org/10.1089/ten.tea.2010.0590>
- Ho, M. H., Kuo, P. Y., Hsieh, H. J., Hsien, T. Y., Hou, L. T., Lai, J. Y., & Wang, D. M. (2004). Preparation of porous scaffolds by using freeze-extraction and freeze-gelation methods. *Biomaterials*, 25(1), 129–138. [http://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00483-6](http://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00483-6)
- Kasaai, M. R. (2007). Calculation of Mark-Houwink-Sakurada (MHS) equation viscometric constants for chitosan in any solvent-temperature system using experimental reported viscometric constants data. *Carbohydrate Polymers*, 68(3), 477–488. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.11.006>
- Kasper, J. C., & Friess, W. (2011). The freezing step in lyophilization: Physico-chemical fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality attributes of biopharmaceuticals. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 78(2), 248–263. <http://doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.03.010>
- Kassem, M. A. A., ElMeshad, A. N., & Fares, A. R. (2014). Lyophilized sustained release mucoadhesive chitosan sponges for buccal buspirone hydrochloride delivery: Formulation and In vitro evaluation. *AAPS PharmSciTech*, 16(3) <http://doi.org/10.1208/s12249-014-0243-3>
- Kidoaki, S., & Matsuda, T. (2008). Microelastic gradient gelatinous gels to induce cellular mechanotaxis. *Journal of Biotechnology*, 133(2), 225–230. <http://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.08.015>
- Kim, M. Y., & Lee, J. (2011). Chitosan fibrous 3D networks prepared by freeze drying. *Carbohydrate Polymers*, 84(4), 1329–1336. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.01.029>
- Korsmeyer, R. W., Gurny, R., Doelker, E., Buri, P., & Peppas, N. A. (1983). Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *International Journal of Pharmaceutics*, 15(1), 25–35. [http://doi.org/10.1016/0378-5173\(83\)90064-9](http://doi.org/10.1016/0378-5173(83)90064-9)
- Lawrie, G., Keen, I., Drew, B., Chandler-Temple, A., Rintoul, L., Fredericks, P., & Grøndahl, L. (2007). Interactions between alginate and chitosan biopolymers characterized using FTIR and XPS. *Biomacromolecules*, 8(8), 2533–2541. <http://doi.org/10.1021/bm070014y>
- Lee, K. Y., & Mooney, D. J. (2012). Alginate: properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 37(1), 106–126. <http://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003>
- Leofanti, G., Padovan, M., Tozzola, G., & Venturelli, B. (1998). Surface area and pore texture of catalysts. *Catalysis Today*, 41(1–3), 207–219. [http://doi.org/10.1016/S0920-5861\(98\)00050-9](http://doi.org/10.1016/S0920-5861(98)00050-9)
- Levi-Polyachenko, N., Jacob, R., Day, C., & Kuthirummal, N. (2016). Chitosan wound dressing with hexagonal silver nanoparticles for hyperthermia and enhanced delivery of small molecules. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 142, 315–324. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.02.038>
- Li, X., Xie, H., Lin, J., Xie, W., & Ma, X. (2009). Characterization and biodegradation of chitosan-alginate polyelectrolyte complexes. *Polymer Degradation and Stability*, 94(1), 1–6. <http://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2008.10.017>
- Li, X., Yang, Q., Ouyang, J., Yang, H., & Chang, S. (2016). Chitosan modified halloysite nanotubes as emerging porous microspheres for drug carrier. *Applied Clay Science*, 126, 306–312. <http://doi.org/10.1016/j.clay.2016.03.035>
- Martinsen, A., Skjåk-Bræk, G., Smidsrød, O., Zanetti, F., & Paoletti, S. (1991). Comparison of different methods for determination of molecular weight and molecular weight distribution of alginates. *Carbohydrate Polymers*, 15(2), 171–193. [http://doi.org/10.1016/0144-8617\(91\)90031-7](http://doi.org/10.1016/0144-8617(91)90031-7)
- Meng, S., & Liu, Y. (2013). Alginate block fractions and their effects on membrane fouling. *Water Research*, 47(17), 6618–6627. <http://doi.org/10.1016/j.watres.2013.08.037>
- Momoh, F. U., Boateng, J. S., Richardson, S. C. W., Chowdhry, B. Z., & Mitchell, J. C. (2015). Development functional characterization of alginate dressing as potential protein delivery system for wound healing. *International Journal of Biological Macromolecules*, 81, 137–150. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.07.037>
- Pillai, C. K. S., Paul, W., & Sharma, C. P. (2009). Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*, 34(7), 641–678. <http://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2009.04.001>
- Pongjanyakul, T., & Khuathan, N. (2015). Quaternary polymethacrylate-sodium alginate films: effect of alginate block structures and use for sustained release tablets. *Pharmaceutical Development and Technology*, 7450(July), 1–12. <http://dx.doi.org/10.3109/10837450.2015.1022787> <http://org/>
- Quraishi, S., Martins, M., Barros, A. A., Gurikov, P., Raman, S. P., Smirnova, I., & Reis, R. L. (2015). Novel non-cytotoxic alginate–lignin hybrid aerogels as scaffolds for tissue engineering. *The Journal of Supercritical Fluids*, <http://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.12.026>
- Raman, S. P., Gurikov, P., & Smirnova, I. (2015). Hybrid alginate based aerogels by carbon dioxide induced gelation: Novel technique for multiple applications. *Journal of Supercritical Fluids*, 106, 23–33. <http://doi.org/10.1016/j.supflu.2015.05.003>
- Rezvanian, M., Mohd Amin, M. C. I., & Ng, S. F. (2016). Development and physicochemical characterization of alginate composite film loaded with simvastatin as a potential wound dressing. *Carbohydrate Polymers*, 137, 295–304. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.10.091>
- Rio, D.A.D.H., Aguilera-alvarado, A.F., Cano-aguilera, I., Martínez-rosales, M., Holmes, S. (2012). Synthesis and Characterization of Mesoporous Aluminosilicates for Copper Removal from Aqueous Medium, 2012(July), 485–491. <http://doi.org/10.4236/msa.2012.37068>
- Robitzer, M., David, L., Rochas, C., Di Renzo, F., & Quignard, F. (2008). Supercritically-dried alginate aerogels retain the fibrillar structure of the hydrogels. *Macromolecular Symposia*, 273(1), 80–84. <http://doi.org/10.1002/masy.200851311>
- Robitzer, M., Tourrette, A., Horga, R., Valentin, R., Boissière, M., Devoisselle, J. M., & Quignard, F. (2011). Nitrogen sorption as a tool for the characterisation of polysaccharide aerogels. *Carbohydrate Polymers*, 85(1), 44–53. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.01.040>

- Sahoo, D., & Nayak, P. L. (2011). Chitosan: The most valuable derivative of chitin. *Biopolymers: Biomedical and Environmental Applications*, 129–166. <http://doi.org/10.1002/9781118164792.ch6>
- Shigemasa, Y., Matsuura, H., Sashiwa, H., & Saimoto, H. (1996). Evaluation of different absorbance ratios from infrared spectroscopy for analyzing the degree of deacetylation in chitin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 18(3), 237–242. [http://doi.org/10.1016/0141-8130\(95\)01079-3](http://doi.org/10.1016/0141-8130(95)01079-3)
- Trisunaryanti, W. (2009). Calculation of nitrogen adsorption enthalpy on various catalysts. *Journal of Materials Science and Engineering*, 3(8), 40–43.
- Vilén, E. M., Klinger, M., & Sandström, C. (2011). Application of diffusion-edited NMR spectroscopy for selective suppression of water signal in the determination of monomer composition in alginates. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 49(9), 584–591. <http://doi.org/10.1002/mrc.2789>
- Worthington Biochemical Corporation, W. D. (1972). In W. Diagnostics (Ed.), *Manual of clinical enzyme measurements*. Worthington Biochemical Corporation.
- Yan, X., Khor, E., & Lim, L.-Y. (2000). PEC films prepared from chitosan-alginate coacervates. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 48(7), 941–946. <http://doi.org/10.1248/cpb.48.941>
- Zhao, L., Wu, Y., Chen, S., & Xing, T. (2015). Preparation and characterization of cross-linked carboxymethyl chitin porous membrane scaffold for biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*, 126, 150–155. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.02.050>

---

# Glossaire

**antifouling** propriété d'un matériau à ne pas adsorber les protéines, à rester "propre".  
27, 38, 45, 46

**biocompatibilité** aptitude d'un matériau à remplir une fonction, sans causer de phénomènes parasites, ni par une réponse immunitaire de l'organisme, ni par sa toxicité ou celle de ses produits de dégradations. 16

**bulk** le bulk représente la partie massique d'un matériau, à contrario des ses propriétés de surface. 25, 95, 109

**cellules endothéliales** cellules recouvrant l'intérieur des vaisseaux sanguins. 28, 45

**cytosquelette** ensemble de structures composant le squelette cellulaire, composé de plusieurs polymères. Chez les eucaryotes (présence d'un noyau cellulaire), il est composé de filaments d'actines, de microtubules et de filaments dits intermédiaires. 24, 25, 29

**cytotoxique** substance toxique envers les cellules. 18

**"grafting from"** méthode de greffage conduisant à une structure en peigne, consistant en la polymérisation d'un monomère et sa croissance directement depuis une surface. 35, 36, 38, 41, 131

**"grafting to"** méthode de greffage conduisant à une structure en peigne, consistant en la synthèse d'un polymère puis à son accroche sur une surface via des sites fonctionnels réactifs. 35, 36, 41, 45, 131, 132

**immunogénicité** l'immunogénicité est la capacité qu'a un corps de provoquer une réponse immunitaire bien spécifique. 25

**indice de polydispersité** rend compte de la distribution de taille d'un polymère. Augmente avec la polydispersité, 1 étant le cas idéal théorique d'un polymère monodisperse. Se calcule à partir à partir du ratio entre la masse molaire moyenne en masse ( $M_w$ ) et la masse molaire moyenne en nombre ( $M_n$ ):

$$IP = \frac{M_w}{M_n}$$

. 35

**loi de Poiseuille** relie la viscosité dynamique  $\eta$  d'un liquide, par mesure du temps d'écoulement  $\delta t$  entre un point A et un point B, tel que :  $\delta t = \frac{k\eta}{r^4 \rho}$ , où  $k$  est une constante propre au viscosimètre utilisé et  $\rho$  la masse volumique du fluide. Dans le cas de gels très dilués, on peut considérer  $\rho$  comme constant, égale à 1 kg/L. 78

**mitogène** qualité d'une substance qui promeut la mitose et la division cellulaire. 18

**motilité** capacité d'une cellule à se mouvoir, spontanément ou en réponse à des stimuli. 29

**points d'adhésion focaux** regroupement (ou cluster) local d'intégrines, récepteurs d'adhésion cellulaire, fournissant un point d'ancrage de la cellule sur la MEC. 25, 28, 29

**rayon de giration** représentation mathématique (gaussienne) de la zone spatiale occupée par un polymère, en prenant en compte sa solvation. 27

**rupture homolytique** rupture d'une liaison covalente via la répartition égalitaire des deux électrons sur les atomes mis en jeu, ce qui conduit à la formation de deux radicaux, comme suit :  $\overset{\cdot}{\text{A}}-\overset{\cdot}{\text{B}} \longrightarrow \overset{\cdot}{\text{A}} + \overset{\cdot}{\text{B}}$ . 41

**série de Hofmeister** la série de Hofmeister ordonne les ions en fonction de leur capacité à réguler la concentration en protéine, par action sur leur solubilité (précipitation/solubilisation). Les anions ont un effet plus marqué que les cations, et sont ordonnés comme suit (non exhaustif) :  $\text{SO}_4^{2-} > \text{HPO}_4^{2-} > \text{CH}_3\text{-COO}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{NO}_3^- > \text{I}^- > \text{SCN}^-$ .

Les premiers éléments tendent à diminuer la solubilité protéique tandis que les derniers l'augmentent. Si le phénomène s'observe de manière générale sur tous les systèmes eau / macromolécules auxquels des ions sont ajoutés, les mécanismes en jeu restent mal connus. 44

**système immunitaire inné** immunité primaire non spécifique, combattant en première ligne toute intrusion ou pathologie. Elle comprend notamment les barrières physiques (peau, muqueuses), la réponse inflammatoire, la phagocytose ou encore une suite de réactions protéolytiques en cascade. 27



**AUTEUR :** Guillaume CONZATTI

**TITRE :** Biomatériaux pour application chirurgicale : Elaboration et fonctionnalisation pour une bioadhésion thermorégulée

**RÉSUMÉ :** Avec une mortalité après pancréatectomie de l'ordre de 5 % et une morbidité aux alentours de 50 %, la chirurgie pancréatique est l'une des plus délicates des interventions digestives. L'une des complications les plus graves est l'apparition de fistules pancréatiques (FP), c'est-à-dire un défaut d'imperméabilisation au niveau des sutures, impliquant une fuite enzymatique dans le milieu péritonéal qui peut engager le pronostic vital du patient. A ce jour, aucun dispositif médical n'est indiqué dans la prévention de ces FPs. Ainsi, ce projet a pour ambition de concevoir et de valider un biomatériau constitué d'une matrice absorbante qui assurera la double fonction d'éponge et de réservoir d'agent antibactérien, sur laquelle un greffage chimique devrait conférer des propriétés bioadhésives thermorégulées. La première partie de ce travail est consacrée à l'optimisation de la matrice absorbante, à base d'alginate et de chitosane, déjà développée lors d'une précédente thèse. Trois types de procédés de séchages ont été comparés : le séchage par évaporation, la lyophilisation et le séchage en milieu CO<sub>2</sub> supercritique. Ces différents procédés conduisent à des matériaux de structures internes et de porosités différentes. L'impact de ces différences de structure a été évalué en termes de capacité de gonflement dans différents milieux, dont un milieu pancréatique simulé, mais aussi en termes de résistance enzymatique et de libération de principe actif. En tenant compte des résultats obtenus, le séchage par évaporation a été identifié comme le plus approprié pour la suite de l'étude. Dans une deuxième partie, du poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM) a été synthétisé par polymérisation contrôlée (RAFT) afin d'être greffé sur la matrice absorbante. Le PNIPAM est un polymère thermosensible dont les propriétés bioadhésives sont directement dépendantes de la température. Ce polymère est généralement bioadhésif au-dessus de sa « lower critical solution temperature » (LCST), située aux alentours de 32 °C. Dans cette étude la masse molaire et la densité de greffage du PNIPAM sont les deux principaux paramètres étudiés pour son greffage sur les matrices. Enfin, les propriétés de surface des matrices greffées ont été caractérisées. Les matériaux ont montré, *in vitro*, des propriétés bioadhésives thermosensibles, avec une bioadhésion cellulaire observée principalement au-delà de la LCST. Les essais *ex vivo* ont cependant montré une bioadhésion sur organe plus importante en dessous de celle-ci. Cette étude a permis de mettre au point des biomatériaux absorbants aux propriétés de surface thermorégulées. Une compréhension plus fine des relations propriétés de surface/propriétés d'usage permettrait d'optimiser les propriétés de bioadhésion thermorégulée.

**MOTS-CLÉS :** biomatériaux, fonctionnalisation de surface, biopolymères, alginate, bioadhésion, chitosane.

---

**TITLE :** Biomaterials for surgical application : Elaboration and fonctionnalisation for a thermoregulated bioadhesion

**ABSTRACT :** Pancreatic surgery, which leads to 5 % of mortality and around 50 % of morbidity, is one of the most critical digestive operations. The most serious complication is the appearance of pancreatic fistulas (PFs), i.e. enzymatic leaks from the surgical sutures to the peritoneal environment that can lead to the life threatening of the patient. To date, no medical device is indicated for the prevention of these FPs. The aim of this project is to design and validate a biomaterial constituted of a matrix that will ensure the dual function of absorbent and antibacterial agent reservoir, on which a chemical grafting should confer thermoregulated bioadhesive properties. The first part of this work is devoted to the optimisation of the absorbent matrix, based on alginate and chitosan, already developed during a previous thesis. Three types of drying processes were compared : drying by evaporation, lyophilisation and drying in supercritical CO<sub>2</sub> medium. These different processes led to materials with different internal structures and porosities. The impact of these structures was evaluated in terms of swelling capacity in various media, including a simulated pancreatic environment, but also in terms of enzymatic resistance and release of an active molecule. Taking into account the obtained results, drying by evaporation was identified as the most appropriate process. In a second part, poly (N-isopropylacrylamide) (PNIPAM) was synthesised by controlled polymerisation (RAFT) in order to be grafted onto the absorbent matrix surfaces. PNIPAM is a thermosensitive polymer with bioadhesive properties which depend on the temperature. This polymer is usually bioadhesive above its lower critical solution temperature (LCST), around 32 °C. In this study, the molar mass and the grafting density of PNIPAM are the two main parameters studied for the surface modifications. Finally, the surface properties of the grafted matrices were characterised. *In vitro*, the materials showed thermosensitive bioadhesive properties, with a cellular bioadhesion mainly observed above the LCST. However, *ex vivo* tests exhibited higher bioadhesion on porcine organs at lower temperatures. This study led to the development of absorbent biomaterials with thermoregulated surface properties. Further understanding of the relationship between surface properties and *in vivo* bioadhesion would allow the optimisation of the thermoregulated surface properties.

**KEYWORDS :** biomaterial, surface functionalisation, biopolymers, alginate, bioadhesion, chitosane.